



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



FACULTAD  
DE CIENCIAS  
BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**EFFECTO DE DIFERENTES CONDICIONES DE ILUMINACIÓN  
EN EL CRECIMIENTO DE *Galdieria sulphuraria* Y EN LA  
PRODUCCIÓN DE FICOCIANINA**

**TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I O L O G O**

**P R E S E N T A:**

MARIELA SAUCEDO REYES

**DIRECTOR**

DR. ALFREDO MARTÍNEZ JIMÉNEZ

**CODIRECTOR**

DRA. MARIANA MANZONI MARONEZE

**CUERNAVACA, MORELOS**

**ENERO, 2024**



Instituto de Biotecnología

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Alfredo Martínez Jiménez y la asesoría, supervisión y codirección de la Dra. Mariana Manzoni Maroneze en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología (IBt) de la Universidad Nacional Autónoma de México. Este trabajo fue apoyado por la Universidad Nacional Autónoma de México a través de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) mediante el proyecto PAPIIT-DGAPA-UNAM IT201119.

## DEDICATORIA

Con mucho cariño, dedico este logro a mi papá, quien con sus esfuerzos hizo posible que alcanzara mi sueño adolescente. También a mi mamá, por su preocupación constante y asegurarse de que no me faltara nada durante mis días en la escuela. ¡A ambos, muchas gracias!

A mis queridas hermanas Miriam y Mariana, les agradezco por estar siempre presentes en mi vida. La unión que compartimos las tres es la fuente de nuestra fortaleza, y deseo que nunca olvidemos la importancia de ese vínculo.

A Tomasa, quien compartió la mitad de mi camino, a Nieves y Mini por ser la mejor compañía en mis desvelos, a Perdi y Berrex por enseñarme el verdadero significado de la lealtad. ¡Gracias por ser parte esencial de mi viaje!

## GRACIAS

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Alfredo Martínez Jiménez por brindarme la oportunidad de formar parte del grupo de Ingeniería de Vías Metabólicas y Biología Sintética de Microorganismos del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

A la Dra. Mariana Manzoni Maroneze, agradezco su apoyo incondicional, consejos y la combinación de momentos de risas y trabajo a lo largo de este proyecto. La admiro profundamente y le agradezco de corazón por todo.

A mi grupo de sinodales, compuesto por la M. en C. Judith García, el Dr. Luis Caspeta, el Dr. Andrés García y el Dr. Carlos Montenegro, por su presencia en mis evaluaciones, así como por sus valiosas observaciones y sugerencias que me han sido de gran ayuda.

A la Dra. Noemi Flores Mejía, M. en C. Georgina Teresa Hernández Chávez, Q. I. Luz María Martínez Mejía por su apoyo técnico y operativo del Laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas y Biología Sintética de Microorganismos del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

A la Sra. Aurelia por ser nuestro personal de apoyo en el laboratorio.

Al Biól. Manuel Saucedo Ramírez por su valioso acompañamiento, enseñanzas y apoyo en mi trayecto, gracias por todo, papá.

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

Al Biól. Mario Alberto Caro Bermúdez y al equipo que conforma la Planta Piloto.

A mi gran amiga Gaby por ser mi acompañante en toda la carrera y la mejor amistad desde mi infancia, por dejarme compartir muchos momentos con ella.

A Libni mi amiga por los momentos de alegría, frustración, de ánimos y por ayudarme a entender que no todo es fácil.

A Fer, agradezco el apoyo brindado y la confianza depositada, aprecio enormemente todas las conversaciones llenas de consejos, chistes y más.

Shaid, Marianita, Karen y Fanny gracias por llegar a mi vida y darme momentos de risas, platicas y ser una parte bonita en mi vida, los amo chicos.

A Ross por estar juntas en este camino y ser parte del equipo microalgas, a mis compañeros de grupo: Estefa, Gilberto, Omar, Eliseo, León y Azeret por sus sugerencias y comentarios. A mis compañeros de laboratorio: Angelica, Nadia y Lulú.

Al Lic. David Noriega Flores por su apoyo incondicional durante este proceso. En un momento en el que mi voluntad de seguir adelante estaba en su punto más bajo, su guía y aliento fueron una luz en la oscuridad. Estaré eternamente agradecida por ser un faro de esperanza en mi vida.

## Índice

1. Introducción	7
2. Marco teórico	9
2.1 Microalgas	9
2.2 Modos de cultivo: autotrófico, heterotrófico y mixotrófico	12
2.3 Efecto de la luz en cultivos microalgales	13
2.4 Composición bioquímica de <i>G. sulphuraria</i>	15
2.5 Antecedentes	17
3. Justificación	19
4. Hipótesis	19
5. Objetivos	20
5.1. Objetivo general	20
5.1 Objetivos específicos	20
6. Métodos experimentales	20
6.1 Cepa	20
6.2 Medio de cultivo	20
6.3 Inóculo	21
6.4 Fotobiorreactor y condiciones de cultivo	22
6.5 Parámetros cinéticos	22
6.6 Métodos analíticos	23
7. Resultados	26
8. Conclusiones	37
9. Referencias bibliográficas	38

## 1. Introducción

Las microalgas son organismos vivos ancestrales que constituyen la base de las cadenas alimentarias acuáticas y han sido utilizadas como alimento por el ser humano durante miles de años por diferentes civilizaciones. En las últimas décadas, estos microorganismos han vuelto a recibir atención como fábricas microscópicas que pueden producir de forma sostenible diversos metabolitos con propiedades tecnológicas y biológicas de gran interés para diferentes sectores (Jaeschke et al., 2021). Entre los compuestos de interés están las proteínas con aminoácidos esenciales, ácidos grasos poliinsaturados, polisacáridos, pigmentos (clorofilas, carotenoides y ficobiliproteínas), esteroides, vitaminas y minerales (Bernaerts et al., 2019). Otras características importantes son que para su propagación no requieren tierras cultivables, pueden secuestrar CO<sub>2</sub>, crecer en agua dulce, aguas residuales o agua de mar, y son los organismos con mayor eficiencia fotosintética en la naturaleza (Jacob-Lopes et al., 2019).

Sin embargo, a pesar del enorme espectro de oportunidades que puede ofrecer la biomasa de esos microorganismos y de los avances recientes, la producción de microalgas todavía tiene varios desafíos que deben abordarse (Maroneze et al., 2021). Desde el punto de vista de bioprocesos viables, técnica y económicamente, se requiere de microorganismos que presentan altas tasas de crecimiento, generen productos comercializables en cantidades significativas, que crezcan en diferentes sustratos y preferentemente en condiciones ambientales que disminuyan la contaminación por otros microorganismos. Además, es importante que los procesos sean optimizados y que se produzcan más de un producto desde la misma biomasa para que la viabilidad económica sea lograda (Severo et al., 2021). En este sentido, algunas posibles soluciones a los principales desafíos relacionados con los procesos y productos basados en microalgas son: (i) utilizar microalgas extremófilas, (ii) manejar diferentes estrategias de cultivo para mejorar la productividad del sistema (p. ej. cultivos mixotróficos), y (iii) inducir la producción de los compuestos de interés través de la modulación de las condiciones de cultivo.

*Galdieria sulphuraria* es una microalga unicelular perteneciente al grupo de las algas rojas de la familia Cyanidiales y se clasifica como poliextremófila del tipo termoacidófilo, ya que puede sobrevivir en ambientes ácidos con valores de pH entre 0 a 4 y a temperaturas superiores a 50 °C. Además de las propiedades acidófilas y termófilas, esa microalga se destaca por su capacidad para crecer de forma autotrófica, heterotrófica y mixotrófica en una amplia variedad de azúcares y alcoholes de azúcar (Gross y Schnarrenberger, 1995; Sakurai et al., 2016). Mediante el uso de fuentes de carbono orgánico exógeno en cultivos heterótrofos o mixotróficos, se pueden superar los problemas clave asociados con la dependencia de la luz de los cultivos autotróficos. Además, estos modos de cultivo han demostrado ser métodos efectivos para mejorar la productividad de los procesos y productos basados en microalgas (Song y Pei, 2018; Gao et al., 2019). El principal metabolito de interés comercial de esta especie es la ficocianina, un pigmento azul proteico, ampliamente utilizado como colorante natural en la industria alimentaria y cosmética, debido a su intensa pigmentación y su excelente estabilidad. Además, el interés por el uso de la ficocianina en alimentos funcionales y como nutraceutico ha crecido gracias a sus propiedades bioactivas, como antioxidante, antiinflamatorio, antiviral y anticancerígeno (Vernès et al., 2015; Maroneze et al., 2020).

Por otro lado, los mecanismos de adaptación y las condiciones óptimas para una alta producción de biomasa y metabolitos de *G. sulphuraria* son actualmente poco conocidos (Liu et al., 2021; Song y Pei, 2018; Gao et al., 2019). El crecimiento y la composición de microalgas se ve afectado por la combinación de varios parámetros operativos, tales como condiciones de iluminación, temperatura, pH, transferencia de gases y la disponibilidad de carbono (orgánico y/o inorgánico) y nutrientes en el medio de cultivo (Kitaya et al., 2008). Entre ellos, la luz es el motor de la reacción de la fotosíntesis y, consecuentemente afecta tanto los cultivos autotróficos, como mixotróficos, en términos de crecimiento y producción de metabolitos (Maroneze et al., 2019). La fotosíntesis en *G. sulphuraria*, al igual que otras microalgas rojas y cianobacterias, se realiza a través del complejo captador de luz, constituido por carotenoides, ficobilisomas y clorofila. De este modo, para

lograr altos rendimientos de biomasa y productos, principalmente de ficocianina, la intensidad de la luz es un parámetro crucial que se debe optimizar en estos procesos.

## 2. Marco teórico

### 2.1 Microalgas

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos ampliamente distribuidos en la naturaleza, siendo más abundantes en ambientes acuáticos (marinos y de agua dulce), pero también se encuentran en arenas desérticas, aguas termales, nieve y hielo (Queiroz et al., 2020). Según el [algaebase.org](http://algaebase.org), actualmente hay más de 170.000 especies catalogadas. Son preferiblemente autotróficos, o sea, pueden convertir la energía solar en energía química mediante la fijación de dióxido de carbono, pero algunas especies pueden crecer en heterotrofia y/o mixotrofia.

Las microalgas han atraído la atención mundial debido a su importante papel en el equilibrio ecológico y sus aplicaciones biotecnológicas. Estos microorganismos son fundamentales en el ciclo global del carbono, donde a través de la fotosíntesis asimilan aproximadamente el 50% del CO<sub>2</sub> de la Tierra, generando O<sub>2</sub> y materia orgánica (Falkowski y Raven, 2007). Todavía juegan un papel importante en el ciclo del nitrógeno, donde las cianobacterias, especialmente con heterocistos, se consideran las mayores fijadoras de N<sub>2</sub> (Borowitzka, 2018). En la biotecnología industrial presentan un gran valor ya que pueden producir compuestos con potencial de aplicación en diversas industrias como la farmacéutica, nutracéutica y alimentos, también se aplican para el tratamiento de aguas residuales, mitigación de CO<sub>2</sub> y producción de biocombustibles (Acién et al., 2018; Hsieh-Lo et al., 2019; Yousuf, 2020; Li et al., 2023).

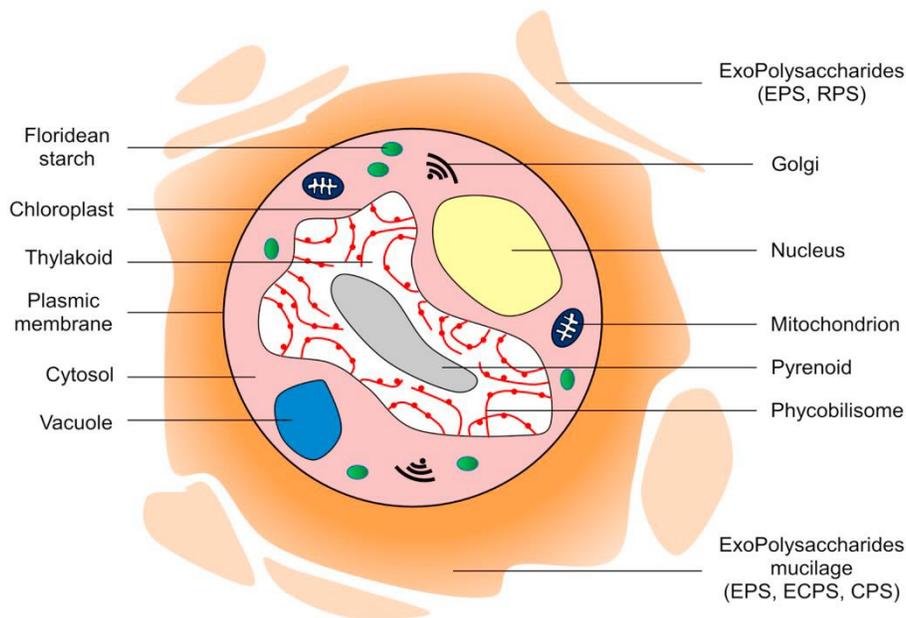
En cuanto a su morfología, pueden presentarse en una amplia variedad de formas (p.ej. ameboide, palmeloide, cocoide, filamentoso, flagelado y sarcinoide) y tamaño (0.5–200µm), dependiendo de su especie y etapa de crecimiento (Andersen, 2014). Las microalgas pueden ser unicelulares, multicelulares o coloniales. Las unicelulares pueden presentar de uno a más flagelos, sin embargo, existen microalgas que no poseen flagelos y presentan motilidad gracias al

deslizamiento y natación (Tomaselli, 2004). En cuanto a las colonias se encuentran unidas por mucílago, que ayudan a la motilidad de las células y se organizan en amorfos (sin distribución y no hay número fijo de células) y los cenobios (ordenadas y número estricto de célula) (Tomaselli, 2004). Otra forma de organización celular son los filamentos que se encuentran organizados en filas; existen los ramificados que están en una sola serie (uniseriales) o más series (multiseriales) y los no ramificados que se conforman por divisiones celulares continuas, pueden deslizarse también pueden hacer rotación y arrastre, sin embargo, son inmóviles (Queiroz et al., 2020).

