



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Posgrado en Ciencias en Bioprocesos

Efecto del medio de cultivo sobre el crecimiento y valor
nutricional de *Arthrospira maxima*

**Tesis para obtener el grado de
Maestra en Ciencias en Bioprocesos**

Presenta:

LN. Citlalli Alejandra Silos Vega

Director de Tesis:

Dra. Ruth Elena Soria Guerra



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PROGRAMA DE POSGRADO EN BIOPROCESOS

*Efecto del medio de cultivo sobre el crecimiento y valor
nutricional de Arthrospira maxima*

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

PRESENTA:

LN. Citlalli Alejandra Silos Vega

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Ruth Elena Soria Guerra

SINODALES:

PRESIDENTE:

Dra. Ruth Elena Soria Guerra

SECRETARIO:

Dra. Alicia Grajales Lagunes

VOCAL:

Dr. José Francisco Morales Domínguez

SAN LUIS POTOSÍ, S. L. P.

Agosto 2021

Proyecto realizado en:

Laboratorio de Biotecnología Molecular de Células Vegetales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

El programa de Maestría en Ciencias en Bioprocesos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí Pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, registro 000588 (Maestría), en el Nivel Consolidado.

Número de registro de la beca otorgada por CONACyT: 1006741

Otro apoyo no hubo



Efecto del medio de cultivo sobre el crecimiento y valor nutricional de *Arthrospira maxima*. Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

El agradecimiento principal es para la Dra. Ruth Elena Soria Guerra que me ha permitido obtener los recursos necesarios para mi crecimiento profesional, sus conocimientos y apoyo me han guiado a través de cada una de las etapas de este proyecto para alcanzar los resultados que hoy presentamos y seguiremos fortaleciendo.

También es importante mencionar el agradecimiento para la Dra. Alicia Grajales Lagunes y el Dr. Francisco Morales Domínguez por su tiempo y dedicación, así como a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí y administrativos por la oportunidad de realizar este posgrado.

Por los conocimientos y apoyo para la Dra. Luzmila Martínez González.

Esto no hubiese sido posible sin el apoyo de CONACYT, gracias.

Agradezco también a la Mtra. Gloria, Mtra. Cecilia, Dra. Yanin y al Dr. Luis que permitieron hacer uso de los laboratorios y equipos para el cumplimiento de mi trabajo.

Agradecimientos personales

No hay palabras suficientes para poder transmitir el agradecimiento que tengo principalmente para mi familia que estuvieron conmigo y en mi etapa profesional quienes continúan apoyándome por cualquier decisión que enfrento en la vida. Sin ustedes, esto no hubiese sido posible. Maricela y Héctor, mis padres, la base sólida de lo que yo soy y lo que estoy convirtiendo. A mis hermanos Xolotl, Alma y Emma que apoyaron y respetaron.

Al Sr. Otsuka por su compañía y tiempo durante esta etapa profesional.

A mis compañeros de laboratorio que me transmitieron sus conocimientos con paciencia.

Tabla de contenido

1. Introducción:	1
2. Marco teórico	2
2.1. Usos de la <i>Espirulina</i>	2
2.2 Componentes de valor alimenticio para el consumo humano de la <i>Espirulina</i>	3
2.2.1 Proteínas:	3
2.2.2 Lípido:	3
2.2.3 Carbohidratos:.....	3
2.2.4 Vitaminas:	3
2.2.5 Minerales:.....	4
2.2.6 Pigmentos:	4
2.2.7 Ficobiliproteínas:	4
2.2.8 Clorofila:	5
2.2.9 Carotenoides:	5
2.3 Producción de <i>Espirulina</i>	6
2.3.1 Luz.....	7
2.3.2 Agua	7
2.3.3 Carbono:.....	7
2.3.4 Elementos indispensables	7
2.3.5 Composición de los medios de cultivo.	8
3. Justificación	10
4. Hipótesis	11
5. Objetivo general:	11
5.1. Objetivos específicos:.....	11
6. Metodología:	11
6.1. Caracterización molecular de la especie:	11
6.2. Medios de cultivo para la producción de biomasa.....	15
6.3. Cinética y cuantificación de crecimiento	15
6.4. Método de extracción de biomasa	15
6.5. Extracción y cuantificación de pigmentos.....	15
6.5.1. Clorofila a y carotenoides.....	15

6.5.2.	Ficocianina.....	16
9.6.	Valor nutricional.....	17
9.6.1.	Cenizas	17
9.6.2.	Humedad	17
9.6.3.	Proteínas	17
9.6.4.	Lípidos totales.....	18
9.6.5.	Perfil de Ácidos grasos.....	18
9.6.6.	Carbohidratos.....	19
9.7.	Evaluación de la relación costo-beneficio:.....	19
9.8.	Análisis estadístico	19
11.	Discusión	19
11.1.	Identificación molecular de la especie <i>Arthrospira</i>	19
11.2.	Cinéticas de crecimiento:	23
11.3.	Biomasa.....	23
11.4.	Contenido de pigmentos	26
11.5.	Contenido de Nutrientes	31
11.5.1.	Proteínas	31
11.5.2.	Lípidos	32
11.5.3.	Carbohidratos.....	36
11.5.4.	Relación costo- beneficio	36
12.	Conclusiones.....	37
13.	Bibliografía.....	38

Resumen en español

Arthrospira es una cianobacteria azul-verdosa con interés comercial para la producción de compuestos para el mercado alimentario de humanos y animales; además del sector cosmético, de biorremediación y en la biomedicina debido a los compuestos que aporta, como el contenido proteico, de ácidos grasos y vitaminas y minerales. En la actualidad se conocen dos especies para la producción a gran escala, siendo *A. platensis* la más usada y *A. maxima*, una cepa nativa de México. La producción a gran escala ha reportado diversos medios de cultivo para el crecimiento de estas cianobacterias, pero algunos resultan de alto costo. Por lo tanto, en este trabajo de investigación se analizó el crecimiento de *Arthrospira* en el medio Zarrouk (Z), el medio RM6 y el medio Zarrouk modificado (ZM), y se analizaron los componentes principales de interés comercial (pigmentos y valor nutricional). Primeramente se realizó la caracterización molecular de la especie por medio de la amplificación de la porción 16S de ARN ribosomal y el operón de la ficocianina β (cpc-B), con los cuales no se obtuvieron resultados concluyentes, por lo que, posteriormente se llevó a cabo un análisis filogenético que indicó que la especie con la que se trabajó en este proyecto corresponde a ***Arthrospira maxima***. Una vez determinada la especie, se evaluó el crecimiento de *A. maxima* en los tres medios, pero en el medio Zarrouk y RM6 tuvo una duración mayor a 33 días para llegar a la fase de muerte, presentando un contenido mayor de biomasa seca y pigmentos (clorofila, carotenoides y ficocianina) en comparación con el medio ZM. El porcentaje de proteínas fue de $29.4 \pm 8.8\%$, $40.42 \pm 7.95\%$ y $32.19 \pm 3.9\%$ en el medio Z, RM6 y ZM respectivamente; el porcentaje de carbohidratos fue de 48.21%, 35.61% y de 51.86% para los tres medios en el mismo orden. Mientras que el porcentaje de lípidos fue de $5.05 \pm 1.34\%$ para el medio ZM, $6.1 \pm 0.25\%$ para el medio Z y $4.13 \pm 1.42\%$ para el medio RM6. Respecto al análisis del perfil de ácidos grasos (AG), se registró un porcentaje mayor de ácido γ -linolénico (C18:3 ω -6), ácido undecanoico (C11:0) y ácido palmítico (C16:0) en los tres medios de cultivo evaluados. El medio RM6 es 73% más económico que el medio Zarrouk, ya que presentó un contenido similar al medio Zarrouk con relación a biomasa seca, clorofila total, y clorofila A, además el contenido proteico fue de $40.42 \pm 7.9\%$, el cual fue el valor mayor registrado entre los diferentes medios. Los resultados del presente trabajo indican claramente que el medio RM6, el cual es de bajo costo y es comparable con el medio de Zarrouk en cuanto al rendimiento de biomasa y contenido de AG de interés, así como el contenido de clorofila en los cultivos de *A. maxima*.

Palabras clave: *Espirulina*, *Athrospira*, Zarrouk, Medio de Cultivo, RM6, Valor nutricional, *A. maxima*

Summary

Arthrospira is a blue-green cyanobacterium with commercial interest to produce compounds for the food industry of humans and animals; in addition, to the cosmetics, bioremediation and biomedicine sectors due to the compounds it provides, such as protein, fatty acids and vitamins and minerals content. Currently, two species are known for large-scale production, being *A. platensis* the most used and *A. maxima*, a native strain of Mexico. Large-scale production has reported a variety of culture media for the growth of this cyanobacteria, but some are expensive. Therefore, in this research, the growth of *Arthrospira* in Zarrouk medium (Z), RM6 medium and modified Zarrouk medium (ZM) was analyzed, along with the main components of commercial interest (pigments and nutritional value). The molecular characterization of the strain was also determined through amplification of the 16S portion of ribosomal RNA and the phycocyanin β (cpc-B) operon, but no conclusive results were obtained. Therefore, a phylogenetic analysis was performed that determined that the strain corresponds to *Arthrospira maxima*. The growth of *A. maxima* in the Zarrouk and RM6 medium was evaluated, which lasted longer than 33 days to reach the death phase, presenting a higher content of dry biomass and pigments (chlorophyll, carotenoids and phycocyanin) compared to the ZM medium. The percentage of protein content was $29.4 \pm 8.8\%$ in Z, $40.42 \pm 7.95\%$ in RM6 and $32.19 \pm 3.9\%$ in ZM medium; with a percentage of carbohydrates for the Z medium of 48.21%, for the RM6 medium of 35.61% and the medium ZM of 51.86%. While the percentage of lipids was $5.05 \pm 1.34\%$ for the ZM medium, $6.1 \pm 0.25\%$ for the Z medium and $4.13 \pm 1.42\%$ for the RM6 medium; regarding the analysis of the fatty acid profile (FA), a higher percentage of γ -linolenic acid (C18:3 ω -6), undecanoic acid (C11:0) and palmitic acid (C16:0) was recorded in the three-culture media. The RM6 medium presented a content of dry biomass, total chlorophyll, and chlorophyll A higher than the other medium, in addition the protein content was $40.42 \pm 7.9\%$. The present work clearly indicates that RM6 medium, which is low-cost, it is comparable with the Zarrouk medium in terms of biomass yield and content of interest, as well as the chlorophyll content in *A. maxima*.

Keywords: *Spirulina*, *Athrospira*, Zarrouk, Culture Medium, RM6, Nutritional value, *A. maxima*

1. Introducción:

La *Espirulina* es una cianobacteria azul-verdosa con filamentos no heterocísticos, fotoautótrofa reconocible por la disposición de los tricomas cilíndricos multicelulares de anchura de 3-13 μm , de largo de 100-200 μm y gram negativa. Se reproduce cada 7 horas por fisión binaria en un solo plano en ángulo recto con el eje largo del tricoma. En la actualidad se producen dos especies a gran escala: *Espirulina platensis* y *E. maxima*, ambos están incluidos en el género *Arthrospira*. Aunque también se conocen como *Espirulina*, una designación que tiene un significado más tradicional, práctico y tecnológico que el taxonómico, llegando a crear confusión. Durante el texto nos vamos a referir como *Espirulina* al género *Arthrospira* (Vonshak *et al.*, 2002; Ponce, 2013).

En el lago de Chad y Nigeria en África central, así como en el este de África en los valles de Rift se reproduce *A. platensis* de manera natural por lo que es utilizada para combatir la desnutrición e inanición de zonas cercanas. México fue una fuente natural de *E. maxima*, las crónicas de los conquistadores españoles mencionan que los aztecas la recolectaban del lago de Texcoco, la consumían en forma de queso y le atribuían efectos de resistencia y fuerza extraordinaria; pero desafortunadamente, los cambios climáticos y explotación por elaboración de productos alternos, disminuyó y extinguió su crecimiento, quedando su producción y mantenimiento a cargo de empresas externas para la comercialización, mientras que en África sigue en condiciones de crecimiento y mantenimiento de manera natural (Ponce, 2013). Actualmente la industria produce ambas cianobacterias en estanques abiertos al aire libre alrededor del mundo produciendo de 3000 a 12000 toneladas en peso seco de diferentes partes del mundo. Actualmente, se produce en Tailandia, Japón, Israel, Estados Unidos, Taiwán, India, China, Nueva Zelanda y Chile, recientemente en Colombia y Perú. Mientras que México se reproduce en menor escala en estados como Colima, Veracruz y Querétaro. Se destaca la producción en China de *A. platensis* por convertirse en el principal productor del mundo desde los años 90 y actualidad (70%) (Shimamatsu *et al.*, 2004; Yuan *et al.*, 2019).

La *Espirulina* es un suplemento nutricional y en los últimos años se ha potenciado su ingesta debido a los efectos nutraceuticos que presenta, por lo que la industria ha mostrado un interés en la extracción de pigmentos o metabolitos para la utilización como ingrediente de productos procesados de diferente giro industrial como: alimentario, cosmética y ciencias biomédicas. La producción a gran escala se ha convertido en un desafío para el crecimiento y mantenimiento de la cianobacteria por los costos que representa. Por lo que en este trabajo se analizará el efecto de diferentes medios de cultivo para conocer su efecto sobre el crecimiento, la calidad nutricional y producción de pigmentos de *Espirulina maxima*.

