

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

Francisco Vera-López Portillo<sup>2</sup>, Carlos A. Montenegro-Herrera<sup>2</sup>,  
Ricardo A. Alvarado-Cosío<sup>1</sup>, Alfredo Martínez Jiménez<sup>2</sup>, Helena Porta Ducoing\*<sup>1</sup>

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

helena.porta@ibt.unam.mx

### Resumen

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

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

### Abstract

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

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

## Introducción

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

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

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

## Ficocianina, usos, estructura y estabilidad

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

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

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

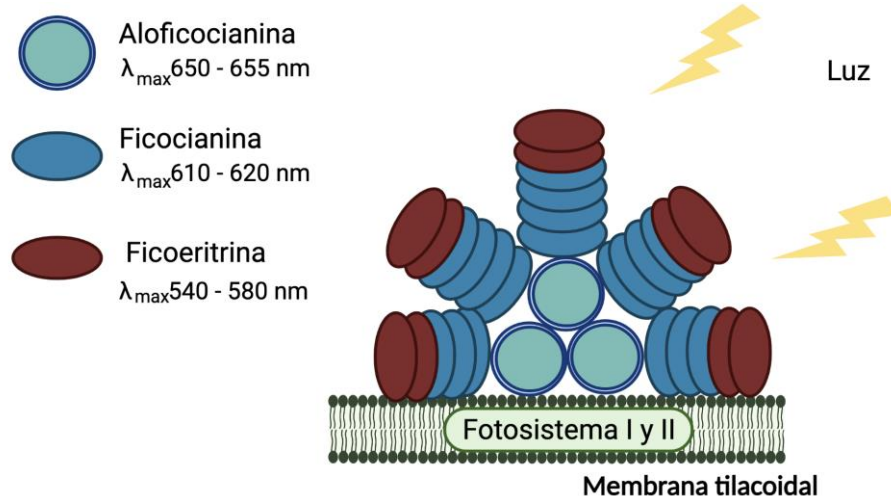


Figura 1. Diagrama del ficobilisoma situado en la membrana tilacoideal. Se presenta la distribución de ficobiliproteínas que funcionan como fotorreceptores y transfieren la energía hacia los fotosistemas I y II.

(Modificado de Gaiqnard et al. 2019).

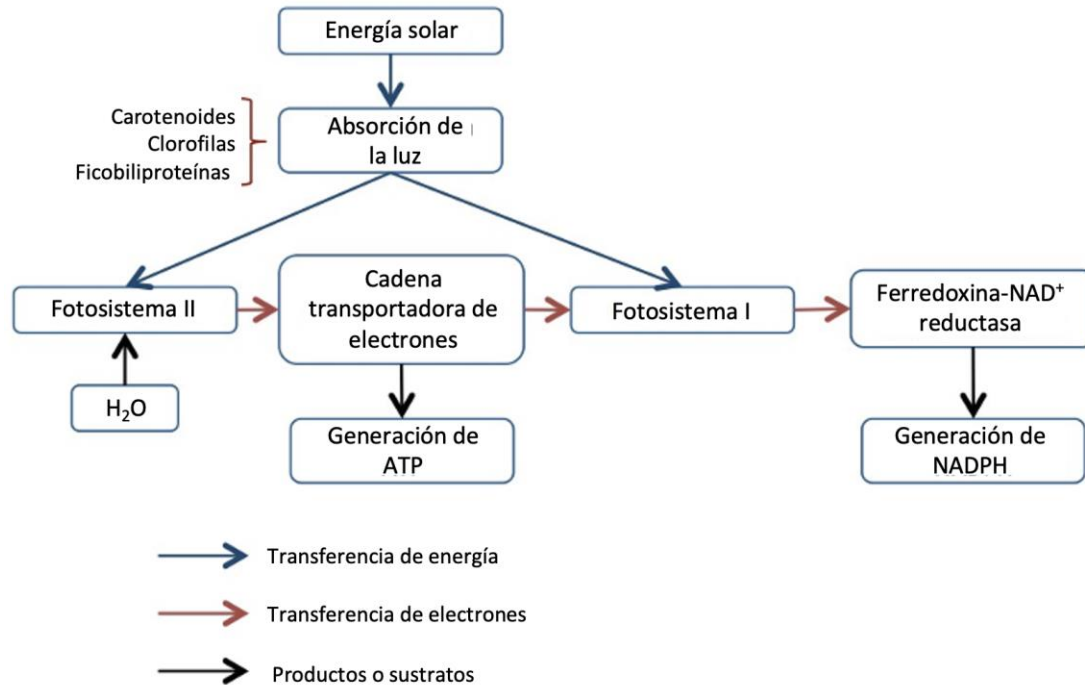


Figura 2. Diagrama simplificado de la absorción de luz y transporte de electrones en microalgas. (Modificado de Zilinskas y Howell, 1983).