Según Borowitzka (2018) bajo el nombre de microalgas, se incluyen organismos con dos tipos de estructura celular: estructura procariota, formada básicamente por el grupo *Cyanophyta*; y estructura eucariota, con representantes en los grupos *Glaucophyta*, *Rhodophyta*, *Ochrophyta*, *Haptophyta*, *Cryptophytes*, *Dinophyta*, *Euglenophyta*, *Chlorarachniophyta* y *Chlorophyta*. La distinción clave entre ambos tipos de células es la presencia de compartimentos especializados llamados orgánulos en las células eucariotas que faltan en las procariotas. La estructura del grupo *Cyanophyta* solo se compone de un citoplasma en donde se almacena el ADN, mientras que los tilacoides se localizan de manera paralela a la membrana celular, posee cloroplasto y pared celular (Queiroz et al., 2020). La ultraestructura de las células eucariotas es más compleja debido al desarrollo de los orgánulos, que son resultado de pequeños cambios a lo largo de su historia evolutiva. Estos orgánulos comprenden el núcleo, las mitocondrias, los cloroplastos, el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi y los lisosomas (López-García et al., 2017).

Las microalgas rojas (*Rodophyta*) (Figura 1) son un grupo todavía poco explorado industrialmente, pero con un enorme potencial biotecnológico. Dentro de este filo se encuentra la clase *Cyanidiophyceae*, se incluyen dos familias *Cyanidiaceae* y *Galdieriaceae*, que corresponden a los géneros *Cyaniduum*, *Cyanidioschyzon* y *Galdieria* (Montenegro et al., 2022). La microalga *Galdieria sulphuraria* se clasifica como extremófila del tipo termoacidófilo, ya que puede

sobrevivir en ambientes ácidos con valores de pH entre 0 a 4 y a temperaturas arriba de los 50 °C (Sidney et al., 2019). Tiene forma esférica, no cuenta con pared celular sino con una membrana de exopolisacáridos, se reproduce mediante esporas y solo cuenta con un cloroplasto (López et al., 2021). Se caracterizan por presentar clorofila a, carotenoides y ficobiliproteínas como pigmentos accesorios. Además, contiene el almidón florídeo (polisacárido similar al glucógeno), que funciona como carbohidrato de reserva (Borowitzka, 2018).



**Figura 1.** Ultraestructura de una microalga roja. Fuente: Gaignard et al. (2019).

Este microorganismo tiene la capacidad de crecer tanto autotróficamente, como heterotróficamente y mixotróficamente, en una amplia variedad de compuestos orgánicos, incluyendo disacáridos (sacarosa), monosacáridos (ej. glucosa, fructosa, manosa, galactosa, xilosa, y arabinosa), alcoholes (ej. glicerol), aparte de diferentes aguas residuales (Gross y Schnarrenberger, 1995; Du et al., 2018). La versatilidad metabólica de *G. sulphuraria* combinada con su capacidad de crecer en ambientes extremos y su producción de metabolitos, hacen con que este organismo sea un recurso futuro prometedor para la explotación en biorrefinerías (Massa et al., 2019).

## 2.2 Modos de cultivo: autotrófico, heterotrófico y mixotrófico

La flexibilidad metabólica de *G. sulphuraria* es especialmente importante, porque permite el manejo de diferentes tipos de cultivo, los cuales se clasifican principalmente en: autotrofia, heterotrofia y mixotrofia (Maroneze et al., 2021).

Las microalgas se han producido a gran escala desde la década de 1960, dada su gran variedad de aplicaciones. En todo ese tiempo, el proceso fotosintético es la condición de cultivo más utilizada para el crecimiento de microalgas a larga escala (Maroneze et al., 2021). Los cultivos autotróficos a través de la fotosíntesis convierten energía solar y CO<sub>2</sub> en energía química. En general los procesos autotróficos se consideran más económicos ya que pueden utilizar el CO<sub>2</sub> atmosférico y la luz solar como fuente de energía (Masojídek et al., 2013; Maroneze et al., 2021). Por otro lado, el escalamiento de cultivos autótrofos es difícil y ocupa un área significativa de las fábricas de producción industrial, además, estos cultivos generalmente presentan una baja productividad, que en las mejores condiciones es de 1.0 a 1.5 g/L.d, lo que también incrementa los costos de cosecha (Zhang et al., 2016).

El modo heterótrofo se basa en la respiración de células de microalgas sin luz, utilizando materia orgánica como fuentes de energía y carbono. Este tipo de cultivo puede superar las principales limitaciones de los cultivos autótrofos y puede realizarse en fermentadores convencionales, en donde no se requiere de una fuente de energía lumínica y se utiliza una fuente exógena de carbono orgánico. Esas moléculas complejas se metabolizan a través de la vía Embden-Mayerhoff-Parnas (glucólisis) o vía de las pentosas fosfato (PP). El fácil escalamiento y la relativa simplicidad de las operaciones y el mantenimiento diario son los principales atractivos del crecimiento heterótrofo (Pérez-García et al., 2011). Sin embargo, el número de especies capaces de realizarlo son limitados y en general hay una baja producción de compuestos foto-dependientes, como los pigmentos (clorofila, carotenoides y ficocianina) (Maroneze et al., 2019).

Otra estrategia de cultivo son las condiciones mixotróficas, en donde las microalgas pueden metabolizar simultáneamente carbono orgánico e inorgánico,

mediante la respiración celular y la fotosíntesis, respectivamente (Zhan et al., 2017). La mixotrofia es una estrategia evolutiva adaptada por algunos microorganismos, especialmente protozoos y microalgas para superar las limitaciones de luz en aguas profundas mediante la utilización simultanea de fuentes de carbono inorgánicas y orgánicas para su crecimiento (Marchello et al., 2018; Arora y Philippidis, 2021). La mixotrofia supera el inconveniente del efecto de sombreado, el cual es el principal factor que limita el escalamiento de los sistemas exclusivamente fotosintéticos. Al mismo tiempo, muchos autores reportan que este tipo de cultivo presenta mejores tasas de crecimiento comparadas con lo reportado para autotrofia y heterotrofia, y son más eficientes que los heterotróficos en sintetizar metabolitos.

Por ejemplo, Li y colaboradores (2014) investigaron el crecimiento de *C. sorokiniana* y la producción de lípidos en las tres condiciones de cultivo y reportaron que los mejores rendimientos fueron obtenidos en los cultivos mixotróficos, con tasa específica de crecimiento de  $3.4 \text{ d}^{-1}$  y contenido de lípidos de 35%, 1.8 y 1.2 veces superior a los cultivos heterótrofos y 5.4 y 3.8 veces superior a los cultivos fotoautotróficos. De igual forma, López et al. (2019), utilizando *G. sulphuraria* reportaron que el uso de glucosa como fuente de carbono favoreció el crecimiento heterótrofo y mixotrófico de hasta 12 veces más biomasa que el crecimiento en condiciones autotróficas.

### 2.3 Efecto de la luz en cultivos microalgales

La fotosíntesis implica la conversión de la energía luminosa en energía química, una función comúnmente llevada a cabo por organismos fotosintéticos como las microalgas (Xie et al., 2022).

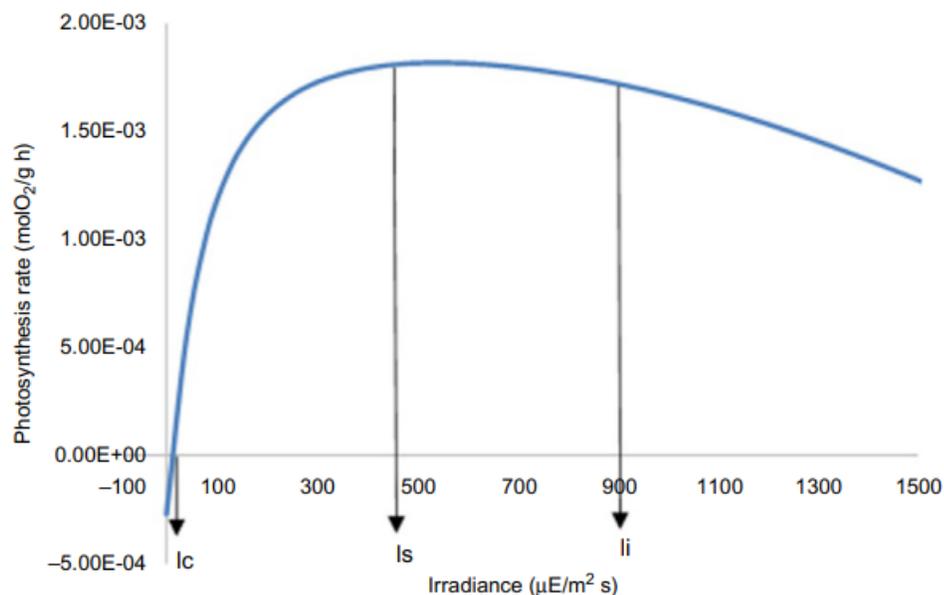
Las microalgas se cultivan en entornos iluminados, naturales o artificiales, a través de fotobiorreactores. Estos son cruciales para proporcionar la luz necesaria para el crecimiento celular, convirtiendo la intensidad lumínica en un factor clave en el cultivo y producción de biomasa. La composición y cantidad de biomasa están directamente ligadas a la intensidad de la luz. La fotosíntesis de las microalgas, la cual es vital para su crecimiento, se ve afectada por la intensidad lumínica,

necesaria para la producción de ATP, NADPH y moléculas esenciales (Castillo et al., 2021; Gao et al., 2022; Metsoviti et al., 2019).

El sistema fotosintético de las microalgas utiliza la porción del espectro de luz solar entre 400 y 700 nm. Al analizar la respuesta de la tasa de fotosíntesis versus irradiancia, se observa el comportamiento típico como se muestra en la Figura 2.

La irradiancia de compensación ( $I_c$ ) representa el umbral mínimo para iniciar la fotosíntesis, aumentando la tasa hasta la irradiancia de saturación ( $I_s$ ). Sin embargo, irradiaciones superiores causan fotoinhibición ( $I_i$ ), disminuyendo la fotosíntesis.

La irradiancia de compensación ( $I_c$ ) representa el umbral mínimo para iniciar la fotosíntesis. En condiciones de baja intensidad lumínica (debajo de la  $I_c$ ), las microalgas experimentan fotolimitación, predominando la respiración. En intensidades mayores a la irradiancia de saturación la tasa fotosintética incrementa con el aumento de la intensidad de luz hasta alcanzar un máximo en la irradiancia de saturación de luz ( $I_s$ ). Sin embargo, a irradiancias superiores a la irradiancia de inhibición ( $I_i$ ), la tasa de fotosíntesis se reduce por fotoinhibición, en donde los fotosistemas pueden ser dañados reversiblemente, o incluso permanentemente, debido a daños fotooxidativos (Acien, et al., 2020; Maroneze et al., 2021; Rossi et al., 2020).



**Figura 2.** Curva de fotosíntesis versus irradiancia. Fuente: Acien et al. (2020).

#### 2.4 Composición bioquímica de *G. sulphuraria*

Las microalgas han atraído una atención considerable tanto de la industria como de los investigadores debido a su amplia variedad de aplicaciones, por ejemplo, como ingredientes alimentarios, suplementos nutricionales, alimentos para animales, fármacos, cosméticos, combustibles y otros productos de valor agregado. (Jacob-Lopes et al., 2019).