2. Marco teórico

2.1. Usos de la *Espirulina*

Los productos con *Espirulina* se pueden asignar en 5 mercados potenciales:

- En la **industria alimentaria** como suplemento alimenticio.
- En la **alimentación de especies** terrestres y acuáticas mejorando la calidad del producto y la respuesta inmunológica a enfermedades en los peces, gallinas y puercos (Sarada *et al.*, 1999; Ramírez-Moreno *et al.*, 2006).
- En la **industria cosmética** para la pigmentación de diversos cosméticos (Sarada *et al.*, 1999; Ramírez-Moreno *et al.*, 2006) y en formulaciones dermocosméticas (Delsin *et al.*, 2015). Son una fuente de protectores solares naturales como los aminoácidos similares a las micosporinas y la escitonemina (Rastogi *et al.*, 2010).
- En la **biorremediación** para remover NO₃⁻ (nitrato), NO₂ (dióxido de nitrógeno) y PO₄⁻³ (peroxinitrato) en aguas residuales (Ortiz-Villota *et al.*, 2018; Arias *et al.*, 2020). La acumulación de polihidroxicanoatos, que pueden utilizarse como sustitutos de los plásticos no biodegradables de origen petroquímico (Abed *et al.*, 2009). Se consideran una fuente de biocombustibles, es decir, alcoholes e hidrógeno (Angermayr *et al.*, 2009). En la formación de biopelículas mezclada con quitosano para remover colorantes aniónicos y catiónicos de tintes efluentes en la industria cosmética (Silva *et al.*, 2017).
- En la biomedicina; ha ganado atención como una nueva plataforma para producir vacunas o proteínas farmacéuticas comestibles (Dehghani *et al.*, 2018).

Estudios clínicos apuntan que tiene efectos terapéuticos inmunoregulatorios, antioxidantes, anticancerígenos, antivirales, antibacteriales, hepatoprotectores y antitóxicos. En el tratamiento de patologías como hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia se ha evidenciado su disminución a nivel sérico, en el incremento de *Lactobacillus* intestinales, reducción de neurotoxinas debido a metales pesados y drogas, protección contra las radiaciones, protector cardiovascular y reducción de obesidad (Bermejo *et al.*, 2008; Hoseini *et al.*, 2013; Hernandez-Lepe *et al.*, 2015; Neyrinck *et al.*, 2017; Bao *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2019; Rajasekar *et al.*, 2019).

Por esta razón, la producción comercial de *Espirulina* ha ganado interés mundial para su uso como suplemento alimenticio y la creación de bioproductos para el consumo humano y animal, además del uso farmacéutico. Actualmente, la producción a gran escala se enfrenta a los altos costos de los medios de cultivo, por lo que han surgido medios alternativos u optimizables para su crecimiento, aunque también existe la problemática del proceso de cosecha, secado y empaquetado que pueda afectar la

calidad del producto final, mismo que debería considerarse en la industria (Soni *et al.*, 2017; Madkour *et al.*, 2012).

2.2 Componentes de valor alimenticio para el consumo humano de la *Espirulina*

Las características de valor nutricional y morfológico suelen estar relacionados con la calidad del producto y estas a su vez con el proceso de la cosecha (Desmorieux y Decaen, 2005; Huarachi-Olvera *et al.*, 2014). En la Tabla 1 se muestra la información nutricional de *E. maxima*, *E. platensis*, y *Chlorella vulgaris* desarrollando la información con mejor detalle en los próximos párrafos (Andrade *et al.*, 2019).

2.2.1 Proteínas:

E. maxima contiene una alta cantidad de proteínas (60-71%), así como todos los aminoácidos esenciales, aunque en cantidades reducidas de metionina, cisteína y lisina (Ponce, 2013). El valor biológico de las proteínas es 68%, comparado con las fuentes básicas de proteínas de origen animal, como el huevo, carne o leche, supera el porcentaje de proteínas biodisponibles (García-Garibay *et al.*, 2003).

2.2.2 Lípido:

Contiene lípidos saturados como el ácido palmítico (C16:0), los cuales representan el 44.2% de los lípidos totales, seguido del contenido de ácidos grasos (AG) polinsaturados (PUFA) que pueden alcanzar el 42.2% de los lípidos totales dentro de los cuales se destaca el contenido de ácido γ -linoleico (C18: 3, n-6) (23.4%) (Ramadan *et al.*, 2008).

2.2.3 Carbohidratos:

Rajasekar *et al* (2019) han identificado la presencia de polisacáridos sulfatados que contienen residuos de azúcar (glucosa, ramnosa, xilosa, fucosa, manosa y galactosa), mismos que juegan un papel esencial en el control de enfermedades por la actividad antioxidante y mejoramiento de la respuesta inmune, propiedades antibacterianas y en el rendimiento del crecimiento de los peces y camarones (Rajasekar *et al.*, 2019).

2.2.4 Vitaminas:

Contiene vitaminas solubles como el complejo B y liposolubles, como la vitamina A, E, y K. Se ha estimado que 10 g de *E. maxima* en base seca cumplen las necesidades de la ingesta diaria recomendada proporcionando hasta 21 veces más β -carotenos que las zanahorias, contiene 31.4 veces más de vitamina B1 (tiamina) que el hígado, hasta 140 veces más vitamina B3 (niacina) que el huevo, contiene hasta 5.7 veces más vitamina B6 (piridoxina) que la sandía y el contenido de vitamina B12

(cianocobalamina) es hasta 3.2 veces más que el huevo (Barros y Buenrostro, 1999; Madhubalaji *et al.*, 2019).

2.2.5 Minerales:

Destaca el aporte de hierro, magnesio, potasio, calcio, cobre, manganeso, selenio, fósforo, sodio y zinc. Contiene hasta 1.26 y 8.4 más calcio que el queso y la leche, respectivamente; además de no contener colesterol. La *E. maxima* contiene hasta 22 veces más hierro que el hígado de res, y hasta 83 veces más que el filete de res. Además de ser de fácil su absorción en el intestino delgado (Barros *et al.*, 1999).

2.2.6 Pigmentos:

En los últimos tiempos ha aumentado el interés de la *E. máxima* en la industria por la producción de pigmentos, tales como clorofila carotenoides (xantofilas mixoxantófilas, zeaxantina, criptoxantinas, entre otras) y muy especialmente las ficobiliproteínas: ficocianina, alo-ficocianina y ficoeritrina (Challem, 1981; Glazer, 1985). Estos pigmentos realizan funciones específicas en la fotosíntesis tanto de tipo estructural como funcional; capturan energía de la luz y desempeñan un papel de foto protección, previniendo la fotooxidación, ya que atenúa especies reactivas de oxígeno o clorofila en estado de excitación.

2.2.7 Ficobiliproteínas:

Son pigmentos accesorios verdes azulados que se encuentran en la región visible del espectro de 620 y 650 nm, constituyendo una medida de ficocianina, alo-ficocianina y ficoeritrina. Estas son proteínas que forman parte de polipéptidos denominados ficobiliproteínas que se encuentra en las cianobacterias y algas de los géneros *Rhodophyta* y *Cytophyta*, siendo la fuente más utilizada para la extracción la ficocianina (Marín-Prida *et al.*, 2015).

La ficocianina es el pigmento más estudiado y con mayor interés en la industria. La conforman dos cadenas polipeptídicas unidas covalentemente, una subunidad α y una β , con pesos entre 17-20 kDa. Contiene grupos proteicos tetrapirrólicos lineales (grupo bilin o cromóforo) que difieren en la presencia de sus dobles enlaces. Los grupos cromóforos, denominados ficocianobilina, están unidos mediante enlaces a residuos de cisteína de las cadenas polipeptídicas (cisteína 84 en la cadena α y la cisteína 84 y 155 en la cadena β). La c-ficocianina es la principal ficobiliproteína de la espirulina y constituye hasta el 20% de su DW (Cuellar-Bermudez, 2015)

Se han realizado diversos estudios en los que se comprueban las propiedades antioxidantes (Bhat *et al.*, 2000), antiinflamatorias (Romay *et al.*, 1998) inmunomoduladoras, citoprotectoras (Chiu *et al.*, 2006), antitumorales (Subhashini *et al.*, 2004; Nishanth *et al.*, 2010), hepatoprotectoras, neuroprotectoras y propiedades

de protección pulmonar (Marín-Prida, 2015) lo que ha originado un aumento en el interés en la producción a gran escala por la industria cosmética y biomedicina.

2.2.8 Clorofila:

Es un pigmento verde primario que participa en la fotosíntesis y también es un sistema de protección frente a la luz excesiva. Proviene del vocablo *chloros* que significa verde y *fyton* que significa hoja (Ruiz *et al.*, 2019). Existen diferentes tipos de *clorofila*: Tipo A, presente en el cloroplasto de plantas y vegetales y es la encargada de absorber la luz durante la fotosíntesis. Tipo B, es pigmento secundario, se encuentra en los cloroplastos y se encarga de absorber la luz de otra longitud y transferir la energía a *clorofila a*. Tipo C, presente en los cloroplastos de las algas pardas y las diatomeas. Tipo D, presente únicamente en algas rojas, y recientemente tipo F que ha sido identificada solo en cianobacterias (Carmo, 2020). A la ingesta de clorofila se le han atribuido propiedades quelantes, anticancerígenas, antibacterianas, antioxidantes, antiinflamatorias y energizantes, además de desintegrar cálculos y reducir los niveles de colesterol en sangre (Rivera *et al.*, 2005).

2.2.9 Carotenoides:

Son pigmentos accesorios liposolubles isoprenoides cuyo color va del amarillo al rojo. Y se dividen en dos grupos principales: carotenos y xantofilas, que se diferencian por la ausencia y presencia de O₂ en sus grupos funcionales, respectivamente. Capturan energía de la luz entre 400-500 nm. Se conocen más de 600 carotenoides, pero solo el β-caroteno, licopeno, astaxantina, cantaxantina, criptoxantina, zeaxantina y luteína se utilizan comercialmente debido a la dificultad y elevado costo de la extracción. Se utilizan como colorantes industriales naturales, además de destacar sus propiedades terapéuticas, como el efecto antioxidante en diferentes patologías (Guerrero *et al.*, 2013).

Tabla 1- información nutricional de *E. maxima*, *E. platensis* y *C. vulgaris*

		<i>Espirulina maxima</i>	<i>Espirulina platensis</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>
Proteínas		55-71 (%)	60-71(%)	40-58 (%)
Lípidos		4-7(%)	6-7(%)	6-16 (%)
Hidratos de Carbono		13-16 (%)	13-16.5 (%)	18.5(%)
Minerales		4-9 (%)	8000 (mg)	6-9 (%)
Vitaminas (mg 100 g ⁻¹)	Tiamina	5.5	0.8-15.4	0.6-2.3
	Riboflavina	4	0.2-0.9	2 -6
	Piridoxina	0.3	0.3-4	0.1- 3.2
	Acido nicótico	11.8	0.4-5.3	10-22

	Ácido pantoténico	1.1	-	1-10
	Ácido fólico	0.05	0.2-0.6	0.1-4
	Biotina	0.04	-	0.015-0.064
	Cianocobalamina	0.02	0.3-0.8	-
	Ácido ascórbico	-	42-195.3	18-370
	B-caroteno	0.17		26-33
	Alta- tocoferol	19		
Aminoácidos (g / g)	Alanina	5- 6.1	6.91	4.2-7.4
	Arginina	4.5 -9.3	6.24	5.8-10.2
	Acido aspártico	6 – 15.2	8.97	6.9-8.8
	Cisteína	0.6 – 2.2	0.78	0.3-0.9
	Acido glutámico	8.2 – 21.8	15.1	8
	Glicina	3.2- 4	4.63	4.9-5.5
	Histidina	0.9 – 1.6	1.11	1.4-3
	Isoleucina	3.7 – 4.5	4.930	3.1-6.4
	Leucina	5.6 – 7.7	7.95	6.8-9.7
	Lisina	3.0- 4.5	4.34	4.9-9.4
	Metionina	1.6 – 2.2	1.99	1-2
	Fenilalanina	2.8 – 4	3.63	3.2-5.1
	Prolina	2.7- 3.2		2.2-6.4
	Serina	3.2-4.3	3.65	3-4.1
	Treonina	3.2-4.5	4.02	3.6-4.7
	Triptófano	0.8-1.2	0.88	1-1.5
	Tirosina	3.9		2.6-4.1
	Valina	4.2-6.5	5.7	4.8-6
Pigmentos		Clorofila, ficobiliproteínas, carotenoides	Clorofila, ficobiliproteínas, carotenoides	Clorofila, carotenoides (luteína, zeaxantina, fucoxantina)
Referencias		(García-Garibay <i>et al</i> , 2003)	(Narasimha, 1982; Badadzhanov <i>et al</i> , 2004)	(García-Garibay <i>et al.</i> , 2003; Gouveia, 1996; Ho <i>et al.</i> , 2013).