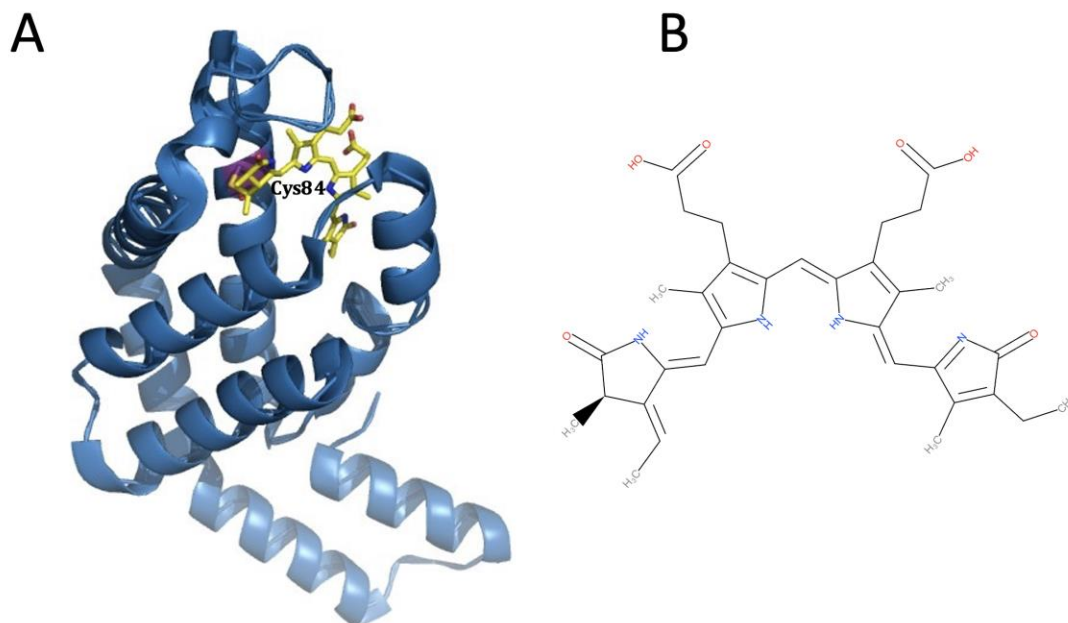


Figura 3. Estructura de las ficobiliproteínas, las cuales están compuestas por una parte proteica y un tetrapirrol unido mediante un enlace covalente a un residuo cisteína. (A) Ficocianina de la cianobacteria *Phormidium rubidum*. (B) Ficocianobilina: estructura con enlaces dobles y sencillos alternados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