Las proteínas son uno de los grupos de alimentos más estudiados debido a su importancia como fuente de aminoácidos esenciales. En *G. sulphuraria* según reporta Modeste y colaboradores (2019), puede producir más de 45% de proteína total en peso seco en condiciones óptimas de crecimiento. Montenegro-Herrera et al. (2022) obtuvieron contenidos de proteínas entre 39.31% y 46.86%, dependiendo de la cepa de *G. sulphuraria*. Esos mismos autores reportan que esa microalga presenta todos los aminoácidos esenciales, o sea aquellos que el cuerpo humano no es capaz de sintetizar.

Los lípidos de origen microalgal, también conocidos como aceites unicelulares, pueden utilizarse como materia prima para biocombustibles, como ingrediente o suplemento alimentario. Actualmente, el principal interés en los

aceites unicelulares es por su composición de ácidos grasos, ya que muchas veces presentan ácidos grasos esenciales, como son el ácido docosahexaenoico (DHA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido gamma-linolénico (GLA), y ácido araquidónico (ARA). Esos compuestos son conocidos por sus actividades bioactivas, ya que ayudan a disminuir problemas cardiovasculares, inflamatorios, artritis e hipertensión (Chew et al., 2017; Bhattacharya y Goswami, 2020; Mimouni et al., 2018). De acuerdo con Banihashemi et al. (2023), *G. sulphuraria* es una microalga que produce lípidos en bajas cantidades, por lo general debajo de 10%, siendo su cantidad dependiente de factores nutricionales como los niveles de nitrógeno, hierro y fósforo o factores ambientales tales como temperatura, intensidad de la luz y salinidad.

El contenido de carbohidratos puede representar una fracción importante en la biomasa de microalgas, variando del 15 al 75% de la biomasa seca, dependiendo de las especies y condiciones de cultivo (Ravindran y Rajauria, 2021). En las células, se pueden encontrar en la pared celular externa, en la pared celular interna y dentro de la célula, como productos de almacenamiento. En las algas rojas el principal carbohidrato de reserva es el almidón florídeo, un alfa poliglucano (con enlaces glucosídicos lineales  $\alpha$  (1-4) y ramificaciones  $\alpha$  (1-6)) que carece de amilosa y se acumula como gránulos en el citoplasma. El potencial de esos compuestos ha sido ampliamente estudiado como materia prima en la industria energética para la producción de biocombustibles (Debnath et al., 2021) y como ingrediente o aditivo en la industria alimentaria (Moreira et al., 2022).

Las microalgas rojas tienen la capacidad de producir tres clases de pigmentos naturales que son clorofila, carotenoides y ficobiliproteínas (Bhattacharya y Goswami, 2020). La clorofila es el pigmento natural más abundante que da a las microalgas su color verde y son esenciales para el proceso fotosintético, mediante el cual las microalgas obtienen su energía para el metabolismo y la reproducción. Existen diferentes tipos de clorofilas (a, b, c y d) pero en microalgas rojas, así como cianobacterias solo se encuentra la clorofila a (Morançais et al., 2018; Srivastava et al., 2022). Los carotenoides son pigmentos accesorios liposolubles de 40 carbonos

por molécula, que aportan coloración a las plantas y se utilizan como colorantes debido a que poseen diversos colores como el amarillo, naranja y rojo, además tienen actividades antioxidantes y antiinflamatorias, se clasifican en carotenos y xantofilas (Morançais et al., 2018; Srivastava et al., 2022). Las ficobiliproteínas son proteínas que sirven como pigmentos accesorios en algas rojas y cianobacterias, siendo la ficoeritrina (PE), ficocianina (PC) y aloficocianina (APC) las principales (Coates et. al, 2013). La unidad básica de las ficobiliproteínas es un heterodímero de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ ; cada uno está constituido por uno, dos o tres cromóforos, llamados bilinas, según el tipo de ficobiliproteína (Morançais et al., 2018).

En el caso de *G. sulphuraria*, desde un punto de vista comercial, el metabolito de mayor interés es la ficocianina, un pigmento azul ampliamente utilizado como colorante natural para diversos fines. La principal aplicación es en la industria alimentaria que se utiliza en la elaboración de dulces, bebidas, cereales, entre otros productos (García, 2020). Aparte también se utiliza en la industria farmacéutica gracias a sus propiedades fluorescentes se pueden hacer investigaciones clínicas e inmunológicas (Cervantes et al., 2018). Además, el interés por el uso de la ficocianina en alimentos funcionales y como nutracéutico ha crecido gracias a sus propiedades bioactivas, como antioxidante, antiinflamatorio, antiviral y anticancerígeno (Vernès et al., 2015; Maroneze et al., 2020). Actualmente la ficocianina más comercializada proviene de la cianobacteria *Arthrospira platensis*, sin embargo, la productividad de esa cianobacteria es baja en los cultivos autotróficos abiertos utilizados en larga escala y aparte el pigmento presenta una baja estabilidad bajo altas temperaturas y pHs ácidos. En el caso de *G. sulphuraria*, elevados rendimientos de células y de ficocianina pueden ser obtenidos a través de la modulación de las condiciones de cultivo, especialmente de iluminación (Wan et al., 2016; Wan et al., 2021).

## 2.5 Antecedentes

El contenido de la ficocianina en microalgas puede ser manipulado tanto por las intensidades de luz suministradas al cultivo como por la modulación del espectro de luz. En general, la limitación de luz aumenta los contenidos de clorofila y

ficocianina porque en esas condiciones hay una menor disponibilidad de energía para ser capturada y, para superar eso, las células pasan a sintetizar más pigmentos fotosintéticos, para mantener los niveles de energía (Rebolledo et al., 2021; Portillo y Martínez, 2021; Portillo et al., 2021).

En este sentido, Sloth y colaboradores (2005) evaluaron el efecto de diferentes intensidades de luz, con diferentes concentraciones de nitrógeno ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y carbono orgánico (glucosa, fructosa y glicerol) (5 g/L) en condiciones heterótrofas y mixotróficas en el crecimiento de *G. sulphuraria* cepa 074 G y en la acumulación de ficocianina. Los autores concluyeron que la relación carbono:nitrógeno, fuente de carbono e intensidad de luz generan cambios significativos. En cuanto a una limitación de carbono y un exceso de nitrógeno la producción de ficocianina tuvo un contenido alto, mientras que en una baja cantidad de nitrógeno la ficocianina que se obtuvo fue menor, también la obtención de ficocianina más baja (en relación carbono: nitrógeno alto) se obtuvo en cultivos mixotróficos. La disminución del contenido de PC en condiciones bajas de nitrógeno en *G. sulphuraria* es debido a que la ficocianina sirve como compuesto de almacenamiento de nitrógeno, pero la reducción del contenido de esta ficobiliproteína en *G. sulphuraria* fue menor que la observada en otras microalgas. En cultivos mixotróficos hubo una reducción de ficocianina en comparación con los heterótrofos, debido a que existía menor cantidad de nitrógeno generando una limitación de este mismo por lo cual se cree que se redujo esta ficobiliproteína para evitar un daño por fotoinhibición. Un comportamiento similar se presenta con las intensidades de luz. Los cambios en la intensidad de la luz provocaron cambios en la concentración de biomasa, así como en el contenido específico de ficocianina. La concentración de biomasa aumentó con el incremento de la intensidad de luz promedio para alcanzar un valor máximo a una intensidad de luz promedio de alrededor de  $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ . El contenido de PC específico más alto ( $\sim 21 \text{ mg}/\text{g}$ ) se encontró a  $65 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ . A la intensidad de luz más alta probada ( $395 \text{ mol}/\text{m}^2/\text{s}$  en la superficie del cultivo), tanto el crecimiento como la producción de ficocianina de *G. sulphuraria* se redujeron severamente en comparación con las intensidades de luz más bajas (Sloth et al., 2005).

Liu y colaboradores (2021), evaluaron la intensidad de luz en *G. sulphuraria* con la cepa UTEX 2919 bajo condiciones autotróficas y mixotróficas, con cuatro diferentes tratamientos de intensidad, siendo L: autotrófico (15-25  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ); L+G: mixotrófico con glucosa (10 g/L) (15-25  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ); H: autotrófico (65-85  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ); H+G: mixotróficos con glucosa (10 g/L) (65-85  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ). Los autores observaron que la alta intensidad de luz condujo a un aumento del crecimiento de los cultivos mixotróficos y autótrofos en comparación con las condiciones de baja intensidad de luz. Los pigmentos fotosintéticos (clorofila y ficocianina) fueron significativamente más altos en los cultivos autótrofos en comparación con las células cultivadas en condiciones mixotróficas y siempre fueron más bajos en condiciones de alta intensidad de luz en comparación con las condiciones de baja intensidad de luz.

### 3. Justificación

Si bien se ha descrito que en el uso de cultivos mixotróficos en *G. sulphuraria* se obtiene una mejor producción de biomasa en comparación con los cultivos auto y heterótrofos, además de que existe evidencia sobre los efectos de la intensidad de luz en esta especie de microalga para la mejora de los pigmentos fotosintéticos, no conocemos el impacto de la intensidad de luz en la cepa CCME5587.1, por lo tanto, es pertinente evaluar diferentes condiciones de luz en cultivos mixotróficos para así observar alguna relevancia significativa en la producción de compuestos microalgales.

### 4. Hipótesis

La modulación de la intensidad de luz permitirá generar elevadas concentraciones de biomasa y ficocianina, lo que incrementará la productividad del dicho compuesto.

## 5. Objetivos

### 5.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de diferentes intensidades de luz en el crecimiento mixotrófico de *Galdieria sulphuraria* CCME5587.1 y en la composición química de la biomasa microalgal.

### 5.1 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de diferentes intensidades de luz (0, 50, 100, 200, 300 y 400  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) en el crecimiento de la microalga *G. sulphuraria* CCME5587.1;
- Determinar el efecto de las diferentes condiciones de luz en la cinética de consumo de sustratos (glucosa y nitrógeno);
- Evaluar la acumulación de proteínas, lípidos, carbohidratos, cenizas, ficobiliproteínas, clorofila y carotenoides en los diferentes regímenes de luz;
- Determinar la condición de luz en donde se obtendrá la máxima productividad de ficocianina;
- Analizar la estabilidad del extracto de ficocianina obtenido de la mejor condición en diferentes tipos de iluminación.

## 6. Métodos experimentales

### 6.1 Cepa

Se utilizó la cepa CCME5587.1 de la microalga *G. sulphuraria*. El cultivo base se mantuvo bajo condiciones de iluminación constante a 40  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , a una velocidad de agitación de 150 rpm, pH inicial de 2 y temperatura de 42 °C, en medio de cultivo definido (Sloth et al., 2005).

### 6.2 Medio de cultivo

El medio que se utilizó para el cultivo de *G. sulphuraria* fue el descrito por Ford (1979) y Gross & Schnarrenberger (1995) (Tabla 1). Para la preparación de este medio de cultivo se requirió de cinco macronutrientes (1 a 5) y de dos

soluciones de elementos traza (6 y 7). Una vez preparado el medio de cultivo, se ajustó a un pH de 2.0 mediante la adición de ácido sulfúrico (96%) y fue esterilizado en autoclave a 121 °C y 15 Lb/in<sup>2</sup> de presión por 20 minutos.

**Tabla 1.** Composición del medio de cultivo.

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

N°	Componente	Adición para 100 mL de solución patrón de Fe-EDTA
1	FeSO <sub>4</sub>	690 mg
2	EDTA	930 mg

N°	Componente	Adición para 1 L de solución patrón de metales traza
1	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86 g
2	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.82 g
3	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	220mg
4	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	30 mg
5	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	80 mg
6	NaVO <sub>3</sub> ·4H <sub>2</sub> O	40 mg
7	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	40 mg

### 6.3 Inóculo

Los inóculos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 300 mL de medio de cultivo, suplementados con 10 g/L de glucosa, dejándolo en

crecimiento mixotrófico por 5 días y bajo las mismas condiciones de cultivo de cepa (42 °C, pH 2.0, 150 rpm y 40  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ).

#### 6.4 Fotobiorreactor y condiciones de cultivo

Los cultivos se realizaron en fotobiorreactores de columna de burbujas construido en vidrio de borosilicato transparente de 3.3 mm con diámetro interno de 9.4 cm, altura de 22.5 cm y volumen nominal de trabajo de 800 mL. El sistema de dispersión del reactor consistió en un difusor de aire de 1.5 cm de diámetro ubicado en el centro de la columna. El flujo de aire fue monitoreado por rotámetros y la entrada de aire y salida de gases se filtraron a través de unidades filtrantes compuestas por membrana de polipropileno con diámetro de poro de 0.22  $\mu\text{m}$  y diámetro total de 50 mm (Millex FG, Billerica, MA, USA). Los fotobiorreactores se colocaron en una incubadora con control de temperatura y luz. Todo el sistema de reactores fue esterilizado previamente en autoclave a 121 °C durante 20 min.

El medio de cultivo se suplementó con 1% de glucosa, inoculados al 10% (v/v) a partir del cultivo de propagación. Los cultivos crecieron a una temperatura de 42 °C mediante agitación mecánica de 200 rpm con un magneto plano de 3 pulgadas de teflón y aireación de 1vvm (conteniendo  $\text{CO}_2$  atmosférico:  $\sim 0.04\%$ ). Se evaluaron diferentes intensidades de luz (0, 50, 100, 200, 300 y 400  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ).