2.3 Producción de *Espirulina*

La *Espirulina* crece en condiciones acuosas caracterizadas por alta concentración de sales minerales y pH elevado entre 9-11. Así, los medios de cultivo deben contener los nutrientes inorgánicos necesarios para el crecimiento, mismos que

están relacionados con la producción de biomasa. Aproximadamente el 15% del costo total de producción se gasta en nutrientes, siendo el medio de cultivo Zarrouk's el más común, sin embargo, también representa el mayor problema en la producción a gran escala, junto con las dificultades técnicas y costo de mantenimiento (Andrade *et al.*, 2019). Debido a esto han surgido alternativas de medios para disminuir el costo de producción considerando los siguientes nutrientes para su producción:

2.3.1 Luz

La presencia de luz es un factor limitante en el cultivo de microalgas y cianobacterias para la realización de la fotosíntesis. Se han utilizado espectros de luz blanca de diferente magnitud (de 300 a 3000 $\mu\text{mol/m/s}$) pero no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas, pero cuando se usa la luz verde o roja se evidencia una fotoestimulación en el perfil lipídico y el contenido de pigmento (Prates, *et al.*, 2018). Se ha evidenciado que la radiación UV influye negativamente en la calidad y el rendimiento de la biomasa alterando la morfología durante la aclimatación o en tiempo de adaptación. El contenido de pigmentos depende en gran medida de este parámetro (Huarachi-Olvera *et al.*, 2014).

2.3.2 Agua

Es un nutriente que suministra los electrones (H^+) para la reducción del CO_2 y medio de transporte. Se estima que la *Espirulina* consume 2.499 L por Kg seco que aporta 65% de proteínas, comparando con el cultivo de soja, maíz y carne de res que es 3.5, 4.97 y 41.6 veces más, respectivamente, en el consumo de agua durante en la producción, además de un aporte proteico menor (Ponce, 2013).

2.3.3 Carbono:

La cianobacteria foto autotrófica tiene como única fuente de carbono el CO_2 . El CO_2 puede estar en el medio como alguna sal derivada, tal como bicarbonato de sodio, pero su reducción e incompatibilidad a la biomasa en el ciclo de Calvin siempre se produce teniendo como sustrato al CO_2 molecular. Por lo tanto, el CO_2 es la mejor fuente aprovechada desde el medio externo hasta el interior de la célula, para posteriormente ser aprovechado en procesos metabólicos de fijación, acumulando moléculas de O_2 produciendo una saturación y disminuyendo la producción. Por tanto, es necesario mantener siempre un suministro de CO_2 suficiente y evacuar eficientemente el O_2 generado (Acosta, 2006).

2.3.4 Elementos indispensables

El **nitrógeno** es un elemento importante en el medio, ya que forman parte de las proteínas y nucleótidos de la biomasa. Las principales fuentes de nitrógeno son el nitrato (NO_3^-), el amonio (NH_4^+) y la urea. El nitrato (NO_3^-) que debe ser reducido hasta

el estado de oxidación del grupo amino (-NH₂) que es como se encuentra en las proteínas. La reacción necesita gran cantidad de poder reductor (NADPH) y elevado pH al consumir H⁺. Siendo el nitrato sódico más usado y con buena tolerancia en cantidades altas. La administración de amonio (NH₄) también es utilizado como fuente de nitrógeno, aunque resulte tóxico para algunas microalgas, pero en la *Espirulina* tolera hasta 50 mg/L, pero no representa ventajas significativas en la concentración de nutrientes de la biomasa y los costes de producción (Mora *et al.*, 2002). **El potasio** es un nutriente esencial y es requerido en grandes cantidades para la producción, afectando la forma, el tamaño, el color, sabor y otras medidas atribuidas a la calidad de la biomasa. El potasio se administra en forma iónica K⁺ y realiza diferentes funciones: la producción de adenosintrisfosfato (ATP), regula el contenido de agua (osmorregulación) permitiendo una tolerancia frente al estrés hídrico, participa en la síntesis de proteínas y activación de ciertas enzimas, y por lo tanto regula la absorción de CO₂. Las cianobacterias almacenan **el fósforo** como polifosfatos. Este elemento es un importante intermediario metabólico y es constituyente de moléculas estructurales como los fosfolípidos, enzimas y multitud de especies bioquímicas, tomando un papel fundamental en la mayoría de los procesos celulares. El fósforo es suministrado como fosfato o fosfatos ácidos (PO₄, HPO₄) que son insolubles en presencia de otros iones (como el Ca²⁺) (Markou *et al.*, 2012). El **hidrógeno** es proporcionado por el agua, es la fuente de electrones que permiten reducir del NADP⁺ a NADPH creando un poder reductor para ser usado posteriormente en el ciclo de Calvin. La hidrólisis del agua tiene lugar en el fotosistema II (PSII) y la reacción da como subproducto el oxígeno, molécula que se libera al aire. Es muy importante que nunca falte el agua para que no se detenga el PSII. Otros minerales como el cloro, sodio, calcio y magnesio son iones que aparecen en los medios, aunque a veces no se consuman. Son importantes para mantener la presión osmótica, el equilibrio químico y en la producción de la biomasa. El magnesio es el ion central que aparece en el núcleo de porfirina de la clorofila.

2.3.5 Composición de los medios de cultivo.

La producción de la biomasa o metabolitos depende de diferentes factores fisicoquímicos, como la intensidad de luz, la concentración de nutrientes, la temperatura (24-35 °C, con una temperatura óptima de 33°C), la tasa de aireación (Ravelonandro *et al.*, 2011), el pH, concentración de CO₂, y la salinidad (Colla *et al.*, 2007; Ogbonda *et al.*, 2007; Pandey y Tiwari, 2010). En la actualidad existen diversos medios de cultivo para satisfacer los requerimientos nutricionales de la *Espirulina*, entre ellos: Zarrouk's, BG11, F/2, NRC, RAO, CFTRI, OFERR, George, entre otros (Vonshak *et al.*, 1997, Raof *et al.*, 2006). Buscando la necesidad de lograr un sistema controlado de producción, además del aseguramiento de calidad y que el costo se vea

disminuido, han surgido alternativas de los medios antes mencionados y que se describen en la Tabla 2, 3 y 4.

Tabla 2 - Medios de cultivo y sus componentes para el cultivo de *Espirulina*.

	Medios seleccionados							
	Zarrouk	Zarrouk modificado	RM6	BG11	Conway	Rao's	CFTRI	OFERR
Compuesto químico	Cantidad (g/L)							
MgSO ₄ -7H ₂ O	0.2	0.2	0.15	0.075	-	0.04	1.2	0.16
NaCl	1	5	0.5		-	0.2	1	5
CaCl ₂ -2H ₂ O	0.04	-	0.04	0.036	-	0.008	0.04	-
NaNO ₃	2.5	-	2.5	1.5	100	2.5	1.5	-
NaHCO ₃ , NaCl	16.8	8	8		-	15	4.5	8
FeSO ₄ -7H ₂ O	0.1	-	-	0.006	-		0.01	0.05
K ₂ HPO ₄	0.5	-	-	0.04	-	0.5	0.5	-
EDTA	0.08	-	-	0.02	45	-	-	-
KNO ₃	-	2	-	-	-	-	-	-
DAP (Fosfato diamónico)	-	0.1	-	-	-	-	-	-
K ₂ SO ₄	-	0.1	-	-	-	0.6	1	0.5
CaO	-	0.07	-	-	-	-	-	-
Ácido cítrico	-	-	-	0.006	-	-	-	-
Na ₂ CO ₃	-	-	-	0.001	-	-	-	-
H ₃ BO ₃	-	-	-	-	33.6	-	-	0.052 mL
(NH ₄) ₂ MoO ₄ .	-	-	-	-	2.1	-	-	-
ZnCl ₂	-	-	-	-	2.1	-	-	-
MnCl ₂	-	-	-	-	0.36	-	-	-
CoCl ₂	-	-	-	-	2.1	-	-	-
CuSO ₄	-	-	-	-	2.1	-	-	-
NaH ₂ PO ₄ - H ₂ O	-	-	-	-	20	-	-	-
KCl	-	-	0.898	-	-	-	-	-
Super fosfato simple	-	-	1.25	-	-	-	-	-

Cianocobalamina	-	-	-	-	10 mg	-	-	-
Tiamina	-	-	-	-	20 mg	-	-	-
Hierro	-	0.1	-	-		-	-	-
Oligoelementos	-	0.05	-	-		-	-	-
Stock A5	1	-	-	-		-	-	-
Stock B2	1	-	-	-	-	-	-	-
Atlas et al, 1997; Bhagyalakshmi, y Ravishankar, 2005; Pandey et al., 2010; Madkour et al., 2012								

Tabla 3- Elementos del Stock A5.

Elementos	Nombre	Cantidad (g/L)
H ₃ BO ₃	Ácido bórico	2.86
MnCl ₂	Cloruro de magnesio	1.81
ZnSO ₄ -7H ₂ O	Sulfato de Zinc heptahidratado	0.22
CuSO ₄ - 5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado	0.079
MoO ₃	Oxido de monomio	0.015

Tabla 4- Elementos del Stock B2

Elementos	Nombre	Cantidad (mg/L)
NH ₄ VO ₃	Meta vanadato de amonio	22.96
K ₂ Ca ₂ (SO ₄) ₄ -24H ₂ O	Sulfato cálcico de potasio vigesimocuarto	96
NiSO ₄ -2H ₂ O	Sulfato de níquel hepta-hidratado	47.85
Na ₂ WO ₄ -2H ₂ O	Tungstosódico	17.94
Te ₂ (SO ₄) ₃	Sulfato de Telurio	40
Co(NO ₃) ₂ -6H ₂ O	Nitrato de cobalto hexahidratado	43.98

3. Justificación

A. maxima es una cepa nativa de México y diversos estudios han demostrado el potencial farmacéutico, alimenticio y benéfico para el medio ambiente. Se han reportado diversos medios de cultivo para el crecimiento de esta cianobacteria, desafortunadamente algunos resultan de alto costo, otros no son óptimos para el crecimiento y lo que aún se desconoce es el efecto que pudiera tener la composición de un medio de cultivo en la generación de algún componente(s) de valor nutraceútico. Por lo tanto, en este trabajo de investigación se analizó el crecimiento de *A. maxima* en diferentes medios de cultivo y se analizaron los componentes principales de valor

alimenticio para conocer la efectividad del medio cultivo y aplicación biotecnológica de la *Arthrospira maxima* bajo condiciones controladas.

4. Hipótesis

El uso de diferentes medios de cultivo permitirá la producción de biomasa con distintas características nutricionales y metabolitos en los cultivos de *Arthrospira maxima*.

5. Objetivo general:

Evaluar el efecto de 3 diferentes medios de cultivo sobre el crecimiento y el contenido nutricional de *Arthrospira maxima*.

5.1. Objetivos específicos:

- a) Identificar molecularmente la cepa de *Arthrospira* de estudio.
- b) Obtener las cinéticas de crecimiento de *Arthrospira maxima* en los medios Zarrouk, Zarrouk modificado, BG11 y RM6.
- c) Cuantificar la biomasa producida.
- d) Evaluar el contenido de carotenoides, clorofila y ficocianina.
- e) Determinar el contenido de proteínas y carbohidratos.
- f) Estimar el contenido de lípidos totales y el porcentaje de ácidos grasos.
- g) Establecer la relación costo-beneficio entre los diferentes medios de cultivo utilizados.

6. Metodología:

6.1. Caracterización molecular de la especie:

Se realizó la extracción de ADN utilizando tres diferentes protocolos: Jeffrey Doyle modificado (JDmod), Allers y Lichten (AL) y Allers Lichten modificado (ALmod) teniendo en común el uso de CTAB al 2%, mientras que la concentración de agente quelante (EDTA), Tris-HCl, NaCl, y PVP fue diferente entre los 3. La composición detallada de cada solución se muestra en la Tabla 6.

En todos los casos fue necesario agregar alcohol isoamílico para precipitar los ácidos nucleicos y RNAasa para eliminar el RNA.

Tabla 6.- Soluciones utilizadas en los diferentes métodos de extracción de ADN

Solución		Jeffrey Doyle modificado	Allers y lichten	Allers y Lichten modificado
CTAB I	CTAB	2%	2%	2%
	Tris – HCl	100 mM	200 mM	200 mM

	EDTA	20 mM	50 mM	50 mM
	NaCl	1.4 M	2 M	2 M
	PVP	0.1%	0.5%	0.5%
	2-Mercaptoetanol 0,2%	0.2%	-	-
	Metabisulfito de sodio	0.1%	-	-
Buffer de lavado	Acetato de sodio	0.12 mM	-	0.12 mM
	Etanol al 96°	79%	-	79%
	Agua	2.1 mL	-	2.1 mL
CTAB	CTAB	-	10%	10%
	NaCl	-	0.7 M	0.7 M

Las muestras se sometieron a un proceso de sonicación, evaluando dos amplitudes (amp) (20% y 50% amp). Para cada procedimiento se recolectó biomasa proveniente de 10 mL de un cultivo de 24 días de crecimiento. Se centrifugó para concentrar la biomasa y se eliminó el sobrenadante. Para el procedimiento descrito por Jeffrey Doyle modificado se adicionó a la biomasa resultante 700 μ L de la solución CTAB I para posteriormente incubar por 30 min a 65°C, mezclando cada 4 min en un vortex. En seguida se centrifugó y se separó la fase acuosa. Se adicionaron 4.6 μ L de RNasa (20 mg/mL) y se mezcló por inmersión, para incubar 20 min a 37°C. La precipitación de proteínas se realizó con una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 v/v), después de centrifugar a 13000 rpm a 4°C por 10 min, se recuperó el sobrenadante y se agregó un volumen igual de isopropanol frío (-20°C). Después de incubar a -20°C durante 12 h se concentró el ADN mediante centrifugación a 15000 rpm a 4°C por 5 min. Se agregó 1 mL de buffer de lavado frío (-20°C) (Tabla 6) y se mezcló por inmersión. Después de centrifugar se lavó la pastilla con 1 mL de etanol al 70% frío. Se centrifugó nuevamente a 13000 rpm por 5 min a 4°C y posteriormente se secó la pastilla de ADN a 40°C por 10 min. Finalmente se suspendió la pastilla en agua estéril (20 μ L) y se conservó en congelación (Doyle J,1991).