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

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

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

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

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

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

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

# Artículos

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

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

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

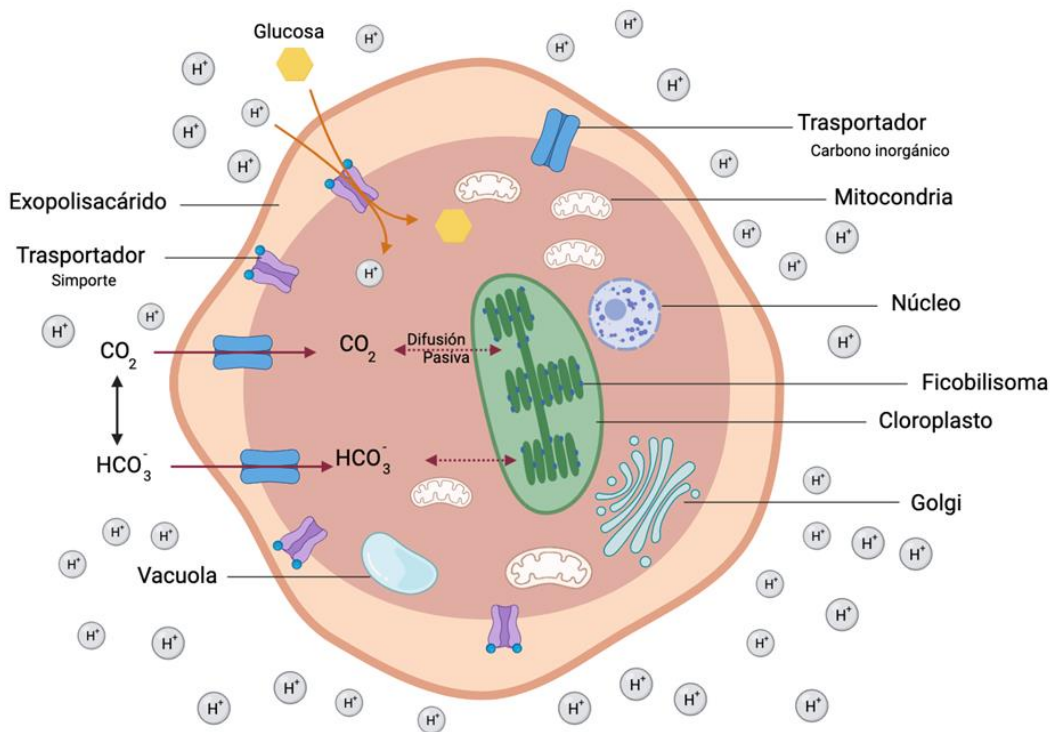


Figura 4. Esquema general de la microalga roja *G. sulphuraria*. Ésta cuenta con un cloroplasto y varias mitocondrias (>3 por célula). Se muestra la presencia de algunos transportadores de moléculas orgánicas e inorgánicas, los cuales le proporcionan la capacidad para crecer bajo condiciones heterotróficas,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

# Artículos

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

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

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

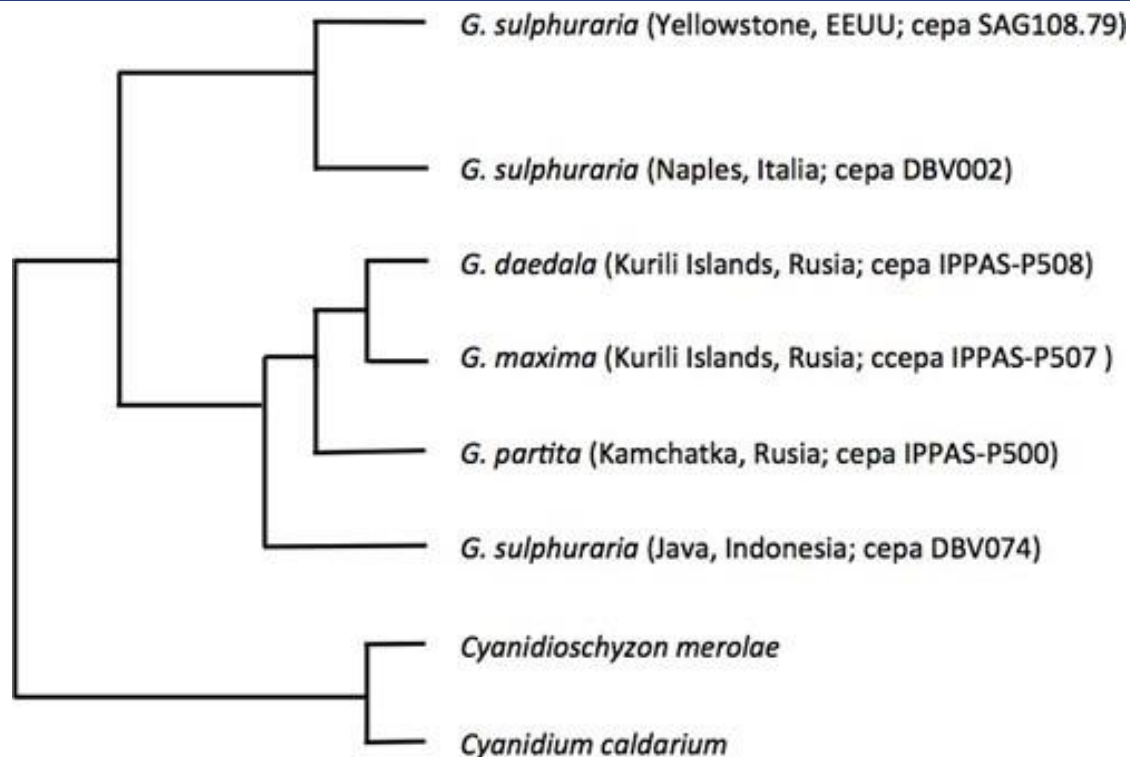
Con el objetivo de reforzar la clasificación taxonómica de la clase *Cyanidiophyceae*, Cozzolino et al. (2000), realizaron un estudio filogenético utilizando los genes que codifican para la subunidad larga de la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCo; codificada por el gen *rbcL*).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

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

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

## Cultivo de microalgas

Debido a que *G. sulphuraria* tiene la capacidad de crecer en diferentes condiciones de cultivo, en esta sección se presenta un resumen de las condiciones de cultivo para crecer esta microalga. El cultivo de microalgas a gran escala se usa para producir biomasa y metabolitos específicos como carotenoides, lípidos, FBPs y toxinas específicas, entre otros (Mulders et al., 2014). La producción de estos metabolitos, así como su biomasa, está directamente relacionada con las condiciones del cultivo las cuales se clasificaron en cuatro tipos (Chojnacka & Noworyta, 2004). (A) *Fotoautotrofia*: Donde la luz se usa como fuente de energía (fotosíntesis) y la fuente de carbono proviene de la asimilación del dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). (B) *Heterotrofia*: Donde tanto la obtención de energía como la fuente de carbono proviene del catabolismo de una fuente de carbono orgánico, y el crecimiento se lleva a cabo en condiciones de obscuridad. (C) *Mixotrofia*: El crecimiento se da tanto por fotosíntesis como por heterotrofia y, por lo tanto, la fuente de carbono es de origen