Todos los cultivos se realizaron por triplicado. Las muestras se tomaron cada 24 h durante todo el tiempo de cultivo, las cuales se analizaron en cuanto a concentración de biomasa, concentración de amonio y glucosa. La biomasa obtenida en los cultivos se liofilizó para determinar su composición bioquímica. En los gráficos y tablas se muestran los resultados promedio con su respectiva desviación estándar.

#### 6.5 Parámetros cinéticos

La velocidad máxima específica de crecimiento ( $\mu$ ,  $\text{d}^{-1}$ ) se calculó según la ecuación 1:

$$\mu = \ln(X_t/X_0)/(t - t_0) \quad (1)$$

donde  $X_t$  es la concentración de biomasa (g/L) en el tiempo  $t$  (d) y  $X_0$  es la concentración de biomasa en el momento  $t_0$  (d).

El tiempo de duplicación ( $dt$ , d) se calculó utilizando la ecuación 2:

$$dt = \ln 2 / \mu \quad (2)$$

La productividad de la biomasa ( $P_x$ , g/L.d) se evaluó de acuerdo con la ecuación 3:

$$P_x = (X_t - X_0) / (t - t_0) \quad (3)$$

El rendimiento de biomasa sobre sustrato se determinó a partir de la ecuación 4:

$$Y_{x/s} = (X_t - X_0) / (S_t - S_0) \quad (4)$$

donde  $S_t$  es la concentración de sustrato (g/L) en el tiempo  $t$  (d) y  $S_0$  es la concentración de sustrato en el tiempo inicial (d).

Considerando la fórmula básica para la biomasa de microalgas propuesta por (Chisti, 2007):  $\text{CO}_{0.48}\text{H}_{1.83}\text{N}_{0.11}\text{P}_{0.01}$ , la tasa de fijación de  $\text{CO}_2$  ( $r_{\text{CO}_2}$ ) en cultivos mixotróficos fue determinada de acuerdo con la ecuación 5 descrita por (Chakravarty y Mallick, 2022):

$$r_{\text{CO}_2} = (P_{x \text{ mixotrofico}} - P_{x \text{ heterotrofico}}) \times 1.88 \quad (5)$$

## 6.6 Métodos analíticos

La concentración celular fue determinada usando la densidad óptica del cultivo obtenida a 800 nm en espectrofotómetro (GENESYSTEM 10S UV-Vis, Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA) y convertida a peso seco de células mediante una curva de calibración. Las lecturas se realizaron por triplicado y se interpolaron en una curva tipo de peso seco, usando agua destilada como blanco. Para determinar el peso seco de la masa celular, las muestras se filtraron a través de membranas de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro. Posteriormente, las membranas se secaron en una estufa a 75 °C, hasta peso constante.

La concentración de glucosa de los medios de crecimiento se cuantificó mediante HPLC (Waters, Millipore, Milford, MA). El HPLC fue equipado con una columna de exclusión iónica HPX-87H (Bio-Rad, Hércules, CA). Se empleó una fase móvil de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM a 0.5 mL/min, y las muestras se examinaron a 60 °C.

La concentración de amonio (Hernández-López y Vargas-Albores, 2003) se efectuó con 750 µL de la muestra convenientemente diluida (1/1000) sin células se mezcló 60 µL de fenol 10% (en etanol al 95%), 60 µL de nitroprusiato de sodio 0.5% y 90 µL de solución oxidante (citrato de sodio 20% p/v, hidróxido de sodio 1% p/v, hipoclorito de sodio v/v). Una vez adicionados todos los reactivos se mezclaron por inversión. La mezcla fue incubada durante 60 min a temperatura ambiente y se determinó la densidad óptica en el espectrofotómetro (GENESYST<sup>TM</sup> 10S UV-Vis, Thermo Scientific<sup>TM</sup>, Waltham, Massachusetts, USA) a una longitud de onda de 655 nm. Se hizo un triplicado de cada muestra. Se obtuvo una curva de calibración que se realizó con sulfato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

La concentración total de lípidos de la biomasa se determinó gravimétricamente por el método modificado de Bligh y Dyer (1959) descrito en Vendruscolo et al. (2018).

Los carotenoides y la clorofila se extrajeron de la biomasa liofilizada (5mg) y se resuspendieron en 1 mL de Acetona al 90%, se adicionaron 500 mg de perlas de vidrio de 450-500 µm (Sigma Aldrich), se mezclaron por agitación durante 2 minutos y se incubaron por 3 horas (37°, 300 rpm) (Montenegro-Herrera, 2022).

La ficocianina de la biomasa de *G. sulphuraria* se extrajo según el método propuesto por Moraes et al. (2011), en donde la microalga es sometida a varios ciclos de congelamiento y descongelamiento utilizando tampón de fosfato salino como solvente. La concentración de ficocianina fue determinada mediante un espectrofotómetro de matriz de diodos UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.), midiendo la Absorbancia (A) a 618 y 652 nm, y se calculó utilizando la ecuación 6 (Bennet y Bogorad 1973):

$$\text{Ficocianina (mg/mL)} = (A_{618} - (0.474 \times A_{652})) / 5.34 \quad (6)$$

La composición de carbohidratos totales se realizó por el método ácido fenol-sulfúrico (Quero-Jiménez et al., 2019), en donde se usó 10 mg de biomasa de microalgas liofilizadas en 10 mL de agua destilada, después se tomaron 2 mL de la solución y se mezcló con 1 mL de una solución acuosa de fenol al 5%, agregando rápidamente a la mezcla 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, las muestras reposaron durante 10 minutos y después fueron agitadas durante un minuto. Posteriormente, las muestras se colocaron en baño de agua durante 20 min a temperatura ambiente y las muestras. Se cuantificaron mediante a 490 nm en espectrofotómetro (GENESYS™ 10S UV-Vis, Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA). Se hizo un cuádruplo de cada muestra. Para estimar los carbohidratos totales se obtuvo una curva de calibración utilizando glucosa como estándar.

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo por el método de Lowry et al. (1951), en donde, 5 mg de biomasa seca se hidrolizaron termoquímicamente con ácido 17 tricloroacético (TCA; 24% p/v) a 90 °C y 15 minutos (Slocombe et al., 2013). Después de la hidrólisis, la cuantificación de proteínas se llevó a cabo utilizando el método colorimétrico de Folin y utilizando una curva de referencia de albúmina de suero bovino.

Para evaluar la estabilidad de la ficocianina, se siguió el método propuesto por Moraes et al. (2011). La extracción se realizó por triplicado y se distribuyó en tubos Eppendorf de 1.6 mL. Posteriormente, se sometió a los tratamientos específicos, que incluyeron exposición de intensidad de luz controlada (incubadora 25  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ), intensidad de luz ambiental (dentro del laboratorio) y oscuridad, durante un periodo de 192 horas. Se procedió a cuantificar el pigmento cada 24 horas.

La degradación de la ficocianina, dependiente de la intensidad de luz, se determinó de acuerdo con la ecuación exponencial de primer orden (7) (Kannaujiya y Sinha, 2016), para generar una tasa de degradación ( $\text{h}^{-1}$ ):

$$C = C_0 e^{-kt} \quad (7)$$

Esta ecuación puede simplificarse como:

$$K = \frac{-\ln\left(\frac{C}{C_0}\right)}{t} \quad (8)$$

donde C es la concentración después de cualquier tiempo  $t$ ,  $C_0$  es la concentración inicial y  $k$  es la tasa de degradación ( $\text{h}^{-1}$ ).

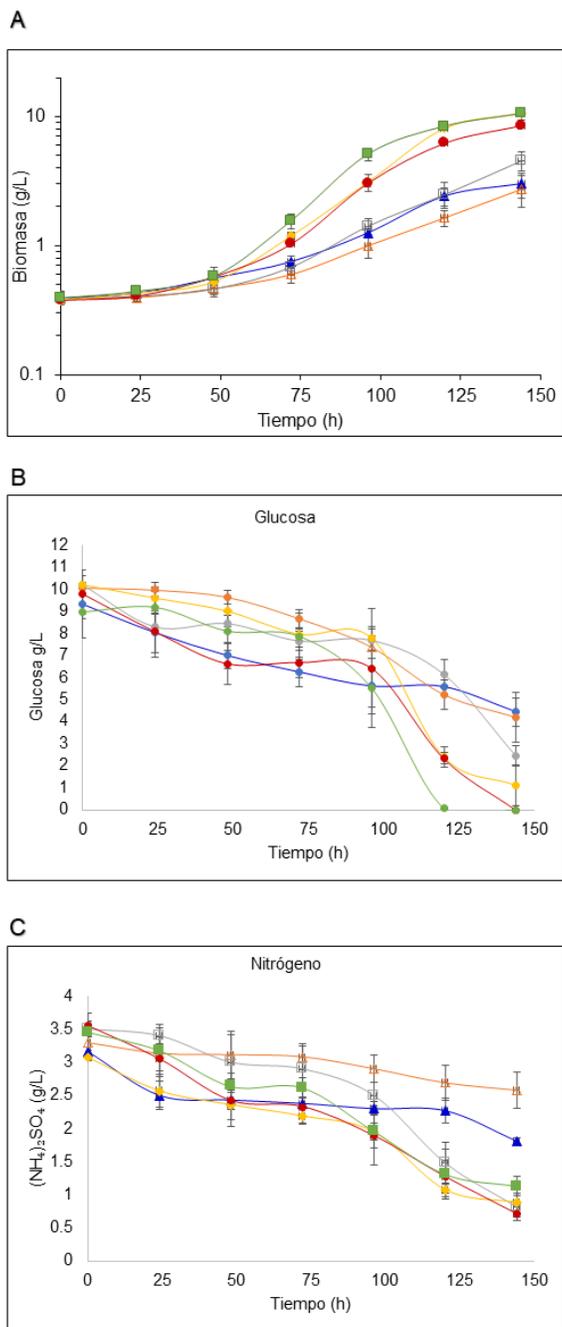
La estabilidad de la ficocianina también se evaluó utilizando la ecuación de vida media (9), donde la concentración inicial de la muestra se reduce a la mitad después de cierto tiempo de exposición:

$$\frac{t_1}{2} = \frac{0.693}{k} \quad (9)$$

## 7. Resultados

El crecimiento de microalgas depende de varios factores abióticos, como la temperatura, el nivel de nutrientes y la luz disponible. Entre estos factores, la luz influye directamente en el mecanismo de la fotosíntesis siendo un factor esencial para alcanzar las condiciones óptimas de crecimiento de los cultivos mixotróficos (Maroneze et al., 2019; Gao et al., 2022). En este sentido, la Figura 2 muestra el crecimiento y consumo de los principales sustratos (glucosa y nitrógeno) en las 6 condiciones evaluadas durante 7 días. La Tabla 2 presenta los parámetros cinéticos de crecimiento en los tratamientos evaluados.

▲ Heterotrófico    △ 50    □ 100    ◆ 200    ● 300    ■ 400  
 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$



**Figura 2.** Efectos de la intensidad de luz sobre el crecimiento de *G. sulphuraria* (A), y sobre el consumo de glucosa (B) y sulfato de amonio (C). Las barras de error representan la desviación estándar de la media de tres repeticiones.

Independiente de la condición de luz probada, es posible notar una fase adaptación celular en las primeras 48 h de cultivo, que es seguida de la fase exponencial de crecimiento (Figura 2A). Los mayores crecimientos fueron obtenidos en las intensidades de luz más altas (200, 300 y 400  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ), en donde las máximas densidades celulares fueron de aproximadamente 10.6, 9.18, y 10.5 g/L, respectivamente, sin diferencia significativa en las tres condiciones. Los crecimientos más bajos fueron observados en 50  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  (3.02 g/L) y en 0  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  (en heterotrofia: 2.9 g/L), sin diferencia significativa entre las condiciones de 50  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  de luz y sin iluminación.

Como consecuencia la intensidad de luz también afectó el consumo de sustratos, observando que mayores consumos fueron observados en las condiciones de mayores crecimientos. Con relación a la glucosa (Figura 2B), es posible verificar un agotamiento de ese sustrato en los cultivos con intensidades de 300 y 400  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ . Por otro lado, en ninguna condición hubo un agotamiento de la fuente de nitrógeno (Figura 2C) a los 5 días de cultivo, lo que es una consecuencia de la relación carbono/nitrógeno elegido (C/N=5), con base en estudios realizado previamente en el laboratorio (datos aún no publicados).