Para el método Allers Lichten, a la biomasa recuperada se agregaron 1.5 mL de solución CTAB I, se incubó por 30 min y después de centrifugar se separó la fase acuosa. Posteriormente se agregó 1 mL de CTAB II (ver Tabla 6) y se incubó por 30 min, después de centrifugar se precipitaron las proteínas con alcohol isoamílico (14:1 v/v). La precipitación de ADN se realizó con isopropanol frío por 12 h y después de centrifugar se lavó la pastilla con 1 mL de etanol al 70%. Finalmente se suspendió la pastilla en agua estéril (20 μ L) y se conservó en congelación. El método Allers Lichten

modificado se realizó del mismo modo que el método Allers Lichten, con la diferencia de que se adicionó 4.6 μL de RNasa (20 mg/mL) y 1 mL de buffer de lavado (ver Tabla 6) al mismo tiempo que el método Jeffrey Doyle modificado. Se centrifugó y se precipitó la pastilla para posteriormente secar la pastilla de ADN a 40°C por 10 min. Como último paso se resuspendió la pastilla en agua estéril (20 μL) y se conservó en congelación.

A fin de visualizar la calidad del ADN extraído se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 1% con TAE 1X (Tris-HCl 40 mM, pH 8.3, EDTA 2 mM, ácido acético glacial 20 mM) a 100V por 30 min. El gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y se visualizó en un transiluminador con luz ultravioleta. La concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$) y pureza (relación 260/280) del ADN extraído se determinó mediante cuantificación espectrofotométrica utilizando el equipo NanoDrop.

El método con mejor rendimiento y calidad de ADN obtenido sirvió como plantilla para amplificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) al gen 16S ARN ribosomal. Se probaron dos pares de oligonucleótidos universales, el 27F y 1463R, y el 803R y 363F (Tabla 7). La mezcla de reacción se incluye en la Tabla 8 con un volumen final de 25 μL . El ciclado para la PCR en el termociclador está indicado en la Tabla 9. También se amplificó una porción de la subunidad beta de la ficocianina (cpc-B) con un par de oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia de operón de ficocianina B (cpc) identificado en la base de datos Genbank (ID AJ401168.1). Utilizando este identificador y la base de datos de NCBI, con la herramienta Primer Blast, (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) se diseñó una pareja de oligonucleótidos obteniendo los cebadores indicados en la Tabla 7 los cuales amplifican aproximadamente 483 pares de bases. La mezcla de reacción se describe en la tabla 8 con un volumen final de 25 μL , estos valores fueron estimados después de realizar un gradiente de temperatura (50, 52, 54, 56 y 58°C) y un gradiente de concentración de Magnesio (1, 1.5, 2.33, 2.53 y 3 mM). El ciclado en el termociclador se describe en la Tabla 9 para la porción cpc-B.

Tabla 7.- Secuencia de oligonucleótidos

Nombre	Dirección	Secuencia (5' a 3')
803R	Reverse	CTACCRGGGTATCTAATCC
363F	Forward	CAATGGREGURASYCTGAHS
27F	Forward	AGAGTTTGATCMTGGTCAG
1463R	Reverse	TAACTTGTTACGACTT
Fic R	Reverse	TTGGTCTGCCGCGTAGTTAG
Fic F	Forward	GCTGTTCGGTGTTGGCAAAT

Tabla 8.- Mezcla de reacción de PCR para amplificar la porción 16S y cpc-B

Mezcla de reacción	16S	Cpc-B
Buffer 5X (MgCl_2 7.5 mM)	5 μL	5 μL

MgCl ₂ 50 mM	Se incluye en el buffer 5 x	0.41 µL (concentración final de 2.3 mM)
dNTP's	0.5 µL	0.5 µL
Oligonucleotidos (10 µM)	27 forward y 1463 reverse 0.5 µL	Fic forward y Fic reverse 0.5 µL
Taq polimerasa	0.5 µL	0.5 µL
ADN extraído (>50 µg/mL)	1 µL	1 µL

Tabla 9.- Ciclos de PCR finales en el termociclador para amplificar la porción 16S y cpc-B e

Ciclo de PCR		16S	cpc-B
Desnaturalización		95 °C - 3 min	95 °C - 3 min
Ciclos 35 ciclos	Desnaturalización	95 °C - 3 min	95 °C - 3 min
	Alineación	50 °C – 30 s	56 °C – 30 seg
	Extensión	72 °C – 1.5 min	72 °C – 1 min
Extensión final		72 °C – 3 min	72 °C – 3 min

Los amplicones obtenidos se purificaron con el kit de *IBI scientific: Gel/PCR DNA fragments extraction*, siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante. Una vez obtenido una concentración >50 µg/mL y una relación 280/260 cercano a 2, se llevó a secuenciar en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LAMBAMA, IPICYT). La secuencia resultante se alineó con el Software Bioedit 7.2, para obtener una secuencia molde y se comparó con la base de datos del NCBI para realizar un BLAST para identificar el género, especie y cepa de *Arthrospira* con la que se estará trabajando.

Debido a que los resultados obtenidos del análisis por BLAST, tanto con la secuencia obtenida para la amplificación de la región 16S y Cpc-B no fueron concluyentes, se realizó un análisis filogenético utilizando secuencias correspondientes a diversas especies del género *Arthrospira* y la secuencia problema obtenida. Primeramente, se realizó una búsqueda en la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando como palabras clave “phycocyanin beta subunit *Arthrospira*”. Como resultado se encontraron 3 secuencias correspondientes a *Arthrospira maxima* (ABYK01000002.1, AY244672.1, JQ926192.1) 4 secuencias de *Arthrospira platensis* (JQ926189.1, AY672714.1, MH230794.1, EF380357.1), 2 secuencias de *Arthrospira massartii* (KF840316.1, EF680782.1), 2 secuencias de *Arthrospira fusiformis* (AY575941.1, FN433881.1) y 2 secuencias de *Arthrospira indica* (AY575946.1, AY575944.1). Estas secuencias se seleccionaron por la longitud (máximo 500 pb, lo cual es un tamaño similar a la secuencia problema) y a que incluyeran únicamente la subunidad beta de la ficocianina C.

Para este análisis se utilizó el software MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) bajo el criterio de optimización de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean [Método de grupo de pares no ponderados con media aritmética]) (Sneath *et al.*, 2973); el árbol consenso fue inferido de 1000 réplicas (análisis de Boostraping (Felsenstein *et al.*, 2985) y se expresan como porcentaje en cada rama. Este análisis es un soporte estadístico del árbol, el cual se realiza mediante un submuestreo de los datos para obtener réplicas de estos y construir árboles para cada una de las réplicas. Esta metodología permite determinar qué tan confiables son las relaciones deducidas a partir de los datos. Todas las posiciones ambiguas fueron eliminadas para cada pareja de secuencias (opción de eliminación de pares), el conjunto de datos finales incluyó un total de 544 posiciones.

6.2. Medios de cultivo para la producción de biomasa

El crecimiento y mantenimiento se realizó en matraces de 1000 mL. Iniciando con un volumen de 250 mL donde se prepararon los medios Zarrouk, Zarrouk modificado y RM6 (Tabla 2) y se agregaron las sales con agitación moderada en agua destilada (200 mL). Posteriormente los medios se esterilizaron por 20 min a una presión de 15 lb/in². Se agregaron 200 mL de inóculo de la cepa de *E. maxima* y se incubó con una intensidad de luz de 150 μmol fotones/m²·s. Se mantuvo una velocidad de bombeo de 120-150 rpm con fotoperiodo de luz 12 h de luz: 12 h de oscuridad y temperatura de 25°C. Se registraron los indicadores de crecimiento celular (absorbancia de 750 nm) hasta que se llegó a la fase estacionaria (Raouf, 2006).

6.3. Cinética y cuantificación de crecimiento

Cada 24 h se tomó una muestra del cultivo para construir una cinética de crecimiento por espectrofotometría para lo cual se registró la medición de absorbancia a 750 nm para la evaluación de la turbidez del medio (Vieira *et al.*, 2002). Cuando los cultivos llegaron a fase estacionaria se recuperó la biomasa.

6.4. Método de extracción de biomasa

La biomasa se filtró a vacío en un embudo Buchner acoplado a una membrana de celulosa. Se filtraron 20 mL de cada cultivo y el análisis se realizó por triplicado. Posteriormente la membrana conteniendo la biomasa se deshidrató durante 5 h en una estufa a 55°C para finalmente registrar el peso seco.

6.5. Extracción y cuantificación de pigmentos

6.5.1. Clorofila a y carotenoides

Para el análisis de clorofila y carotenoides se realizaron dos métodos diferenciados por el tipo de disolvente empleado. En ambos métodos se utilizaron las muestras de la cinética de crecimiento en fase estacionaria. Se tomaron 1.5 mL de las muestras y se concentró la biomasa mediante centrifugación a 10,000 rpm durante 10

min. El primer método se inició con la adición de agua desionizada, resuspensión de la biomasa y centrifugación para eliminar posibles contaminantes; posteriormente a la pastilla de biomasa se le agregó 1.5 mL de metanol y se mezcló en vortex durante 5 min. Se transfirió la muestra a tubos perforados para calentar a 60°C durante 10 min en un bloque caliente (Termoblock). Posteriormente la muestra fue transferida a otro tubo para recuperar el solvente evaporado. Se mezcló en vortex durante 20 s y se incubó por 24 h a 4°C en oscuridad. Enseguida una centrifugación a 10,000 rpm por 5 min fue realizada, se recuperó el sobrenadante y se midió la absorbancia.

El segundo método implica el uso de acetona después de concentrar la biomasa, después de agitar vigorosamente por 5 min en vortex, se centrifugó a 5700 rpm a 4°C por 10 min. Enseguida se calentó a 60°C en un bloque caliente (Thermoblock) durante 30 min para la evaporación de la acetona. Posteriormente se agregó 1 mL de cloroformo y acetona (1:1, v/v) y se registró la absorbancia.

En ambos métodos la lectura de absorbancia se realizó usando un espectrofotómetro a longitudes de onda de 663 nm para clorofila A, 647 nm de clorofila B y 470 nm para carotenoides. Los rendimientos de los pigmentos se expresaron como µg/mL utilizando las siguientes ecuaciones:

Ecuaciones para determinar la concentración de clorofila A (C_a), clorofila B (C_b), clorofila total (C_{a+b}) y carotenoides totales (C_{x+c})

$$C_a = 16.72 A_{663} - 9.16 A_{647}$$

$$C_b = 34.09 A_{647} - 15.28 A_{663}$$

$$C_{a+b} = 1.44 A_{663} + 24.93 A_{647}$$

$$C_{x+c} = (1000A_{470} - 1.63C_a - 104.96 C_b) / 221$$

Las concentraciones de pigmento obtenidas al insertar los valores de absorbancia medidos son microgramos por mililitro de solución de extracto vegetal (Lichtenthaler, 1987).

6.5.2. Ficocianina

La extracción de este pigmento se debe realizar en condiciones de baja temperatura y con luz tenue para evitar la acción de las proteasas intracelulares que pueden modificar la estructura primaria de las proteínas (Marín-Prida, 2015). Para la estimación cuantitativa de la ficocianina cruda (FC), se recuperó la biomasa de 1.5 mL de cultivo para obtener biomasa fresca para centrifugar y eliminar el sobrenadante. La pared celular de la biomasa se rompió mediante ciclos de congelación/descongelación cada 12 h, una vez descongelado se agregó 1 mL de CaCl₂ al 1.5%, seguida de un almacenamiento a 4°C durante 24 h. La muestra se centrifugó a 4400 rpm a 5°C durante 15 min y se registró la absorbancia del sobrenadante a 615 nm (Ficocianina), a 652 nm (aloficocianina) y a 565 nm (ficoeritrina) (Ilter *et al.*, 2018). El extracto de ficocianina se cuantificó utilizando la ecuación reportada por Bennett y Bogorad (1973):

$$FC_{g/L} = A_{615} - \frac{0.474 * A_{652}}{5.34}$$

Donde, FC = concentración de ficocianina bruta (g/L); A615 = Absorbancia del extracto a 615 nm; y A652 = Absorbancia del extracto a 652 nm.