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

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

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

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

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

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

Diferentes géneros de microalgas han demostrado la capacidad de utilizar fuentes de carbono orgánico, y se han realizado estudios en los que se compara la velocidad de crecimiento en condiciones heterotróficas, autótrofas y mixotróficas. Como resultado se observa que la mayoría de microalgas presentan mayores velocidades de crecimiento en condiciones autótrofas; debido a que la internalización que tienen de los substratos orgánicos es baja (Lee, 2001). Sin embargo, existen microalgas las cuales presentan mejores velocidades de crecimiento en condiciones heterotróficas en comparación con ambientes autótrofos. Esto se debe a que la energía obtenida en forma de ATP, así como la cantidad de NADH y NADPH generados por medio de catabolismo de compuestos orgánicos, es mayor a la obtenida por medio de la fotosíntesis, lo que facilita el rápido crecimiento de las microalgas que tienen la capacidad de crecer en heterotrofia (Graverholt & Eriksen, 2007; Morales-Sánchez et al., 2014). En las microalgas que presentan buen crecimiento en condiciones heterotróficas se ha observado que existe una sinergia en el crecimiento cuando se utilizan condiciones mixotróficas. Esta sinergia se debe a la producción y asimilación de CO<sub>2</sub> de las microalgas que presentan un metabolismo heterótrofo y autótrofo, respectivamente.

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

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

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

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

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



# Artículos

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

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

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

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

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

### *Estado de inanición*

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

### *Intensidad y longitud de onda de la luz*

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

### *Concentración de oxígeno disuelto*

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

### *Concentraciones iniciales de biomasa y fuentes de carbono*

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

### *Disponibilidad de nitrógeno*

Como se comentó anteriormente, resultado de la inanición por carbono en cultivos heterotróficos, se observó la acumulación de FC, siempre y cuando exista un exceso de la fuente de nitrógeno ( $\text{NH}_4$ ) en

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

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

## Conclusiones

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

## Agradecimientos

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

## Referencias

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

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

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

# Artículos

- Stadler R, Wolf K, Hilgarth C, Tanner W, Sauer N (1995) Subcellular localization of the inducible *Chlorella* HUP1 monosaccharide-H<sup>+</sup> symporter and cloning of a co-induced galactose-H<sup>+</sup> symporter. *Plant Physiol.* 107:33-41. <https://doi.org/10.1104/pp.107.1.33>
- Stadnichuk IN, Rakhimberdieva MG, Bolychevtseva YV, Yurina NP, Karapetyan NV, Selyakh, IO (1998) Inhibition by glucose of chlorophyll *a* and phycocyanobilin biosynthesis in the unicellular red alga *Galdieria partita* at the stage of coproporphyrinogen III formation. *Plant Sci.* 136:11-23. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(98\)00088-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00088-0)
- Tredici MR, Carozzi P, Chini Zittelli G, Materassi R (1991) A vertical alveolar panel (VAP) for outdoor mass cultivation of microalgae and cyanobacteria. *Bioresour. Technol.* 38:153-159. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(91\)90147-C](https://doi.org/10.1016/0960-8524(91)90147-C)
- Wan M, Wang Z, Zhang Z, Wang J, Li S, Yu A, Li Y (2016) A novel paradigm for the high-efficient production of phycocyanin from *Galdieria sulphuraria*. *Bioresour. Technol.* 218:272-278. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.045>
- Wang H, Zhang Z, Wan M, Wang R, Huang J, Zhang K, Guo J, Bai W, Li Y (2020) Comparative study on light attenuation models of *Galdieria sulphuraria* for efficient production of phycocyanin. *J. Appl. Phycol.* 32:165-174. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01982-8>
- Weber APM, Oesterhelt C, Gross W, Bräutigam A, Imboden LA, Krassovskaya I, Linka N, Truchina J, Schneidereit J, Voll H, Voll LM, Zimmermann M, Jamai A, Riekhof WR, Yu B, Garavito RM, Benning C (2004) EST-analysis of the thermoacidophilic red microalga *Galdieria sulphuraria* reveals potential for lipid A biosynthesis and unveils the pathway of carbon export from rhodoplasts. *Plant Mol. Biol.* 55:17-32. <https://doi.org/10.1007/s11103-004-0376-y>
- Zilinskas BA, Howell DA (1983) Role of the colorless Polypeptides in phycobilisome assembly in *Nostoc* sp. *Plant Physiol.* 71:379-387. <https://doi.org/10.1104/pp.71.2.379>