Al comparar los resultados obtenidos en este estudio con los reportados de Sloth et al (2005), donde utilizaron *G. sulphuraria* 074G se obtuvo la mayor concentración de biomasa (0.9 g/L) en los cultivos bajo la intensidad de luz entre 65-128  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , mientras que en este trabajo se observa que la mayor concentración de biomasa, utilizando *G. sulphuraria* CCMEE5587.1 fue en los 200  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  (10.65 g/L). Cabe mencionar que en el estudio de Sloth (2005) se utilizaron matraces cónicos de 500 ml que contenían 100 mL de cultivo, 5 g/L de glucosa, fructuosa o glicerol, pH 2 y 42 °C; mientras que en el presente trabajo las condiciones usadas fueron un poco diferentes: matraces cónicos de 500 ml, con 300 mL de cultivo, 10 g/L de glucosa, pH 2 y 42 °C.

En los cultivos mixotróficos de microalgas, al igual que en los cultivos fotoautótrofos, la luz desempeña un papel fundamental en el proceso de

fotosíntesis, sin embargo, los requisitos de luz (intensidad y duración) diferirán entre especie e incluso cepas (Castillo et al., 2021).

Tabla 2. Parámetros cinéticos de crecimiento de *G. sulphuraria* bajo las diferentes condiciones de cultivo. Diferentes letras dentro de una misma columna expresan diferencias significativas entre las medias ( $P < 0,05$ ).

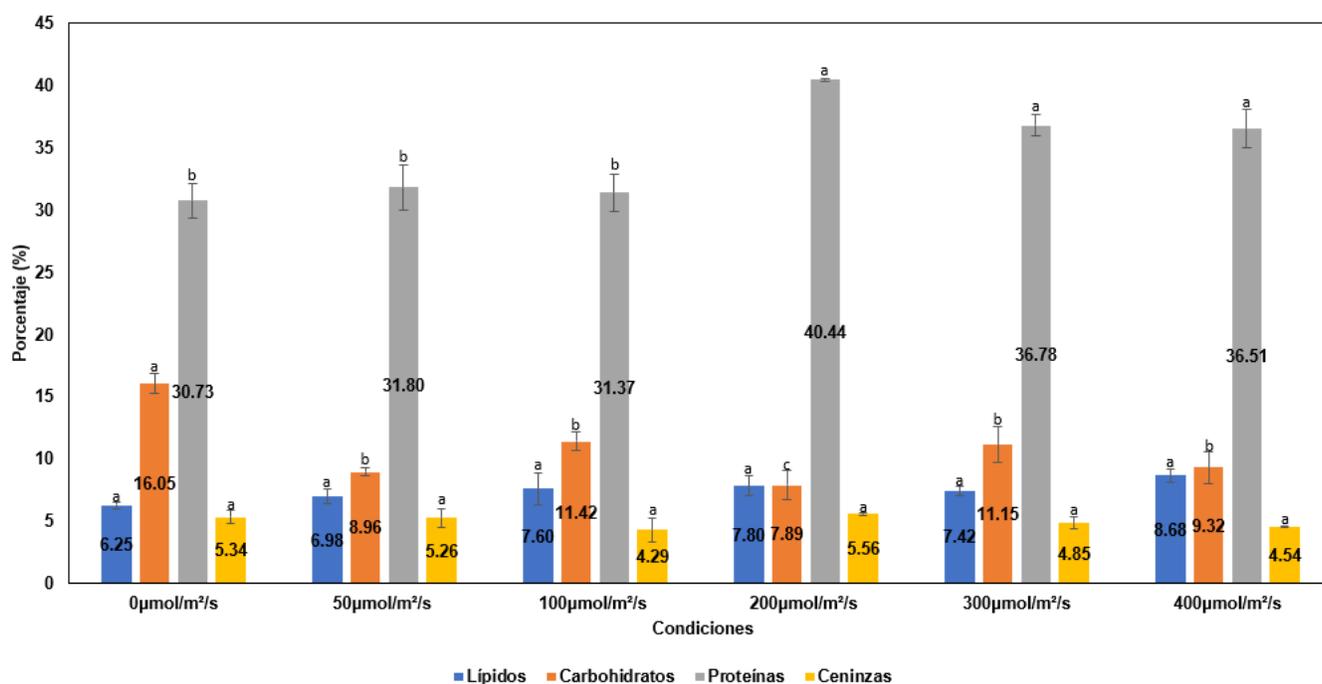
Condición 0 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$	$X_{\text{máx}}$ (g/L)	$\mu_{\text{máx}}$ ( $\text{d}^{-1}$ )	$P_x$ (g/L.d)	tg (d)	Y(g/g)	$r\text{CO}_2$
0	2.99 $\pm$ 0.65 <sup>c</sup>	0.384 $\pm$ 0.000 <sup>e</sup>	0.43 $\pm$ 0.022 <sup>b</sup>	1.80 $\pm$ 0.000 <sup>a</sup>	0.573 $\pm$ 0.022 <sup>b</sup>	0 $\pm$ 0.000 <sup>d</sup>
50	3.02 $\pm$ 0.57 <sup>c</sup>	0.408 $\pm$ 0.0033 <sup>e</sup>	0.44 $\pm$ 0.020 <sup>b</sup>	1.70 $\pm$ 0.141 <sup>a</sup>	0.470 $\pm$ 0.016 <sup>b</sup>	0.018 $\pm$ 0.003 <sup>c</sup>
100	4.94 $\pm$ 1.30 <sup>b</sup>	0.507 $\pm$ 0.047 <sup>d</sup>	0.75 $\pm$ 0.036 <sup>b</sup>	1.37 $\pm$ 0.0.125 <sup>b</sup>	0.553 $\pm$ 0.018 <sup>b</sup>	0.601 $\pm$ 0.001 <sup>b</sup>
200	10.65 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>	0.76 $\pm$ 0.0038 <sup>c</sup>	1.715 $\pm$ 0.055 <sup>a</sup>	0.90 $\pm$ 0.072 <sup>c</sup>	1.121 $\pm$ 0.077 <sup>a</sup>	2.410 $\pm$ 0.012 <sup>a</sup>
300	9.18 $\pm$ 1.22 <sup>a</sup>	0.72 $\pm$ 0.0036 <sup>b</sup>	1.47 $\pm$ 0.047 <sup>a</sup>	0.98 $\pm$ 0.078 <sup>d</sup>	0.974 $\pm$ 0.043 <sup>a</sup>	2.055 $\pm$ 0.008 <sup>a</sup>
400	10.49 $\pm$ 1.08 <sup>a</sup>	0.80 $\pm$ 0.0042 <sup>a</sup>	1.68 $\pm$ 0.035 <sup>a</sup>	0.86 $\pm$ 0.069 <sup>c</sup>	1.128 $\pm$ 0.026 <sup>a</sup>	2.349 $\pm$ 0.020 <sup>a</sup>

A partir de la Tabla 2 se puede observar que la microalga *G. sulphuraria* presenta una respuesta a diferentes intensidades de luz similar a lo discutido en la sección 2.3, particularmente en la Figura 2. Se observa que entre 0 y 50  $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$  no hubo una diferencia significativa en los parámetros cinéticos de crecimiento, lo que puede estar asociado con la condición de fotolimitación que ocurre cuando no hay suficiente luz para mantener el metabolismo, por lo cual estos cultivos se ven afectados (Maroneze et al., 2019). Entre 50 y 200  $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$  el aumento en el crecimiento es proporcional al aumento en la intensidad de luz, y en intensidades entre 200 y 400  $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$  no hay un aumento en las velocidades de crecimientos y no presenta diferencia estadística entre dichas condiciones. Eso indica que la irradiancia de compensación de ese microorganismo, en esas condiciones es alrededor de 50  $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$  y el punto de saturación es alrededor de 200  $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$  (Lehmuskero et al., 2018). Aunque no verificamos un aumento en el comportamiento de los cultivos a intensidades más altas, no fue observada una fotoinhibición o fotooxidación, ya que en este rango se obtuvieron los mayores valores de velocidad específica de crecimiento, productividad, rendimiento de biomasa con respecto a

glucosa y tasa de fijación de carbono y menores tiempos de duplicación (Metsoviti et al., 2019).

En la Tabla 2 también es posible observar que los valores de rendimiento de biomasa con respecto a glucosa y tasa de fijación de carbono aumentan con el incremento en la intensidad de luz, lo cual indica que tiene un efecto positivo en la sinergia la fotosíntesis y la respiración en mixotrofia.

Los cambios en la cantidad de luz pueden inducir cambios en el metabolismo y en la morfología de microalgas y en consecuencia en su composición bioquímica (Maroneze et al., 2016). La Figura 3 presenta los resultados del efecto de las diferentes intensidades de luz evaluadas sobre la composición bioquímica de la biomasa microalgal.



**Figura 3.** Composición bioquímica de *G. sulphuraria* CCMEE5587.1 bajo diferentes intensidades de luz. Diferentes letras, expresan diferencias significativas entre las medias ( $P < 0,05$ ).

Los resultados mostraron que intensidades de luz mayores favorecieron la acumulación de proteínas y el mayor contenido de proteínas (40.44%) fue obtenido a 200 μmol/m²/s, pero sin diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) entre 300 y 400

$\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , con valores de 36.78% y 36.51%, respectivamente. Por otro lado, el contenido más bajo fue obtenido en el cultivo heterotrófico, que presentó un 30.73%, de igual forma, sin diferencia estadística entre 50  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  (31.80%) y 100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  (31.37%). Metsoviti reporta que las proteínas son elementos fundamentales en las células de las microalgas, cumpliendo funciones esenciales tanto a nivel estructural como metabólico. Esto hace que el contenido proteico de las algas pueda ser más resistente a las variaciones en la intensidad de la luz. Así mismo en este estudio podemos observar que el contenido de proteínas se favoreció con el aumento de la luz.

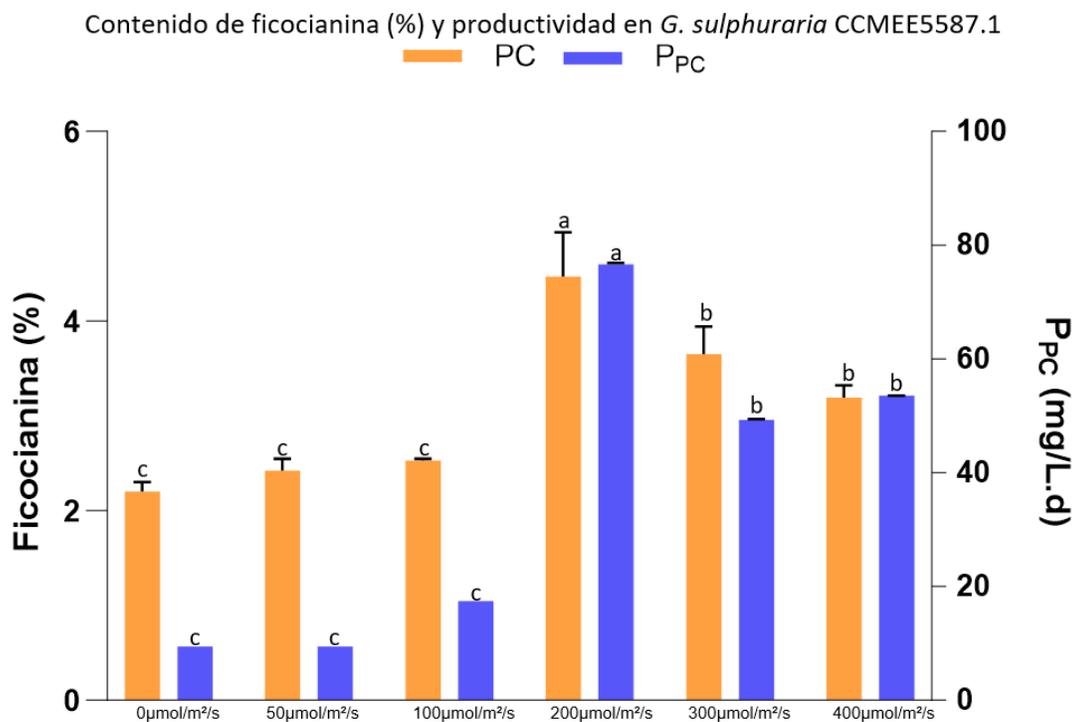
Con relación al contenido de lípidos, se encontraron valores entre 6.25 y 8.68% en todas las condiciones evaluadas. Aunque no exista una diferencia significativa entre los seis tratamientos, se puede observar un ligero aumento en el contenido de lípidos conforme aumenta la intensidad de luz. En el estudio de Maltsev et al., 2021, se informa que si existe un aumento en la intensidad de luz provocará cambios en los procesos metabólicos, además se muestra que la luz intensa conduce a una mayor síntesis de lípidos, esto puede ser un medio para transformar el exceso de luz en energía química para evitar el daño fotooxidativo. El porcentaje obtenido en este trabajo corrobora con lo reportado Banihashemi et al. (2023) que encontró un 5,88% de los lípidos con cultivos autótrofos de *G. sulphuraria* (CCMEE 5587.1) y la clasifica como una microalga baja en lípidos. Otros autores encontraron valores aún más bajos en condiciones mixotróficas (3.8%) y heterótrofas (1.14-3.6%) (Graziani et al., 2013; López et al., 2019).