9.6. Valor nutricional

9.6.1. Cenizas

Para la cuantificación de cenizas se empleó la técnica establecida por la AOAC (Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist), que se basa en un método gravimétrico por la pérdida de peso. Se realizó con 1 g de muestra en polvo de *Arthrospira* crecido en el medio Zarrouk, Zarrouk modificado y RM6. La muestra se agregó en un crisol con peso constante. Se quemó la muestra con mechero bajo campana de extracción, esperando que el humo negro terminara para situarlo a la mufla marca Lindberg SIB a 600°C durante 12 h o hasta que estuviera libre de todos los compuestos que contiene carbono, es decir que presente una coloración gris o blanca. Posteriormente se registró el peso final del crisol con la muestra y se determinó el porcentaje de cenizas con la siguiente ecuación (Achour *et al*, 2014):

$$\% C = \frac{(W_{c+m} - W_c)}{W_m} * 100$$

Donde %C es el porcentaje de cenizas, W_{c+m} es el peso de la muestra más el peso del crisol, W_c es el peso del crisol y W_m es el peso de la muestra.

9.6.2. Humedad

Para la determinación de humedad, 1 g de muestra seca de los tres medios de cultivo fue colocada en una termo-balanza (OHAUS MB45) a 100°C durante 10 min, lo cual permite evaporar el agua para obtener el porcentaje de humedad de las muestras.

9.6.3. Proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó por el método Micro Kjeldahl el cual describe la AOAC (Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist 2005) con un factor de conversión de 6.25 para microalgas, el cual se fundamenta en la determinación de nitrógeno orgánico total y su relación directa con el contenido proteico. La muestra en polvo fue pesada en un tubo Kjeldahl para agregar 1 g de catalizador para proteínas que contiene óxido de mercurio y sulfato de potasio, más 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado, promoviendo la conversión del nitrógeno orgánico a sulfato de amonio. Posteriormente, se introdujo al digestor marca LABCONCO con calentamiento gradual hasta obtener un cambio de coloración en la

muestra. Enseguida la muestra se pasó al destilador Kjeldahl de marca LABCONCO Rapid Kjeldahl system Rapid still II y fue neutralizado con NaOH al 60% y destilado hasta obtener 50 mL. El amoniaco presente se recuperó en seguida sobre un volumen medido de disolución valorada de base (5 mL de ácido bórico saturado y 2 gotas de indicador azul metileno-rojo de metilo); permitiendo así determinar el nitrógeno contenido de la muestra a través de una titulación con HCl al 0.1 N en agitación constante hasta obtener una coloración rosa. El porcentaje proteico se determinó con el uso de la siguiente fórmula (Achour *et al*, 2014):

$$\%p = \frac{(V_{HCl})(N_{HCl})(Meq_N)(factor)}{W_m} * 100$$

Donde V_{HCl} es el volumen utilizado de HCl en la titulación, N_{HCl} es la Normalidad de HCl, Meq_N son los miliequivalentes de Nitrogeno y es igual a 0.14, factor de 6.25 para microalgas (Murcia *et al*, 2018) y para convertir el contenido de nitrógeno a contenido de proteínas y W_m es el peso de la muestra.

9.6.4. Lípidos totales

Se utilizó el método de Soxhlet referido por la A.O.A.C (Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist 2005). Para este método se pesó 1 g de muestra deshidratada (por duplicado) y se colocó en un cartucho hecho a base de papel filtro del número 5, colocándolo dentro del extractor Soxhlet al cual se le añadió éter etílico hasta alcanzar el sifón, con presencia de calor se evaporó el solvente en el matraz hacia el extractor donde se circuló agua por el refrigerante para provocar la condensación del solvente y que entrará en contacto con la muestra seca. cuando condense la cantidad suficiente, se alcanza nuevamente la vuelta del sifón y regresará al matraz arrastrando las sustancias de naturaleza lipídica. Se realizaron 12 extracciones y posteriormente se realizó la prueba del punto final, la cual consiste en dejar caer unas gotas del solvente que está en el extractor sobre papel filtro y al evaporarse el éter quedó una mancha de grasa, la extracción continua, de lo contrario, ha terminado. Posterior a esta etapa, el matraz se colocó en la estufa Felisa HORNO a 100°C durante 4 horas, para finalmente pasar al desecador hasta llegar a peso constante y se registró el peso. La cantidad de grasa se obtiene por diferencia de peso por medio de la siguiente ecuación (Achour *et al.*, 2014):

$$\%L = (W_{m+m} - W_m) - W_0$$

Donde $\%L$ es el porcentaje de lípidos, W_{m+m} es el peso del matraz más el peso de la grasa extraída, W_m es el peso del matraz a peso constante y W_0 es el peso de la muestra colocado en el cartucho.

9.6.5. Perfil de Ácidos grasos

El perfil de ácidos grasos de la muestra de grasa extraída fue determinado por Cromatografía de Gases de los metil-ésteres derivados de los ácidos grasos de las

muestras. El proceso de metilación para la grasa se realizó mezclando 10 mg de muestra con 0.25 mL de una solución al 5% (p/v) de metóxido de sodio en metanol y calentando a 60°C durante 30 min. La reacción de metilación se finalizó con la adición de 0.25 mL de una solución saturada de NaCl. Los metil-ésteres fueron extraídos con 0.5 mL de hexano (grado HPLC), y posteriormente analizados en un cromatógrafo de gases Varian (modelo 3400) equipado con un sistema de inyección con Split ajustado a 250°C y un detector de ionización de flama usando Hidrogeno como gas acarreador. Se utilizó una columna capilar Stabilwax (Restek Corp) de 60 m de longitud x 0.25 mm d.i. y película de fase estacionaria de 0.25 µm, la cual fue calentada a temperatura constante durante 45 min. Cada muestra fue analizada por duplicado. De cada muestra se inyectó por duplicado 2 µL. Los ácidos grasos fueron identificados comparando los tiempos de retención de un patrón comercial de ésteres metílicos de ácidos grasos (Supelco 37 Component FAME Mix) y cuantificados como el porcentaje del área del pico correspondiente con respecto a la suma de las áreas de todos los picos. Los resultados se expresan en porcentaje con base a los ácidos grasos encontrados.

9.6.6. Carbohidratos

La cuantificación de carbohidratos se realizó con la diferencia de porcentaje final con el resto de los resultados de proteínas, lípidos totales, cenizas y humedad. Obteniendo así la suma de todos los componentes nutricionales un total de 100%.

9.7. Evaluación de la relación costo-beneficio:

El análisis de costo-beneficio se realizó respecto al precio señalado por los proveedores con los que se adquirieron los reactivos necesarios para preparar los medios de cultivo. Con base a los datos obtenidos se realizó una tabla para cada medio, con lo cual se comparó el costo y relación con la producción de compuestos proteicos y pigmentos de *Arthrospira*.

9.8. Análisis estadístico

Todos los resultados se analizaron a través de un ANOVA con la prueba de Tukey ($p < 0,05$) en el software MiniTab 2020 con la finalidad de identificar diferencias estadísticamente significativas entre los medios utilizados.

11. Discusión

11.1. Identificación molecular de la especie *Arthrospira*

Para la identificación molecular de la especie fue necesario el proceso de extracción de ADN donde se utilizó una solución buffer o tampón de extracción que agregan agentes quelantes en diferentes concentraciones, siendo el método *Joffrey Doyle* modificado como el mejor método para obtener ácidos nucleicos de *Arthrospira maxima*. Se usaron soluciones de baja o alta fuerza iónica (conteniendo Tris-HCl, NaCl, PVP) y EDTA, el cual se emplea para proteger el ADN de la acción de endonucleasas, capturando los iones magnesio evitando así que actúe como cofactor

de las endonucleasas. El NaCl se emplea para prevenir la contaminación de la muestra con polisacáridos que afectan la pureza del ADN, pudiendo inhibir la actividad de algunas enzimas como polimerasas, ligasas y endonucleasas de restricción; la base para la separación de los polisacáridos de los ácidos nucleicos es su solubilidad diferencial en presencia de NaCl. Para prevenir que el ADN extraído presente coloración gris o parda, se agrega PVP (polivinil pirrolidona), un compuesto con capacidad de enlazar hidrogeno con los compuestos fenólicos evitando la acción de enzimas polifenoloxidasas, enzimas que inician la reacción para ceder electrones libres, combinándose y enlazándose covalentemente, conduciendo a la formación de polímeros marrones, conocido como pardeamiento enzimático (Cariel *et al.*, 2014). El protocolo de extracción emplea también 2-Mercaptoetanol, un antioxidante que escinde enlaces disulfuro ayudando en la desnaturalización de estructuras ricas en GC, en general es usado como agente antioxidante, reductor y estabilizador de enzimas. Para desnaturalizar proteínas, se agregó buffer CTAB I y se incubó a 65°C para retirar las proteínas desnaturalizadas y para los polisacáridos se agrega acetato de sodio, que junto con la centrifugación permite la separación de la membrana, polisacáridos y proteínas de los ácidos nucleicos, los cuales quedan en el sobrenadante. Finalmente se separa el ADN de la fase acuosa, para lo cual se debe precipitar el mismo, usando un alcohol como el isopropanol. También el ARN se remueve adicionando la enzima RNAasa a la solución. Después de precipitado el ADN se disuelve en agua estéril. Se han propuesto varios métodos que hacen uso de lisozima para la lisis celular, esta enzima hidroliza el enlace glucosídico entre el carbono 1 del residuo de ácido N-acetilmurámico (NAM) y el carbono 4 (C4) de la N-acetilglucosamina de los peptidoglucanos presentes en la pared celular de bacterias gram negativas y de cianobacterias pero en los métodos probados en este trabajo no se utilizó la lisozima (Eykelenburg *et al.*, 1977; Margheri *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2000; Saha *et al.*, 2005; Morin *et al.*, 2010; Dorado *et al.*, 2010).

También se evaluó la sonicación en la muestra, evaluando dos amplitudes, 50 y 20 % de amp por 15 s. La sonicación se utiliza en cianobacterias que tienen la capacidad de producir microcistinas, utilizando hasta un 60% de amplitud durante 5 min (Rajasekhar *et al.*, 2012). En las muestras analizadas se observó degradación a una amplitud de 50% por lo que se descartó en este protocolo, se realizó un intento con una amplitud de 20%, obteniendo ADN de buena calidad, pero con posible contaminación de proteínas que se comprobó con la relación 260/280.

En el método de extracción de ADN se debe considerar la interferencia de posibles contaminantes como pigmentos, proteínas o carbohidratos, ya que se busca la separación de estos contaminantes y así obtener un ADN de calidad para continuar con el protocolo de amplificación a través de PCR (reacción de cadena de polimerasa),

la especificidad de los oligonucleótidos y que no exista una interferencia con el ADN no blanco.

Para la identificación molecular de la especie de *Arthrospira* utilizada en este proyecto se utilizaron dos pares de oligonucleótidos universales para amplificar la región 16S de ARN ribosomal y un par de oligonucleótidos del operón de ficocinina β . En la porción 16S de ARN ribosomal, la diferencia entre ambos pares es el sitio de alineamiento, mientras que para la pareja 27F y 1493R se espera un amplicón de 1503 pb, para los cebadores 363F y 803R se esperaba un tamaño de 530 pb, logrando solamente una amplificación con los primeros oligonucleótidos haciendo que la secuencia amplificada sea de una longitud ideal para mejorar la precisión en la determinación taxonómica, ya que es una macromolécula que evidencia la evolución conservada y en algunos casos permite conocer el reino, la familia y algunos casos, el género, además de que se encuentra en las células procariontas o cianobacterias. En la porción 16S de ARN ribosomal hay 10 regiones conservadas que son útiles para el diseño de oligonucleótidos universales y 9 regiones variables logrando un total aproximado de 1500 pb (Figura 10). Lo que se busca es lograr amplificar la mayor cantidad de regiones variables posibles para encontrar con mayor precisión la taxonomía del microorganismo, por lo que los oligonucleótidos 27F y 1493R amplifican todas las regiones (Ortiz-Estrada et al., 2017). La porción ribosomal 16S es un método insuficiente para la distinción de la especie por lo que se ha optado por la amplificación de la porción ITS 16S-23S ARNr o genes pertenecientes del operón de la ficocianina A y B (cpcBA-16S) para la identificación taxonómica de especies de *Arthrospira*, considerando también la observación a microscopio y su morfología (Choi et al., 2012)

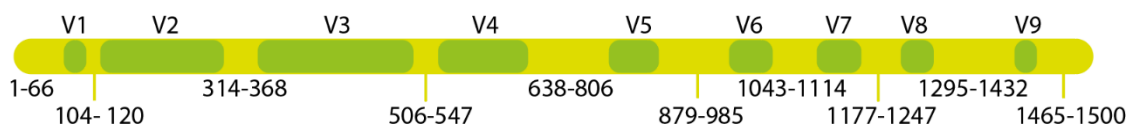


Figura 10.- Representación esquemática del gen 16s de ARN ribosomal. Existen 10 regiones conservadas que flaquean las 9 regiones variables (V1-V9). Es una estimación que corresponde representativa.

La taxonomía tradicional de cianobacterias depende de los caracteres morfológicos, sin embargo, la morfología de las cianobacterias a menudo cambia notablemente del original en diferentes condiciones ambientales y ecológicas. Actualmente, muchos marcadores moleculares, como el gen *rbcL*, el *hoxH* (hidrogenasa de níquel-hierro), el espaciador intergénico de ficocianina (*PC-IGS*), el rRNA 16S y la región ITS, se aplican en los estudios de filogenia y taxonomía en grandes cantidades de organismos (Zhang et al., 2005) incluidas las cianobacterias, pero en el presente estudio se analizó la porción 16S del ARN ribosomal y el operón

de ficocianina β (cpc-B) para determinar que es *Arthrospira maxima* la cianobacteria con la que se trabajó en esta investigación. Los oligonucleótidos usados en la porción cpc- β necesitaron la adecuación de la concentración de $MgCl_2$ a 2.3 mM, ya que es un cofactor relevante para la actividad de la polimerasa y así generar la amplificación esperada.

La morfología del tricoma no se considera una característica morfológica permanente y es por eso, que se debe realizar en conjunto con el análisis genético, ya que puede variar cada tricoma evidenciando que este género cambia los tricomas completamente rectos o en espirales. En la literatura se han evidenciado tres géneros que siguen creando incertidumbre entre los taxónomos y se ha buscado la diferenciación más significativamente entre *A. fusiformis*, *A. jenneri* y *A. maxima*, ya que siguen en tema de discusión para poder diferenciar a nivel morfológico, ya que ambas son plactónicas y se diferencian levemente por el grado en que sus tricomas están enrollados, pero en la figura 4, 5 y 6 se observan tricomas isopolares, cilíndricos, en su mayoría rectos, y en aspiral en el medio RM6 (figura 5-B), no ramificados, más o menos fusiforme, ligeramente contraídos en las paredes transversales, coloración verde-azulada o verde oscuro. Celdas más cortas que anchas. Células con terminales redondeadas y la ausencia de la pared celular externa engrosada o caliptra, característica que permite diferenciar con el género *Limnospira* (Nowicka-Krawczyk *et al.*, 2018). En el medio Zarrouk presenta hélices con mayor longitud cualitativamente, mientras que en el medio RM6 y Zarrouk modificado no hubo diferencias. Aunque no es una característica para considerar con relevancia, ya que la longitud varía en las diferentes etapas de crecimiento de *Arthrospira*.

Se debe considerar también la observación de la presencia o ausencia de vesículas de gas, así como la forma de los ápices para diferenciar con *A. maxima*. Se ha reportado que *Arthrospira maxima* tiene una amplia variación en la forma de los tricomas, es decir, pueden estar en forma recta o en espiral, mientras que *Arthrospira platensis* tiene filamentos más regulares. La disminución o ensanchamiento de los ápices, así como la presencia de vesículas de gas, son características de *A. maxima*. De acuerdo con la división taxonómica de cianobacterias propuesta por Nowicka-Krawczyk *et al* (2018), *A. maxima* tiene hélices helicoidales, regularmente recta y agrupados, mientras que *A. platensis* junto con *A. jenneri*, no contiene vesículas de gas además de tener morfología helicoidal más pronunciada. Mencionado esto, se observa que las muestras presentes en el trabajo en el medio Zarrouk, RM6 y Zarrouk modificado tienen las características morfológicas de *A. maxima*.

Es importante mencionar que el género "*Spirulina*" es el nombre comercial ya que es más fácil de recordar y pronunciar, pero ya está confirmado que no es lo mismo el género *Limnospira*, *Spirulina* y *Arthrospira*. Hoy en día, una amplia gama de estudios ha confirmado que *Arthrospira* y *Spirulina* representan dos géneros independientes,

cada uno clasificado en diferentes órdenes, y además de poseer tricomas enrollados helicoidalmente, los dos comparten una semejanza morfológica mínima, diferenciando también la presencia de una pared celular externa más gruesa respecto al género *Limonspira*. (Wang, 2005; Nossa *et al.*, 2010; Nowicka-Krawczyk *et al.*, 2018).

Debido al escaso estudio morfológico presente en la bibliografía entre *A. maxima* y *A. platensis* se le tomó más relevancia al análisis genético, encontrando que la cianobacteria con la que se trabajó en el presente trabajo es *Arthrospira maxima*.

11.2. Cinéticas de crecimiento:

En las cinéticas de crecimiento de la cianobacteria en el medio Zarrouk, RM6 y Zarrouk modificado se observa la fase exponencial, la fase estacionaria y la fase de muerte a excepción de la fase de latencia y esto se podría deber a que previamente el cultivo de *Arthrospira* se había aclimatado al medio de cultivo para continuar a 1 L, donde se realizaron las lecturas de absorbancia a 750 nm para medir la turbidez del medio y realizar las cinéticas de crecimiento. En el medio Zarrouk modificado y el RM6 lograron llegar a la fase de muerte más pronto que el medio Zarrouk además de lograr una disminución de la tasa de crecimiento obteniendo una densidad óptica menor, esto se puede deber a que las células comienzan a presentar deficiencias nutricionales, y también debido a la sombra de la propia célula por sobrepoblación (autosombreado), lo que reduce aún más la tasa de crecimiento. En el medio Zarrouk no fue posible establecer la fase estacionaria, ya que sigue en crecimiento hasta observarse la fase de muerte en la cinética de crecimiento con valores de hasta 0.7, manteniendo la fase exponencial, y después la fase de muerte, mientras que en el medio Zarrouk modificado y RM6 se observa la fase estacionaria a partir del día 26. Ambos medios lograron llegar a una DO de 0.6 en su fase máxima. La fase de crecimiento estacionario se caracteriza por una tasa de crecimiento equilibrada con la tasa de muerte, por lo que no hay más crecimiento de la población.

Se ha evidenciado que el pH óptimo para el crecimiento de *Spirulina platensis* es pH 9-11. Aunque las células a un pH de 9 tienen la densidad más alta en comparación con otro pH y se activan varias enzimas para funcionar de manera óptima (Kalsum, 2019).

11.3. Biomasa

La extracción de biomasa de cultivos de *Arthrospira* se realiza por métodos de centrifugación, coagulación, filtración, flotación o una combinación de ambas, pero en este trabajo se utilizó la extracción al vacío para separar lo más posible de agua presente en la biomasa. Los resultados obtenidos entre los diferentes medios de cultivo no son estadísticamente diferentes, obteniendo un rango entre 0.1 hasta 1 g por medio de cultivo a pesar de tener el tiempo de crecimiento similar. En el medio

Zarrouk Modificado se obtuvo el valor máximo de biomasa que fue de 1.07 g/L, mientras que el menor valor se registró en el medio RM6 con 0.18 g/L (Tabla 14). En el estudio de Fadel *et al.*, (2012) se obtuvo $0,591 \pm 0,018$ y $0,813 \pm 0,018$ mg/L en medio Zarrouk con fase exponencial de 33 días, similar a estos resultados (34 días). Diversos estudios han demostrado que la concentración de nutrientes y sus formas afecta la morfología (tricomas rectos y sin helicoidal) y actividad metabólica, también influye en la productividad de biomasa, así como en la composición celular (Markou y Georgakakis, 2011). También afecta el contenido proteico y de pigmentos con un aumento de carbohidratos (Olguín *et al.*, 2001; Markou *et al.*, 2014) que se reporta similar a este trabajo.

Se ha evidenciado que una relación 16:1 de nitrógeno / fósforo es adecuado para lograr un alto rendimiento, también conocida como proporción de *Redfield*. Convirtiéndose el fósforo y nitrógeno en elementos importantes para el crecimiento óptimo de microalgas y *Arthrospira maxima*, así como la forma química de agregación de estos nutrientes que es diferente en los medios de cultivo utilizados en el presente trabajo (Tabla 18) (Li *et al.*, 2010; Cai *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014; Moheimani *et al.*, 2015).

De igual manera un factor a considerar es la utilización y absorción de nutrientes a un pH óptimo, la temperatura y el rango de intensidad de luz, lo cual afecta la productividad de biomasa. El pH óptimo descrito por Zhai *et al.*, (2017) es de 7.5-8.9, en el presente trabajo se comenzó en los 3 medios de cultivo con un pH entre 8.1-8.5 estableciendo un pH ideal para su crecimiento (Zhai *et al.*, 2017).

No hay datos en la literatura para comparar el resultado del medio Zarrouk modificado, pero se ha evidenciado que el medio Zarrouk es el medio con mayor rendimiento y más usado, reportando una extracción de biomasa seca mayor en este trabajo que lo indicado por Raouf *et al.*, (2006), mientras que la biomasa obtenida del medio RM6 fue similar a la reportada en el día 15 por el mismo autor, siendo de 0.565 ± 0.314 mg/mL.

Las diferencias de los medios de cultivo que se seleccionaron en el presente trabajo se muestran en la tabla 6.

Tabla 22.- Diferencias en los medios de cultivo de los nutrientes Carbono, Nitrogeno y fosforo

	Carbono	Nitrógeno	Fósforo	Diferencias
Zarrouk	NaHCO ₃ , NaCl	NaNO ₃	K ₂ HPO ₄	
Zarrouk modificado	NaHCO ₃ , NaCl	DAP (Fosfato di amónico)		CaO, KNO ₃ , K ₂ SO ₄
RM6	NaHCO ₃ , NaCl	NaNO ₃	Super fosfato simple	Super fosfato simple KCl

El $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $NaCl$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ se agregan en todos los medios a diferente concentración, el $CaCl_2$ se agrega solo a Zarrouk y RM6, EDTA en Zarrouk.

Considerando que la cianobacteria *Arthrospira* tienen capacidad mixotrófica, es decir, realizar fotosíntesis autótrofa y de asimilación heterótrofa de compuestos orgánicos, concentrando carbono inorgánico del entorno externo (CO_2) y carbono inorgánico del carbonato que usan preferentemente, ya que está en el medio de cultivo en forma de $NaHCO_3$ (Andrade y Costa, 2007; Chaiklahan *et al.*, 2010; Markou y Georgakakis, 2011; Markou *et al.*, 2016), pero cuando este se ve disminuido se activan mecanismos de utilización de CO_2 (Larsdotter *et al.*, 2007). Aunque en las cinéticas de crecimiento del presente trabajo a partir del día 26 se podría sospechar de la activación de este mecanismo en el medio RM6 y ZM (día 15) (Figura 7). Aunque el carbono inorgánico puede dominar la forma útil, evitando pérdidas de nitrógeno y fósforo y así producir más nutrientes, esto influye en su crecimiento oxidativo y por lo tanto en el crecimiento celular, haciendo que el medio Zarrouk, que provee 16.8 g/L de bicarbonato, tuviera un mejor rendimiento o llegara a una DO mayor a comparación de los otros medios (ZM y RM6) que contienen 8 g/L y que las cinéticas de crecimiento tuvieron una duración de 33 días para el medio RM6 y 25-33 días para el medio ZM (Zhai *et al.*, 2017). La cantidad de $NaHCO_3$ mantiene el pH alcalino para una mayor eficiencia de fijación de CO_2 , ya que el burbujeo en el medio reacciona con la base para formar iones de bicarbonato que podrían usarse como fuente de carbono, por lo que el medio ZM y RM6 tienen la cantidad suficiente para el mantenimiento del pH (Cui *et al.*, 2005) haciendo que el $NaHCO_3$ sea la forma dominante de carbono inorgánico dentro del rango de pH 9 a 10. Las cianobacterias y microalgas tienen una enzima llamada anhidrasa carbónica externa (CA) que cataliza la conversión reversible de HCO_3^- a CO_2 y H^+ proporcionado suficiente CO_2 para entrar en la célula y servir como sustrato para la fotosíntesis (Moroney *et al.*, 1985; Husic *et al.*, 1987).

El cultivo mixotrófico posee muchas ventajas sobre otros tipos de metabolismo, incluyendo un aumento de la productividad y crecimiento de cianobacterias, la capacidad de reproducción en altas concentraciones de células pero varía el contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos (Andrade y Costa, 2007; Markou y Georgakakis, 2011; Zhai *et al.*, 2017). Cuando se inicia el crecimiento mixotrófico hay dos procesos distintivos dentro de las células de las cianobacterias, la fotosíntesis y la respiración aeróbica, influenciados por la intensidad de la luz y la concentración de sustrato orgánico, respectivamente, y la temperatura, así como la utilización de nitrógeno y fósforo en procesos abióticos, pero que en el presente trabajo no se modificaron y se mantuvieron constantes en los diferentes medios de cultivo (Zhai *et al.*, 2017).

Se sugiere que para conseguir una mayor producción de biomasa y de bajo costo se podría usar la alimentación de manera continua que consiste en reemplazar periódicamente una parte del medio base con medio nuevo para mantener el volumen

de cultivo, así como una cosecha constante para que no haya un autosombreado y deficiencia en la producción en el medio de cultivo seleccionado.