La acumulación de carbohidratos fue indirectamente proporcional a la acumulación de proteínas y lípidos. Los mayores valores fueron encontrados bajo la condición de heterotrofia (16.06%), con diferencia significativa a las demás condiciones, mientras que los menores se encontraron en 200  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  (7.89%), donde existe una diferencia significativa respecto a 50, 100, 300 y 400  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ .

En el estudio de Nzayisenga et al., 2020 reporta que, si el contenido de lípidos aumenta, debería haber reducciones correspondientes en el contenido de carbohidratos, proteínas o ambos. En este trabajo existe un comportamiento similar,

pues el contenido de carbohidratos, aunque disminuyó de manera indirectamente proporcional, se observa que en el cultivo heterotrófico tenemos el mayor contenido de carbohidratos, aunque no existe diferencia significativa en 0, 50 y 100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  respecto a proteínas existe un contenido menor en heterotrofia. Así mismo en los lípidos no existiendo diferencia entre los 6 grupos, y se observa una disminución en heterotrofia. Por otro lado, a 200  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  se obtiene la menor cantidad obtenida de carbohidratos, pero se tiene el mayor contenido de proteínas y un ligero aumento de lípidos. Las cenizas no se vieron afectadas por las condiciones usadas, manteniendo su concentración alrededor de 5%, sin diferencia significativa entre los tratamientos.

La Figura 4 muestra los efectos de las condiciones de cultivo evaluadas sobre la producción de ficocianina por *G. sulphuraria*. Ese pigmento es un metabolito intracelular de las microalgas, por lo que su productividad es producto del contenido de ficocianina y la productividad de la biomasa. En este sentido, para una comparación justa, también se evaluó la productividad de ficocianina (Figura 4).



**Figura 4.** Contenido y productividad de ficocianina (P<sub>PC</sub>) de *G. sulphuraria* CCME5587.1 biomasa liofilizada cultivada bajo diferentes intensidades de luz. Diferentes letras, expresan diferencias significativas entre las medias (P < 0,05).

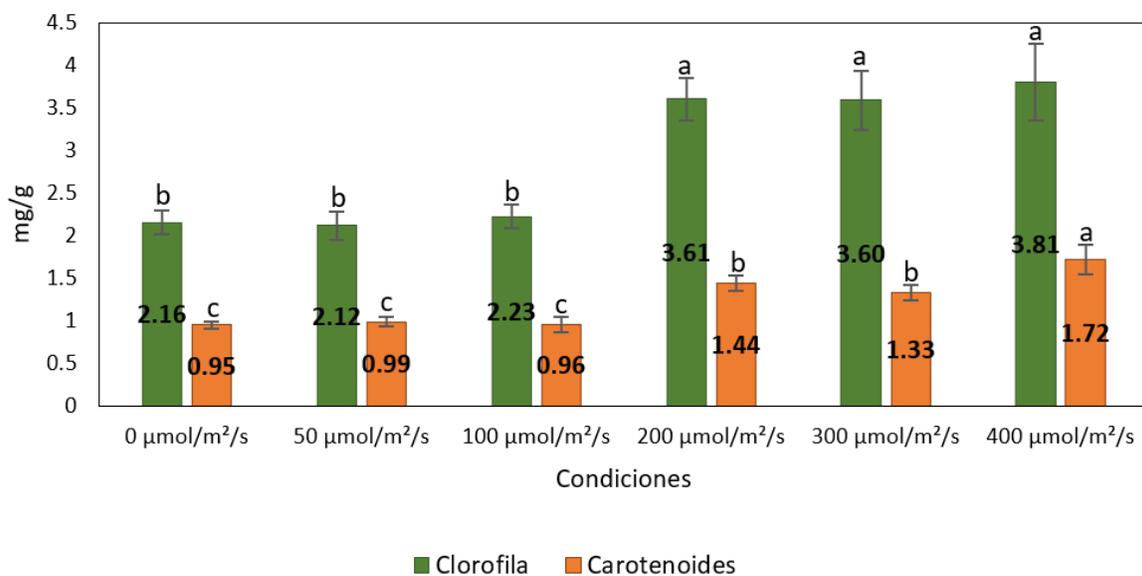
La mejor condición para producción de ficocianina fue a intensidad de iluminación de 200 µmol/m<sup>2</sup>/s, tanto en contenido (4.47%), como en productividad (76.60 mg/L.d). En intensidades de luz más altas hubo una ligera disminución en el contenido (3.65-3.19%) y productividad (49.32-53.52 mg/L.d) de ficocianina, encontrando que no existe diferencia significativa entre 300 y 400 µmol/m<sup>2</sup>/s. En las intensidades más bajas (0, 50, 100 µmol/m<sup>2</sup>/s) fueron encontrados los menores valores de producción de ficocianina.

En el trabajo de Sloth (2005), se reporta que el mayor contenido de ficocianina se encontró a 65 µmol/m<sup>2</sup>/s, obteniendo una cantidad de 28 mg/g, lo que corresponde a un 2.8% de contenido específico, mientras que en este estudio el mayor contenido obtenido fue de 4.46% en 200 µmol/m<sup>2</sup>/s. La cantidad obtenida de este pigmento varía entre diferentes cepas.

Como se describió en la introducción, los complejos captadores de luz están compuestos por pigmentos fotosensibles, como las clorofilas que son pigmentos esenciales que desempeñan un papel central en la fotosíntesis oxigénica, mientras que las ficobilinas y los carotenoides actúan como pigmentos accesorios (Ramanna et al., 2017). Entonces cuando la intensidad lumínica supera al límite superior en las células de algas, se produce daño en el complejo PS II, lo que resulta en un fenómeno de fotoinhibición y una reducción en los bioproductos, al igual que niveles de luz demasiado bajos limitarán el crecimiento y la acumulación de bioproductos en las microalgas (González et al., 2019; Wang et al., 2014). Este fenómeno se observa en las intensidades superiores a  $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  podemos observar una reducción de la ficocianina, además de que en las intensidades por debajo de  $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  observamos poca acumulación de pigmento.

En la Figura 5 se observan los efectos de las condiciones de cultivo evaluadas sobre el contenido de clorofila a y carotenoides. A partir de esos datos se puede observar que el contenido de clorofila varió entre 2.16 a 3.81 mg/g, y los menores valores fueron encontrados en las condiciones 0, 50 y  $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , sin diferencia significativa. Mientras que se obtuvo mayor cantidad de clorofila en la biomasa cultivada en intensidad de luz alta, sin diferencia significativa en las condiciones para 200, 300 y  $400 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ .

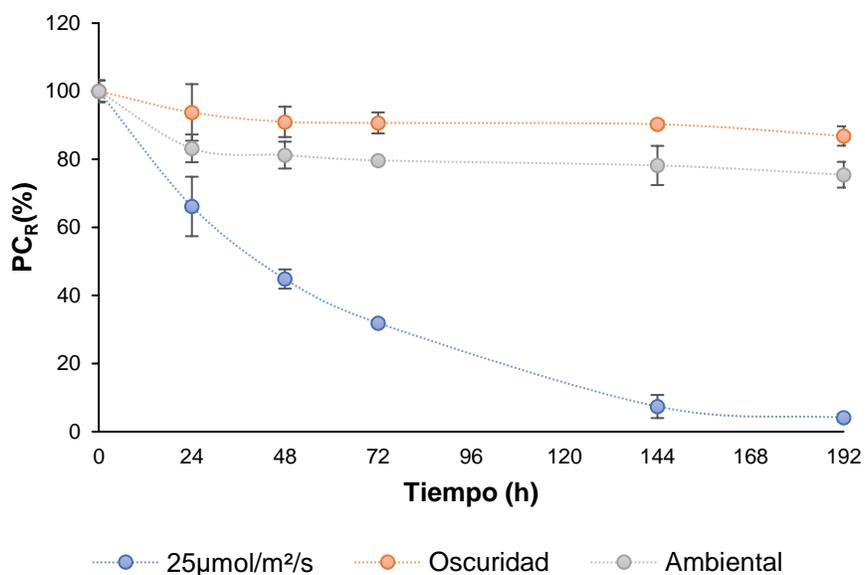
En cuanto a los carotenoides totales, el contenido fue alrededor de 1.8 veces mayor bajo 400  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , que en intensidades de luz más bajas (0-100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ) (Figura 6). Los carotenoides en los organismos fotosintéticos están asociados con el complejo de captación de luz de la fotosíntesis y son conocidos por sus características fotoprotectoras (Castillo et al, 2021), desempeñan un papel importante al ofrecer una protección efectiva contra la luz al disipar el exceso de energía lumínica (Romanna et al., 2017), por lo cual los carotenoides aumentan conforme aumenta la intensidad.



**Figura 5.** Contenido de clorofila a y carotenoides en *G. sulphuraria* CCMEE 5587.1 bajo diferentes intensidades de luz. Diferentes letras expresan diferencias significativas entre las medias ( $P < 0,05$ ).

Se sabe que la ficocianina es inestable en presencia de luz y la tasa de degradación depende de la cantidad de luz emitida (Yuan et al., 2022). Por tal motivo, se evaluó la estabilidad de la ficocianina producida bajo tres diferentes condiciones de luz: oscuridad, en incubadora a intensidad controlada de 25  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  y bajo iluminación ambiental en el laboratorio de estudio (aproximadamente 200 lux y fotoperíodo de 12 h). El comportamiento de la ficocianina relativa bajo las diferentes condiciones fue evaluado por 192 h y los

resultados son mostrados en la Figura 5. Los valores para la ecuación del modelo de degradación se presentan en la Tabla 3.



**Figura 6.** Estabilidad de la ficocianina bajo iluminación ambiental, a 25  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  y en oscuridad.

**Tabla 3.** Valores de los parámetros del modelo de degradación de ficocianina bajo diferentes condiciones de iluminación.

Condición	$k$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$R^2$	$t_{1/2}$ (h)
25 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	0.0171	0.991	40.5
Oscuridad	0.0005	0.721	1386.3
Ambiental	0.001	0.603	693.1

Es posible observar que la concentración relativa de ficocianina expuesta a 25  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  fue decayendo durante los días de exposición a la luz, llegando a un valor próximo a cero a las 144 h (Figura 5). Que, de forma relevante, la concentración de ficocianina relativa se mantuvo estable bajo oscuridad y a luz ambiental. En términos cinéticos, en oscuridad a temperatura ambiente se puede verificar que la velocidad de degradación ( $k$ ) es la más baja ( $0.0005 \text{ h}^{-1}$ ), resultando en una vida media de 1386 h (una vida media de aproximadamente de 60 días). La exposición a la luz

ambiental resultó en un incremento en la velocidad de degradación de la proteína y, consecuentemente una disminución en la vida media (693 h; ~ 29 días). Finalmente, a una intensidad de 25  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  la velocidad de degradación fue de 0.0171  $\text{h}^{-1}$ , presentando una vida media de 40.5 h (1.7 días).

## 8. Conclusiones

La intensidad de luz demostró ser un factor crucial para el crecimiento y metabolismo de la microalga extremófila *G. sulphuraria* CCMEE 5587.1. En este estudio pudimos determinar los puntos de compensación y saturación de la luz en los cultivos mixotróficos de esta microalga. Nuestros resultados mostraron que, para la cepa y condiciones evaluadas, la mejor intensidad de luz fue de 200  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , condición en donde se obtuvieron los mejores parámetros cinéticos y también mayores contenidos de proteínas, especialmente ficocianina. En esa condición se logró incrementar la productividad de ficocianina en más de 8 veces con relación a heterotrofia y en 8 veces con relación a condiciones previamente optimizadas en nuestro laboratorio.

## 9. Referencias bibliográficas

- Acién Fernández, F. G., Fernández-Sevilla, J., Llamas Moya, B., & Molina Grima, E. (2020). Microalgae production systems. En E. Jacob-Lopes, M. Manzoni Maroneze, M. Queiroz, & L. Queiroz Zepka, *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products* (págs. 127-158). Academic Press.
- Acién, F., Molina, E., Reis, A., Torzillo, G., Zittelli, G., Sepúlveda, C., & Masojídek, J. (2018). 1 - Photobioreactors for the production of microalgae. En C. González-Fernández, & R. Muñoz, *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts* (págs. 1-144). Woodhead Publishing.
- Andersen, R. A. (2014). The Microalgal Cell. En A. Richmond, & Q. Hu, *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology* (págs. 3-19). New Delhi: Wiley Blackwell.
- Arora, N., & Philippidis, G. P. (2021). Insights into the physiology of *Chlorella vulgaris* cultivated in sweet sorghum bagasse hydrolysate for sustainable algal biomass and lipid production. *Scientific Reports*, 1-14.
- Banihashemi, F., Ibrahim, A., Deng, S., & Lin, J. (2023). Pyrolysis and Gasification Characteristics of *Galdieria sulphuraria* Microalgae. *BioEnergy Research*, 611-621.
- Bennett, A., & Bogorad, L. (1973). COMPLEMENTARY CHROMATIC ADAPTATION IN A FILAMENTOUS BLUE-GREEN ALGA. *Journal of Cell Biology*, 58(2), 419-435.
- Bernaerts, T. M., Gheysen, L., Foubert, I., Hendrickx, M. E., & Van Loey, A. M. (2019). The potential of microalgae and their biopolymers as structuring ingredients in food: A review. *Biotechnology Advances*, 1-22.
- Bhattacharya, M., & Goswami, S. (2020). Microalgae – A green multi-product biorefinery for future industrial prospects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1-14.
- Bligh, E., & Dyer, W. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*.
- Borowitzka, M. A. (2018). Biology of Microalgae. En I. A. Levine, & J. Fleurence, *Microalgae in Health and Disease Prevention* (págs. 23-59). Kidlington: Academic Press.
- Castillo, T., Ramos, D., García Beltrán, T., Brito Bazán, M., & Galindo, E. (2021). Mixotrophic cultivation of microalgae: An alternative to produce high-value metabolites. *Biochemical Engineering Journal*, 176, 1-16.

- Cervantes-Llanos, M., Lagumersindez-Denis, N., Marín-Prida, J., Pavón-Fuentes, N., Falcon-Cama, V., Piniella-Matamoros, B., . . . Pentón-Rol, G. (2018). Beneficial effects of oral administration of C-Phycocyanin and Phycocyanobilin in rodent models of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Life Sciences*, 130-138.
- Chakravarty, S., & Mallick, N. (2022). Carbon dioxide mitigation and biodiesel production by a marine microalga under mixotrophic mode by using transesterification by-product crude glycerol: A synergy of biofuels and waste valorization. *Environmental Technology & Innovation*, 27, 102441.
- Chew, K. W., Yap, J. Y., Show, P. L., Suan, N. H., Juan, J. C., Ling, T. C., . . . Chang, J.-S. (2017). Microalgae biorefinery: High value products perspectives. *Bioresource Technology*, 53-62.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25, 294-306.
- Coates, R. C., Trentacoste, E., & Gerwick, W. H. (2013). Bioactive and Novel Chemicals from Microalgae Applied Phycology and Biotechnology. En A. Richmond, & Q. Hu, *Handbook of Microalgal Culture* (págs. 504-531). United Kingdom: Willey Blackwell.
- Debnath, C., Bandyopadhyay, T., Bhunia, B., Mishra, U., Narayanasamy, S., & Muthuraj, M. (2021). Microalgae: Sustainable resource of carbohydrates in third-generation biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 150, 1-21.
- Du, Y., Wang, J., Li, H., Mao, S., Wang, D., Xiang, Z., . . . Chen, J. (2018). The dual function of the algal treatment: Antibiotic elimination combined with CO<sub>2</sub> fixation. *Chemosphere*, 192-201.
- Falkowski, P. G., & Raven, J. (2007). *Aquatic Photosynthesis: Second Edition*. Princeton University Press: STU-Student edition.
- Ford, T. (1979). Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase from the thermophilic, acidophilic alga, *Cyanidium caldarium* (Geitler). Purification, characterisation and thermostability of the enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 239-248.
- Gao, F., Yang, H.-L., Li, C., Peng, Y.-Y., Lu, M.-M., Jin, W.-H., . . . Guo, Y.-M. (2019). Effect of organic carbon to nitrogen ratio in wastewater on growth, nutrient uptake and lipid accumulation of a mixotrophic microalgae *Chlorella* sp. *Bioresource technology*, 282, 118-124.
- Gao, P., Guo, L., Gao, M., Zhao, Y., Jin, C., & She, Z. (2022). Regulation of carbon source metabolism in mixotrophic microalgae cultivation in response to light intensity variation. *Journal of Environmental Management*, 302.

- Garcia-Vaquero, M. (2020). Chapter 8 - Food applications. En C. M. Galanakis, *Microalgae Cultivation, Recovery of Compounds and Applications* (págs. 207-238). Chania: Academic Press.
- González-Camejo, J., Viruela, A., Ruano, M., Barat, R., Seco, A., & Ferrer, J. (2019). Effect of light intensity, light duration and photoperiods in the performance of an outdoor photobioreactor for urban wastewater treatment. *Algal Research*, *40*, 104-143.
- González-Camejo, J., Viruela, A., M.V., R., Seco, A., & Ferrer, J. (2019). Effect of light intensity, light duration and photoperiods in the performance of an outdoor photobioreactor for urban wastewater treatment. *Algal Research*, *40*.
- Graziani, G., Schiavo, S., Nicolai, M., Buono, S., Fogliano, V., Pinto, G., & Pollio, A. (2013). Microalgae as human food: chemical and nutritional characteristics of the thermo-acidophilic microalga *Galdieria sulphuraria*. *Royal Society of Chemistry*, *4*, 144-152.
- Gross, W., & Schnarrenberger, C. (1995). Heterotrophic Growth of Two Strains of the Acido-Thermophilic Red Alga *Galdieria sulphuraria*. *Plant and Cell Physiology*, 633-638.
- Hernández-López, J., & Vargas-Albores, F. (2003). A microplate technique to quantify nutrients (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) in seawater. *Wiley Online Library*, *34*, 1201-1204.
- Hsieh-Lo, M., Castillo, G., Ochoa-Becerra, M. A., & Mojica, L. (26 de 06 de 2019). Phycocyanin and phycoerythrin: Strategies to improve production yield and chemical stability. Zapopan, Jalisco, México.
- Jacob-Lopes, E., Manzoni Maroneze, M., Deprá, M. C., Sartori, R. B., Dias, R. R., & Zepka, L. Q. (2019). Bioactive food compounds from microalgae: an innovative framework on industrial biorefineries. *Current Opinion in Food Science*, 1-7.
- Jaeschke, D. P., Rocha Teixeira, I., Ferreira Marczak, L. D., & Mercali, G. D. (2021). Phycocyanin from *Spirulina*: A review of extraction methods and stability. *Food Research International*, 1-12.
- Kannaujiya, V., & Sinha, R. (2016). Thermokinetic stability of phycocyanin and phycoerythrin in food-grade preservatives. *Journal of Applied Phycology*, *28*, 1063-1070.
- Kitaya, Y., Xiao, L., Ozawa, T., Tsuda, M., & Omasa, K. (2008). Effects of temperature, photosynthetic photon flux density, photoperiod and O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> concentrations on growth rates of the symbiotic dinoflagellate, *Amphidinium* sp. En M. A. Borowitzka, A. T. Critchley, S. Kraan, A. Peters, K.

- Sjøtun, & M. Notoya, *Nineteenth International Seaweed Symposium* (págs. 287-292). Dordrecht: Springer.
- Lehmuskero, A., Skogen Chauton, M., & Boström, T. (2018). Light and photosynthetic microalgae: A review of cellular- and molecular-scale optical processes. *Progress in Oceanography*, 168, 43-56.
- Li, J., Wei, J., Liu, H., Wan, J., Huang, T., Wang, H., . . . Ma, H. (2023). Polarization fingerprint for microalgae classification. *Optics and Lasers in Engineering*, 107567.
- Li, T., Zheng, Y., Yu, L., & Chen, S. (2014). Mixotrophic cultivation of a *Chlorella sorokiniana* strain for enhanced biomass and lipid production. *Biomass and Bioenergy*, 66, 204-213.
- Liu, L., Sanchez-Arcos, C., Pohnert, G., & Wei, D. (2021). Untargeted Metabolomics Unveil Changes in Autotrophic. *International Journal of Molecular Sciences*, 1-18.
- López, G., Yate, C., Ramos, F. A., Cala, M. P., Restrepo, S., & Baena, S. (2019). Production of Polyunsaturated Fatty Acids and Lipids from Autotrophic, Mixotrophic and Heterotrophic cultivation of *Galdieria* sp. strain USBA-GBX-832. 1-13.
- López-García, P., Eme, L., & Moreira, D. (2017). Symbiosis in eukaryotic evolution. *Journal of Theoretical Biology*, 434, 20-33.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Lewis Farr, A., & Randall, R. J. (1951). PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Maltsev, Y., Maltseva, K., Kulikovskiy, M., & Maltseva, S. (2021). Influence of Light Conditions on Microalgae Growth and Content of Lipids, Carotenoids, and Fatty Acid Composition. *Biology (Basel)*, 10.
- Manzoni Maroneze, M. (27 de 07 de 2020). Cultivos hetero y mixotróficos de *Galdieria sulphuraria* con glucosa y glicerol para la producción de lípidos y ficocianina. Cuernavaca, Morelos, México.
- Manzoni Maroneze, M., Fortes Siqueira, S., Vendruscolo, R. G., Wagner, R., Ragagnin de Menezes, C., Queiroz Zepka, L., & Jacob-Lopes, E. (2016). The role of photoperiods on photobioreactors – A potential strategy to reduce costs. *Bioresource Technology*, 493-499.
- Manzoni Maroneze, M., Montenegro Herrera, C. A., & Martínez Jiménez, A. (2021). Perspectivas sobre los sistemas de cultivo de microalgas: *Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C.*, 11-34.

- Manzoni Maroneze, M., Queiroz Zepka, L., Jacob Lopes, E., Pérez-Gálvez, A., & Roca, M. (2019). *Chlorophyll Oxidative Metabolism During the Phototrophic and Heterotrophic Growth of Scenedesmus obliquus*.
- Marchello, A. E., Oliveira, N. L., Lombardi, A. T., & Polpo, A. (2018). An investigation onto Cd toxicity to freshwater microalga *Chlorella sorokiniana* in mixotrophy and photoautotrophy: A Bayesian approach. *Chemosphere*, 794-803.
- Masojídek, J., Torzillo, G., & Koblížek, M. (2013). Photosynthesis in Microalgae. En A. Richmond, Prof. Emeritus, & Q. Hu, *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology, Second Edition* (págs. 21-36).
- Massa, M., Buono, S., Langellotti, A. L., Martello, A., Russo, G. L., Troise, D. A., . . . Fogliano, V. (2019). Biochemical composition and in vitro digestibility of *Galdieria sulphuraria* grown on spent cherry-brine liquid. 9-15.
- Metsoviti, M., Papapolymerou, G., Karapanagiotidis, I., & Katsoulas, N. (2019). Effect of Light Intensity and Quality on Growth Rate and Composition of *Chlorella vulgaris*. *Plants*, 1-17.
- Mimouni, V., Couzinet-Mossion, A., Ulmann, L., & Wielgosz-Collin, G. (2018). Chapter 5 - Lipids From Microalgae. En I. A. Levine, & J. Fleurence, *Microalgae in Health and Disease Prevention* (págs. 109-131). Academic Press.
- Modeste, V., Brient, A., Thirion-Delalande, C., Forster, R., Aguenou, C., Griffiths, H., & Cagnac, O. (2019). Safety evaluation of *Galdieria* high-protein microalgal biomass. *SAGE Journals Home*.
- Montenegro-Herrera, C. A., López Portillo, F. V., Hernández Chávez, G. T., & Martínez, A. (2022). Single-cell protein production potential with the extremophilic red microalgae *Galdieria sulphuraria*: growth and biochemical characterization. *Journal of Applied Phycology*, 1341-1352.
- Montenegro-Herrera, C.A. (2022). Caracterización bioquímica de la microalga extremófila *Galdieria sulphuraria* y estudio de la acumulación de poliglucanos bajo diferentes condiciones de cultivo. Instituto de Biotecnología, Doctorado en bioquímicas, UNAM.
- Moraes, C., Sala, L., Cerveira, G., & Kalil, S. (2011). C-PHYCOCYANIN EXTRACTION FROM *Spirulina platensis* WET BIOMASS. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28(1), 45-49.
- Morançais, M., Mouget, J.-L., & Dumay, J. (2018). Chapter 7 - Proteins and Pigments. En J. Fleurence, & I. A. Levine, *Microalgae in Health and Disease Prevention* (págs. 109-131).