11.4. Contenido de pigmentos

Los pigmentos naturales como la clorofila, carotenoides y ficocianina extraídos en el presente trabajo tienen un papel importante en el metabolismo fotosintético y pigmentario de *Arthrospira*, y también exhiben actividades biológicas beneficiosas al consumo alimentario como antioxidantes, anticancerígenos, antiinflamatorios, antiangiogénicos, neuroprotectores, estimulan el crecimiento de los tejidos y acelera el proceso de cicatrización de heridas (Halim *et al.*, 2010).

La extracción de clorofilas debe realizarse a temperatura baja y en condiciones de luz tenue para evitar la isomerización y oxidación de los compuestos de interés. Los resultados de extracción dependen de la lisis de la pared celular, de las propiedades del disolvente seleccionado, y de la duración de extracción (Jacob-Lopez *et al.*, 2020), además de hacer más estable el ion Mg^{+} y no ser desplazado por un ácido débil. El método seleccionado en este trabajo implicó el uso de sonicación para el rompimiento de la pared celular y disolvente acetona para penetrar en la membrana celular y lograr disolver los lípidos y lipoproteínas de la membrana de cloroplasto, facilitando la extracción de clorofila y carotenoides (Halim *et al.*, 2010). Se ha reportado que la acetona es el mejor solvente para extraer clorofilas (Jacob-Lopez *et al.*, 2020; Wright *et al.*, 1997; Perez *et al.*, 2018). Es posible realizar la extracción a partir de biomasa fresca, eliminando la mayor cantidad de agua posible para evitar que la enzima clorofilasa degrade las moléculas de clorofila, pero es mejor cuando la biomasa está seca, o tiene un rendimiento mejorado cuando es congelada con nitrógeno líquido seguido de liofilización, posteriormente almacenarla a $-18^{\circ}C$ (Jacob-Lopez *et al.*, 2020).

El contenido de clorofila total depende de la etapa de crecimiento en la que se haga la cosecha de la biomasa, obteniendo una cantidad mayor en la fase estacionaria que en la fase exponencial (Halim *et al.*, 2010). En el presente trabajo se recolectó justo después de la fase estacionaria por lo que se esperaría una disminución de la cantidad, ya que se encuentra en su fase de muerte. Los resultados mostraron que el contenido de clorofila total y clorofila a en el medio Zarrouk y el medio RM6 tuvieron mayor rendimiento a comparación del medio Zarrouk Modificado. Cabe mencionar que las clorofilas son pigmentos fotosintéticos verdosos solubles en lípidos con un anillo de porfirina en su estructura, esenciales para el proceso de la fotosíntesis, proceso que utiliza esta energía luminosa recolectada junto con agua y dióxido de carbono para producir oxígeno y carbohidratos; como tal, convierte la energía solar en energía química. Las clorofilas se encuentran en algas, plantas superiores y cianobacterias. Se han encontrado clorofila A, B, C, D y F, siendo en el presente trabajo medido las

primeras dos, las cuales tienen una absorbancia máxima a 660- 665 nm para clorofila A, mientras que para clorofila B es de 642 – 652 nm. El contenido de clorofila F se ha evidenciado en cianobacterias, pero no se evaluó en el presente trabajo, ya que no se ha determinado la propiedad fotoquímica y foto física en *Arthrospira*, además de tener una limitación lumínica >700 de DO por vivir en cuevas con poca luz. La clorofila D se ha descubierto en organismos procariontas fotosintéticos, pero tiene un espectro de luz en la luz del infrarrojo cercano (700–750 nm) (Jacob-Lopes, 2020).

La síntesis de las clorofilas depende de los requerimientos de luz en las reacciones, aunque también es posible en la oscuridad y es necesario el uso de enzimas. En el caso de la clorofila A, está presente en la antena y los centros de reacción realizando la captación de luz y transferencia de electrones, mientras que clorofila B está en la antena PSII, en antenas periféricas como pigmento secundario que capta luz, pero también estabiliza los complejos de luz. Ambas se diferencian por su peso molecular de 907 g/mol la clorofila B y 839 g/mol para clorofila A, además la presencia de grupo aldehído (formilo) en clorofila B y grupo metilo en clorofila A en la tercera posición de su anillo de cloro, como se muestra en la Figura 11 (Jacob-Lopes, 2020)

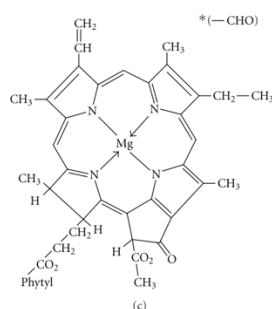


Figura 11.- Representación de la molécula de clorofila A y clorofila B (*)

La biosíntesis de la clorofila se realiza en el cloroplasto y tilacoides e inicia por compuestos intermediarios que provienen del ciclo de Krebs para obtener Succinil A y durante este proceso se necesita de la enzima alfa-cetoglutarato deshidrogenasa y la coenzima A y 2 acetatos. Se unen Succinil A y glicina por la enzima ALA sintasa, proceso dependiente de una molécula Fe⁺, una vez obtenido el compuesto S-ácido aminolevulinico se realiza la formación de las porfirinas por enzimas como la porfobilinogeno sintasa y protogeno oxidasa para obtener porfobilinogeno y protoporfirina IX respectivamente, a partir de aquí se puede añadir una molécula de Mg⁺ para la formación de clorofila o Fe para hemoglobina. La enzima magnesio quelasa realiza la agregación de Mg⁺ con porfirina IX y obtener protoclorofilida para agregar fitol y obtener protoclorofilida A. A partir de aquí la formación de clorofila será dependiente de la presencia o ausencia de luz por la enzima LPOR (presencia de luz) y DPOR (ausencia de luz) respectivamente para obtener la molécula Clorofilliada y así

agregar una molécula de fitol y obtener clorofila A (Bogorad, 1976). Las vías dependientes e independientes de la luz se han confirmado aún más (Jacob-Lopes, 2020).

El contenido de clorofila A en las cianobacterias en el presente trabajo fue de 13.95 µg/mL en medio Zarrouk y 13.38 µg/mL en medio RM6, valores que superaron al medio ZM con 7.5 µg/mL. El medio RM6 y el medio Zarrouk son similares que los reportados de $11,08 \pm 0,006$ µg/mL crecido en fotobiorreactores y 10.8 ± 1.1 µg/mL crecido en biorreactores con condiciones controladas con medio Zarrouk (Streit *et al.*, 2015; Romero *et al.*, 2017), mientras que en el medio RM6 se reportó 0.2320 µg/mL, menor que la presentada en este trabajo (Raouf *et al.*, 2006). No existe en la literatura algún reporte para comparar la producción en el medio Zarrouk modificado, ya que es el primer trabajo en que se utiliza este medio. Pero considerando todo lo anterior, el contenido de clorofila A se ve afectado por la falta de nitrógeno y hierro, componentes importantes del aparato y proceso fotosintético. El nitrógeno es administrado en forma de NaNO₃ en el medio Zarrouk y RM6 en las mismas concentraciones, mientras que en el medio Zarrouk modificado se administra como un fertilizante ampliamente utilizado en los cultivos de plantas, el DAP, considerando que una disminución del contenido de pigmentos se podría deber a la disminución de la actividad fotosintética después de la deficiencia de nitrógeno durante la etapa de crecimiento.

Según Jacob-Lopes *et al.* (2013), hay una relación entre la cantidad de biomasa obtenida, el contenido proteico y el contenido de pigmentos, siendo la disponibilidad de nutrientes (carbono orgánico, nitrógeno y fósforo) un factor principal para el contenido de estos compuestos. La productividad global del pigmento está dada por la relación entre el contenido de clorofila A de la célula y la productividad de biomasa (Tabla 12), obteniendo así una productividad mayor en el medio RM6 de clorofila A en comparación del medio Zarrouk, haciéndolo un medio barato y con productividad alta en clorofila A (Bassi *et al.*, 2018). La luz es otro parámetro para considerar, ya que en el presente trabajo se usó luz blanca, pero se ha evidenciado que la luz en diferente rango de amplitud puede influir en su productividad y crecimiento de *Arthrospira* como lo evidenciado por Niangoran *et al* en 2018 donde se observa un crecimiento similar con luz roja (660 nm).

La legislación en el mercado por el uso de colorantes naturales, evitando la agregación de colorantes artificiales ha hecho que la demanda crezca en fabricantes, así como el propio consumidor en exigir más productos naturales por lo que la extracción de pigmentos como la clorofila, carotenoides y ficocianina debe hacerse en cantidad y calidad para esta exigencia.

Los **carotenoides** son pigmentos con estructura de polienos lineales que actúan como recolectores de energía luminosa, aumentando las propiedades de captación al pasar la excitación a las clorofilas y también son antioxidantes, que inactivan las

especies reactivas de oxígeno (ROS) formadas por la exposición de las células al estrés ambiental (Larkum *et al*, 2005. Loannou *et al*, 2009), y están presentes en los tilacoides, formando complejos proteicos con la clorofila tanto en el PSI y PSII. La presencia de carotenoides en el PSI y en el PSII son carotenoides más conocidos y otros son intermediarios de la carotenogénesis. La sustitución por una gran variedad de grupos que contienen oxígeno y su combinación conlleva la existencia de más de 600 xantofilas (Lemoine *et al*, 2010. Cuellar-Bermúdez. S., 2015) pero dependerán del microorganismo y los factores ambientales. Los carotenoides también se pueden clasificar en carotenos, que son hidrocarburos insaturados, y xantofilas, que presentan uno o más grupos funcionales que contienen oxígeno.

Cuando hay una producción de ROS por el exceso de captación de luz en la reacción fotoquímica de la fotosíntesis, se forma el radical superóxido (O_2), el hidrógenoperóxido (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH) y oxígeno sínglete causando la escisión de la proteína D1 en PSII y puede inhibir la reparación de PSII fotodaño que da como resultado la foto inhibición de la fotosíntesis. Se ha descrito que la iluminación a 150 μ mol de fotones causo aumentos de 5.3, 2.2 y 2.8 veces el contenido de zeaxantina, cantaxantina y astaxantina, respectivamente en *Chlorella Zofingiensis*, *Dunaliella spp.*, *Haematococcus pluvialis* y *Euglena gracilis*. (Li *et al.*, 2009), mientras que otras microalgas necesitaban una intensidad de luz mayor a 150 μ mol de fotones para registrar un aumento en el contenido de carotenoides. En el presente estudio se utilizó una iluminación de 150 μ mol de fotones en un fotoperiodo de 12:12 horas de luz y oscuridad (Demming-Adams *et al.*, 2002).

La temperatura es otro factor para considerar en el contenido de carotenoides y es que la temperatura usada en este protocolo fue de 25°C, siendo la temperatura ideal mayor a 30°C. Se ha evidenciado que en microorganismos como *E. gracilllis* sometidas a un estrés por disminución de temperatura además de estrés inducido por la luz y un aumento de carotenoides podría participar en la reducción de la presión de excitación en PSII (Kato *et al.*, 2019).

En el proceso de extracción de carotenoides no se evitó la temperatura de 55° C para la extracción de clorofila, por lo que se pudo obtener carotenoides con oxidación e isomerización. Además de la elevación de temperatura en el proceso de extracción, en el cultivo también afecta las altas y las bajas temperaturas, la salinidad y el estrés oxidativo, pueden aumentar el grado de fotoinhibición en los organismos fotosintéticos y también pueden inducir la acumulación de carotenoides en las microalgas.

Los carotenoides son reactivos a la luz, la temperatura y el oxígeno, lo que se debe considerar para la extracción y cuantificación de estos pigmentos. No hay datos en la literatura para comparar el contenido de carotenoides producidos en el medio Zarrouk modificado y RM6. Pero los resultados en los medios de cultivo utilizados en este trabajo no reflejaron una diferencia estadística significativa obteniendo el de menor productividad el medio Zarrouk modificado, a comparación de los otros dos

medios (RM6 y Zarrouk). En el estudio de Park et al., (2018) se realizó la estimación de carotenoides presente en biomasa seca obteniendo 4.43 mg/g seca en condiciones similares a las presentes, pero con 130 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ durante 10 días. Se ha evidenciado resultados reportados por Sujatha y Nagarajan (2013) que sometieron a los cultivos a estrés salino (NaCl) y limitación de nitrógeno, en tales condiciones, se incrementó el contenido de carotenoides debido al efecto protector hacia los radicales libres (3.124 $\mu\text{g}/\text{mg}$), pero se obtenían valores similares a los presentados en este trabajo cuando no había un estrés por déficit de NaCl y con 0.01 M de nitrógeno.

No fue posible determinar el tipo de carotenoides, pero en la literatura se ha evidenciado que las cianobacterias contienen β -caroteno, zeaxantina, equinenona y mixolpentosidas (mixoxantofila), composición diferente a los carotenoides de las algas y esto se debe a que, durante la simbiosis de las cianobacterias con las células eucariotas, los carotenoides pueden reestructurarse considerablemente (Takaichi et al., 2007).

Otra manera que tienen las cianobacterias de neutralizar los ROS es la presencia de la proteína carotenoide naranja (OCP), una proteína foto sensorial soluble en agua para la foto protección, la OCP contiene un cromóforo fotoactivo y desencadena la extinción no fotoquímica inducida por la luz que interactúa con ficobiliproteínas, pigmentos también evaluados en el presente trabajo (Kerfeld et al. 2003; Wilson et al. 2006; Harris et al. 2016). La OCP puede también funcionar como extintores de oxígeno sínglete en cianobacterias (Sedoud et al., 2014).