- Morançais, M., Mouget, J.-L., & Dumay, J. (2018). Microalgae in Health and Disease Prevention. En I. A. Levine, & J. Fleurence, *Microalgae in Health and Disease Prevention* (págs. 145-175). United Kingdom: Academic Press.
- Moreira, J., Vaz, B., Cardias, B., Cruz, C., Araujo de Almeida, A., Vieira Costa, J., & de Moraes, M. (2022). Microalgae Polysaccharides: An Alternative Source for Food Production and Sustainable Agriculture. *Polysaccharides*, 3, 441-457.
- Nzayisenga, J., Farge, X., Groll, S., & Sellstedt, A. (2020). Effects of light intensity on growth and lipid production in microalgae grown in wastewater. *Biotechnol Biofuels*, 1-8.
- Pérez García, O., Escalante, F. M., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, 11-36.
- Portillo Vera-López, F., & Martínez Jiménez, A. (2021). Pigmentos en microalgas: funciones, aplicaciones y técnicas de sobreproducción. *Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C.*, 35-51.
- Portillo Vera-López, F., Montenegro Herrera, C. A., Alvarado Colosio, R. A., Martínez Jiménez, A., & Porta Ducoing, H. (2021). Ficocianina y su acumulación en la microalga roja. *Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C.*, 82-95.
- Queiroz, M., Guerra Vieira, J., & Manzoni Maroneze, M. (2020). Chapter 2 Morphophysiological, structural, and metabolic aspects of microalgae. En E. Jacob-Lopes, M. Manzoni Maroneze, M. I. Queiroz, & L. Queiroz Zepka, *Handbook of Microalgae-Based Processes and Products* (págs. 25-48). Academic Press.
- Quero-Jiménez, P., Montenegro, O., Sosa, R., de la Torre, J., Valero Acosta, J., López Pérez, D., . . . Broche-Hernández, N. (2019). Total carbohydrates concentration evaluation in products of microbial origin. *Journal of Chemical Engineering Theoretical and Applied Chemistry*, 78, 195-203.
- Ramanna, L., Rawat, I., & Bux, F. (2017). Light enhancement strategies improve microalgal biomass productivity. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 765-773.
- Ravindran, R., & Rajauria, G. (2021). Chapter 5 - Carbohydrates derived from microalgae in the food industry Current and Potential Applications. En T. Lafarga, & G. Acién, *Cultured Microalgae for the Food Industry* (págs. 127-146). Dublin: Academic Press.
- Rebolledo-Oyarce, J., Sáez-Navarrete, C., & Rodríguez-Cordova, L. (2021). Chapter 3 - Transport phenomena models affecting microalgae growth. En C. M.

Galanakis, *Microalgae Cultivation, Recovery of Compounds and Applications* (págs. 63-90).

- Rossi, S., Casagli, F., Mantovani, M., Mezzanotte, V., & Ficara, E. (2020). Selection of photosynthesis and respiration models to assess the effect of environmental conditions on mixed microalgae consortia grown on wastewater. *Bioresource Technology*, 1-12.
- Sakurai, T., Aoki, M., Ju, X., Ueda, T., Nakamura, Y., Fujiwara, S., . . . Minoda, A. (2016). Profiling of lipid and glycogen accumulations under different growth conditions in the sulfothermophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Bioresource Technology*, 861-866.
- Severo, I. A., Sartori, R., Maroneze, M., Dias, R., Zepka, L., & Jacob-Lopes, E. (2021). Technological bottlenecks in establishing microalgal biorefineries. En A. Shekh, P. Schenk, & R. Sarada, *Microalgal Biotechnology* (págs. 118-134). Royal Society of Chemistry.
- Slocombe, S., Ross, M., Thomas, N., McNeill, S., & Stanley, M. (2013). A rapid and general method for measurement of protein in micro-algal biomass. *Bioresource Technology*, 129, 51-57.
- Sloth, J., Wiebe, M., & Eriksen, N. (2006). Accumulation of phycocyanin in heterotrophic and mixotrophic cultures of the acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Enzyme and Microbial Technology*, 168-175.
- Song, M., & Pei, H. (2018). The growth and lipid accumulation of *Scenedesmus quadricauda* during batch mixotrophic/heterotrophic cultivation using xylose as a carbon source. *Bioresource Technology*, 263, 525-531.
- Srivastava, A., Kalwani, M., Chakdar, H., Pabbi, S., & Shukla, P. (2022). Biosynthesis and biotechnological interventions for commercial production of microalgal pigments: A review. *Bioresource Technology*.
- Sydney, E. B., Schafranskia, K., ValioBarretti, B. R., Novak Sydney, A. C., Fernandes D'ArcZimmerman, J., Cerri, M. L., & Demiate, I. M. (2019). Biomolecules from extremophile microalgae: From genetics to bioprocessing of a new candidate for large-scale production. *Process Biochemistry*, 37-44.
- Tomaselli, L. (2004). The Microalgal Cell. En A. Richmond, *Handbook of Microalgal Culture* (págs. 3-19). Pondicherry: Blackwell Publishing Ltd.
- Vendruscolo, R. G., Facchi, M. M., Manzoni Maroneze, M., Fagundes, M. B., Cichoski, A. J., Queiroz Zepka, L., . . . Wagner, R. (2018). Polar and non-polar intracellular compounds from microalgae: Methods of simultaneous extraction, gas chromatography determination and comparative analysis. *Food Research International*, 204-212.

- Vendruscolo, R., Fernandes, A., Fagundes, M., Zepka, L., de Menezes, C., Jacob-Lopes, E., & Wagner, R. (2021). Development of a new method for simultaneous extraction of chlorophylls and carotenoids from microalgal biomass. *Springer Link*, 33, 1987-1997.
- Vernès, L., Granvillain, P., Chemat, F., & Vian, M. (2015). Phycocyanin from *Arthrospira platensis*. Production, Extraction and Analysis. *Bentham Science Publishers*, 481-491.
- Wan, M., Zhao, H., Guo, J., Yan, L., Zhang, D., Bai, W., & Li, Y. (2021). Comparison of C-phycocyanin from extremophilic *Galdieria sulphuraria* and *Spirulina platensis* on stability and antioxidant capacity. *Algal Research*, 1-9.
- Wan, M., Wang, Z., Zhang, Z., Wang, J., Li, S., Yu, A., & Li, Y. (2016). A novel paradigm for the high-efficient production of phycocyanin from *Galdieria sulphuraria*. *Bioresource Technology*, 272-278.
- Wang, S.-K., Stiles, A., Guo, C., & Liu, C.-Z. (2014). Microalgae cultivation in photobioreactors: An overview of light characteristics. *Wiley Online Library*, 14, 550-559.
- Xie, Y., Khoo, K., Chew, K., Vishno, V. D., Phang, S., Lim, H., . . . Show, P. (2022). Advancement of renewable energy technologies via artificial and microalgae photosynthesis. *Bioresource Technology*, 363, 1-13.
- Yousuf, A. (2020). Chapter 1 - Fundamentals of Microalgae Cultivation. En A. Yousuf, *Microalgae Cultivation for Biofuels Production* (págs. 1-9). Sylhet: Academic Press.
- Yuan, B., Li, Z., Shan, H., Dashnyam, B., Xu, X., McClements, D., . . . Cao, C. (2022). A review of recent strategies to improve the physical stability of phycocyanin. *Current Research in Food Science*, 2329-2337.
- Zhan, J., Rong, J., & Wang, Q. (2017). Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect. *International Journal of Hydrogen Energy*, 8505-8517.
- Zhang, T.-Y., Hu, H.-Y., Wu, Y.-H., Zhuang, L.-L., Xu, X.-Q., Wang, X.-X., & Dao, G.-H. (2016). Promising solutions to solve the bottlenecks in the large-scale cultivation of microalgae for biomass/bioenergy production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 1602-1614.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD  
DE CIENCIAS  
BIOLÓGICAS

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
Licenciatura en Biología, Programa Educativo de Calidad.

Cuernavaca, Mor., 03 de mayo del 2024

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES**

P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **C. MARIELA SAUCEDO REYES**, con el título del trabajo: **EFFECTO DE DIFERENTES CONDICIONES DE ILUMINACIÓN EN EL CRECIMIENTO DE *Galdieria sulphuraria* Y EN LA PRODUCCIÓN DE FICOCIANINA.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación por Tesis Profesional por Etapas como lo marca el artículo 26° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Atentamente  
*Por una humanidad culta*

**JURADO REVISOR**

**FIRMA**

PRESIDENTE: M. EN C. JUDITH GARCÍA RODRÍGUEZ

---

SECRETARIO: DR. ANDRÉS GARCÍA ROMERO

---

VOCAL: DR. ALFREDO MARTÍNEZ JIMÉNEZ

---

SUPLENTE: DR. LUIS CASPETA GUADARRAMA

---

SUPLENTE: DR. CARLOS ALBERTO MONTENEGRO HERRERA

---



Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209, Unidad Biomédica,  
Tel. (777) 329 7047, 329 7000, Ext. 3527 / titulaciones.biologia@uaem.mx

**UAEM**  
RECTORÍA  
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**ANDRES GARCIA ROMERO | Fecha:2024-05-03 10:27:02 | FIRMANTE**

ahZxolXg2F/YyoFusK3sn5V8NgHAH7VN4/y5lcS1SQcrMHU+JqaVGWZKHPZ1KYaVlr395Yk11HYJxrxAnY9ADV+5kuKuSBATJF+mlAneZczACioeD11V4PT/g1TetOmGvkj/FDI QtxX8DYuNDBWVVDL4wSbXJhOoRMTVT9j5mRQUlrcg1u9WofeSw2cgvqOauFCC6TV0OCWF5xVgiFaybZxqZIMhe7U5PQLLEi/gbdN4BKfYcWpPIPRLiAHSX9ckU0NETCXeEhKj GzDC1xehP/MEtA/4iR3NdMmhmOjUs0i4Vlygdo335ncnaq4P5bh9D+WlqCobQc5kmzOsKb+AHQ==

**LUIS CASPETA GUADARRAMA | Fecha:2024-05-03 10:58:10 | FIRMANTE**

hHjchCygG8n+n2jIKDyYrFoJX27y0Ep0vmU0uc/KAdCUi2D28RoNqF7ZUkWWF5yXGGMnqYSPqDu3riC0uJ5xVNOAj3Wwr4plwLTQCPWXWSv0vG+G4mpbVSR+JCRCL2hi+Lc uMWYAOQlpRBO9uebR59FJfyg8xoozb4TCDTzSRotmhejnseD8L2w9Z+IN0+jcsUWoDML6iVw6WkEXikl+M0Q461zxxqcVr5axfTCTBRanKGA3PUnKRMxPev6S3++75T9O6FM 9MKBxlmGD8BiXUNSVz/V7H6XlJECY/GgkzuxbEQAXo0wcHBIRcmW3Rc9f+IaYVpxOeCV8wYln/ehEA==

**CARLOS ALBERTO MONTENEGRO HERRERA | Fecha:2024-05-03 11:16:13 | FIRMANTE**

b4z44Lhh4OTaRlo+Ynht2vQj4vXgxwncM3vQFmxnRZhorJJj07bGr14QZyrvYVQznVUw7AYHILs0XKjDYFcRjy/OnKzyE4bkMuFLX1XSV158v+46ihPcQHpc9AWe3PyqBUuHrS /bKqr0UjSB3wAIWppd+YTqsa/J17G2Ndj8qy9wtJEWLX03cNLe5FQYiUANjKzwXABYgh+DnO4tUrEq0frQD1fHLdmlFbY6GNLz/9yRurqOj622Vmhqn5w3dNOBq1um3NxrussqchPLU EMT42KMx8MSTurC9sSVsWWEzWdgcALWTcOI7T+Ee9rmwqVQZfOcsOfqvTVcTs6XY2BdiA==

**JUDITH GARCIA RODRIGUEZ | Fecha:2024-05-03 12:36:09 | FIRMANTE**

eEx5HoBt9kPEJSHqsnljLKOmw5ed0Zi7mWcSu2qsfgOCSXhnY5unAgQtX1cLqTNltwGvGvpAEd079QTTPU31EBsmiwQYX66VpkuwR1N82/juz7W+A5YoyZi/F+Wus7C20Z4A Xo7sEFPTZQbNUe6y7NFEWrMWaNzDu67jX6Ve2QJEozQApysiq7mZUoFZMLo0gTN47M9+ZQbie1j6bBMwj+kP6oVnfAm5wzb5v7IM1+rPCe5+g4V1dGM2Y+sO/b5vSoNdLyI W1JBS8xUfkiMZPQswR4DQcS/x9VTj24NRgc1y3z3tZYBsw6YshihpTHysRxfV8xgF3c1y+9xaPQ==

**ALFREDO MARTÍNEZ JIMÉNEZ | Fecha:2024-05-03 16:09:17 | FIRMANTE**

NWlwTNP5qWdPtgyxSODaslar82KJHBmExCBsgYnprT+qQv9rcUu52R8clsJRgCJF1odp3x869yZgFkHxYD/7goBes1fdWIXjTfI0DNq//uHJiIKU0nVbZU/2F0Wd42IDMmDJNvIrPT +agbNUnEolQsaUv/QDpZXuU+BIWsTxrJ1vbsNwt8WYUgQ1/stoI123qVDKS8RhHG1YO6brgoiab6PqRtwQl3A1JvAwDV3jgUGbesG7BKIVzceiEyGVYgCLxtvFg9ywKVBOs/c7f PjOTdLgTFpuxozFte1lfto3ZcDviYRcH1HhOAYkq7b9v4GAqtNziC9K6brnxLeqNow==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[jq1dpAhSs](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/C4CkIA3UuEwtxs2yY6mxs3N032UG5Rvt>



UAEM  
RECTORÍA  
2023-2029