Las **ficobiliproteínas** son pigmentos accesorios que están presentes en el ficobilisoma, un complejo presente en la membrana de los tilacoides. En las cianobacterias está presente la ficocianina, aloficocianina y la ficoeritrina; estas ficobiliproteínas son solubles en agua y de interés principal comercial para su extracción en la industria de alimentos, biopolímeros, colorantes, farmacéutico, cosmético, biología molecular y ciencias biomédicas (Mishra et al., 2012). En el presente trabajo se ha seleccionado el método descrito por Ilter et al., (2018) utilizando CaCl_2 al 1.5% y la lisis celular por congelación y descongelación. Se han usado diversos métodos de extracción de ficocianina de la biomasa de *Arthrospira platensis*, tanto físicos como químicos, destacando la dificultad del rompimiento de la pared celular que está compuesta de 4 capas de peptidoglucano, fibrilla, proteínas y análogos de bacterias gram negativa. Los métodos que se han utilizado para la extracción de ficobiliproteínas incluyen homogenización, sonicación, ondas de microondas, agregación de lisozima y extracción con fluidos supercríticos. Se seleccionó el método de congelación y descongelación en el cual se usa biomasa fresca, ya que existen reportes que indican que el uso de biomasa fresca mejora la eficiencia de extracción respecto al uso de biomasa seca, incluso se ha señalado una pérdida aproximada de 50% de este pigmento debido a la posición periférica de los

ficobilisomas y su sensibilidad a la temperatura del proceso de secado (Abalde, 1998; Doke, 1998; Minkova *et al.*, 2003; Soni *et al.*, 2006). También se ha realizado la utilización de soluciones tampón (tampón fosfato) con sonicación o ultrasonido como pretratamiento de disrupción celular. Sin embargo, los tiempos de pretratamiento no deben ser prolongados para evitar la desestabilización de las proteínas, resultados obtenidos en las muestras de este proyecto, descartando su implementación. Como se mencionó, el extracto de ficocianina no es por mucho tiempo estable, ya que las condiciones como la luz, la temperatura y otros microorganismos inducen la descomposición de las proteínas por lo que la extracción se realizó a luz tenue, a temperatura ambiente y con biomasa recién extraída. Los registros indican que la ficocianina era estable en un rango de pH de 5 a 7,5 a 25 ° C para su almacenamiento (Cuellar-Bermúdez, 2015).

El contenido de ficocianina también depende de la presencia de luz, en Prates *et al.*, (2018) se utilizaron factores similares a las de este trabajo, pero controlando la luz blanca (3200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) que fue mayor que el presente trabajo (150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) con contenido de ficocianina en 46.36 mg/g de biomasa seca; aunque también se ha registrado que el uso de luz LEDs en diferente espectro de luz a la luz blanca, obteniendo que la luz verde (126,39 mg/g de biomasa seca) permite potenciar el contenido de este pigmento por ser fotosensible y aumentar las proteínas cromóforas, incrementando la cantidad de ficobilisomas por célula (Ilter *et al.*, 2018). Estos datos no son comparables a los reportados por Silveira *et al.*, 2007 donde utilizan biomasa seca, mientras que en este trabajo se utilizó biomasa húmeda y extraída directamente del cultivo sin cuantificar la biomasa disponible, utilizando la formula descrita por Bennet y Bogorad (1973).

No se evaluó el contenido de aminoácidos en el presente trabajo mismo que está relacionado con el contenido de proteínas y compuestos proteicos como la ficocianina, el cual depende del contenido de nitrógeno disponible. Kathiresan *et al.*, (2006) estudiaron el efecto de los macronutrientes presentes en los medios de cultivo sobre la producción de la ficobiliproteína ficoeritrina en *P. cruentum*, y encontraron que la producción se ve afectada también por la concentración de fosfato, cloruro y sulfato.

11.5. Contenido de Nutrientes

11.5.1. Proteínas

El contenido de proteínas resultante en *Arthrospira maxima* en los diferentes medios de cultivo no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes medios de cultivo: en el medio Zarrouk fue de $29.4 \pm 8.85\%$, el medio RM6 en $40.42 \pm 7.95\%$, y el medio ZM de $32.19 \pm 3.9\%$. Un contenido por debajo de lo descrito por Prates *et al.*, (2018) que registro valores de $54.53 \pm 0.5 \%$ en medio Zarrouk en condiciones similares a las del presente trabajo, pero con 18 días de cultivo,

además de ser el análisis en biomasa seca liofilizada de *Spirulina* LEB 18. Para el medio RM6 se ha evidenciado un porcentaje de 60% después de 18 días de crecimiento, mientras que la el medio Zarrouk modificado no se muestran resultados para comparaciones debido a que es la primera vez que se analiza el valor nutricional. Los datos del presente trabajo se muestran por debajo del contenido nutricional característico de *Arthrospira* o *Espirulina* y esta diferencia se le puede atribuir a la posible deficiencia de Nitrógeno y posible utilización de CO₂. La utilización de nitrógeno en este microorganismo tiene preferencia por el amoníaco o urea, y el consumo de nitrato solo cuando no hay amonio disponible, como lo citó anteriormente Becker (1994) para *Chlorella*, *Scenedesmus* y *Spirulina*, esta fácil asimilación del amoniaco es debido a la simplicidad de su molécula e inhibición de la actividad nitrogenasa. La urea es una buena fuente de nitrógeno, según Meeks *et al.* (1983), ya que es metabolizada por cianobacterias a través de la actividad de enzimas como la ureasa y la urea almidón liasa, produciendo dos átomos de nitrógeno, mientras que el nitrato solamente produce uno, lo que contribuye a una asimilación más productiva. La *Espirulina* todavía es capaz de utilizar nitrógeno del nitrato porque según Odum (1983) esta estructura es la más común en la naturaleza, molécula que se usaron en el presente trabajo, pero que todavía no se ha establecido una vía metabólica y su regulación que este responsable con el contenido de proteico (Viera *et al.*, 2001; Ali *et al.*, 2008; Lochab *et al.*, 2009.)

Se han encontrado resultados similares a los descritos en el presente trabajo con un contenido de proteínas de 16 a 21% por Silva *et al.*, (2018) en cultivos con modificación de CO₂ y control de pH, mostrando que la limitación de nitrógeno y carbono se relaciona con una concentración decreciente en el contenido de proteínas, aumentando el contenido de carbohidratos y lípidos. Resultados que se detallaran en los siguientes párrafos.

11.5.2. Lípidos

El contenido de lípidos totales en el presente trabajo no presentó diferencias estadísticamente significativas entre el medio Zarrouk ($6.1 \pm 0.25\%$), el medio RM6 ($4.13 \pm 1.42\%$) y el medio ZM ($5.05 \pm 1.34\%$). El contenido de lípidos en *Spirulina platensis* según Kalsum *et al.*, (2019) puede ir de 4-16% rango reportado en el presente trabajo y esto depende de la asimilación de fosfato de microalgas, el pH, la concentración de sodio, la concentración de potasio, la concentración de magnesio y la presencia de metales pesados en el medio, que puede afectar el desarrollo de los resultados de dependencia de la concentración.

El método de extracción es un determinate del contenido de lípidos extraído. El método Soxhlet fue utilizado en la extracción de lípidos, ya que es el mejor método para obtener una gran cantidad de lípidos por la repetición del proceso de extracción,

pero también depende del disolvente o mezcla de estos utilizado. La técnica se basa en la naturaleza de la grasa que no es soluble en agua ni en disolventes polares, pero que solo se puede disolver en disolventes no polares (Kalsum *et al.*, 2019). Ryckebosch *et al.*, (2011) probaron diferentes disolventes para la extracción de lípidos en cuatro especies de algas (*N. salina*, *S. obliquus*, *C. vulgaris* y *A. platensis*) y encontraron que el cloroformo-metanol 1: 1 (% v / v) permite una extracción más alta de lípidos totales (13.2% en *A. platensis*), mientras que en el presente trabajo se utilizó éter etílico, ya que es el protocolo sugerido por A.O.A.C (Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist) en la industria de alimentos. El éter etílico es un solvente muy eficiente para lípidos totales (polares, fosfolípidos, AG de cadena corta y no polares) y se ha evidenciado la absorción de casi el 10% de agua, extrayendo también compuestos hidrosolubles como azúcares y sales de una fuente alimentaria, pero se sugiere la utilización de biomasa seca para eliminar los peróxidos y evitar el enranciamiento de los lípidos extraídos previamente. También se ha evidenciado que el uso de éter dietílico en microalgas se ha obtenido una mayor cantidad de lípidos polares y un rendimiento menor comparado con otros solventes orgánicos como el hexano, cloroformo, etanol, metanol o la combinación (Perez *et al.*, 2018). El uso de biomasa seca también permite que no se realice un pretratamiento de biomasa, pero disminuyendo del contenido de humedad podría afectar el desempeño de la extracción, a mayor contenido de agua podría adicionarse isopropanol o antioxidantes para inactivar las lipasas para evitar la oxidación, pero en este trabajo se utilizó biomasa seca por lo que no fue necesario agregar estos compuestos (Cuellar-Bermúdez, 2015).

Las microalgas pueden acumular entre 20-30% de lípidos totales cuando se cultivan en condiciones ideales para su crecimiento, mientras que si se cultivan bajo condiciones de estrés y falta de nutrientes, las microalgas pueden acumular mayor porcentaje de lípidos o carbohidratos como en el presente trabajo, cabe mencionar que el nitrógeno no es un nutriente que determine el contenido de lípidos que durante la etapa de cultivo de *A. maxima* (>30 días) pudo disminuir la disponibilidad, así como la diferencia del reactivo que provee nitrógeno. Se obtuvo un contenido de lípidos esperado, pero el contenido proteico estuvo por debajo de lo evidenciado y los carbohidratos aumentados, que se detallara más adelante (Piorreck *et al.*, 1984; Perez *et al.*, 2018)

Los lípidos también deben separarse de los carbohidratos, las proteínas o las sales para mejorar la extracción o el análisis, y que podría ver una interferencia por el método de extracción utilizado. Palmquist y Jenkins, (2003) propusieron el uso de la hidrólisis ácida para romper los enlaces de lípidos con otros compuestos, aumentando el rendimiento de extracción, pero en el presente trabajo no se usaron (Cuellar-Bermúdez, 2015)

En relación con el perfil de ácidos grasos (AG) Prates *et al.*, (2018) observaron un contenido de 40% de ácidos saturados y 60% insaturados, de los cuales 44.4% fueron poliinsaturados (PUFAs) encontrándose en mayor proporción el ácido palmítico (C16: 0), linoleico (C18:2) y γ -linolénico (C18: 3 n-6). La proporción de estos ácidos grasos en la biomasa no difirió ($p > 0.05$) entre los diferentes LED y fotoperíodos evaluados y el experimento de control en medio Zarrouk. Por otro lado, en el presente trabajo se obtuvo un contenido similar de ácidos saturados de 40% para el medio Zarrouk y el medio ZM y 26.2% para el medio RM6. Para los ácidos insaturados fue de 60% en medio Zarrouk y ZM, 74% para el medio RM6. Obteniendo resultados similares que Prates *et al.*, (2018).

El ácido graso con mayor porcentaje en el perfil de AG en *Arthrospira maxima* en el presente trabajo es el ácido γ -linolénico (Z: 54%, RM6: 64%, ZM: 48%), ácido palmítico (Z: 5%, RM6: 7.5%, ZM: 7.4%), y ácido linoleico (Z: 1.5%, RM6: 5.7%, ZM: 6.1%) los que se presentaron en mayor cantidad. Estos AG son los mismos expresados en mayor porcentaje reportado por Rahman *et al.*, (2017) y Prates *et al.*, (2018) en *Spirulina maxima* pero con cantidades diferentes, ya que el AG con mayor literatura reportada su mayor producción es el ácido palmítico (40,20%), seguido de AG linoleico (17,87%) y AG γ -linolénico (17,34%). Esta producción de AG depende de la especie y se ve afectado por condiciones de cultivo como nutrientes, salinidad, periodos de intensidad lumínica, temperatura, pH e incluso la asociación con otros microorganismos (Cuellar-Bermúdez, 2015). En el presente trabajo se modificaron los diferentes medios de cultivo donde el nitrógeno disponible se obtuvo del NaNO_3 (Zarrouk y RM6) y el fertilizante DAP (ZM) por lo que la disponibilidad de nitrógeno vario entre estos, pero no fue un determinante para limitar su disponibilidad y aumentara la expresión del contenido de lípidos, estrategia utilizada cuando se quiere aumentar el contenido de lípidos neutros en las algas, principalmente formados por los triglicéridos con alto grado de saturación para la producción de biodiesel. Sin embargo, el déficit de nitrógeno produce una reducción de la productividad de la biomasa, algo que se observó en el medio RM6 y ZM. Esto se ha evidenciado en especies de microalgas como *Chlorella vulgaris*, *Chlorella zofingiensis*, *Neochloris oleoabundans* y *Scenedesmus obliquus* (Cuellar-Bermúdez, 2015). Por otro lado, la intensidad de la luz y temperatura son factores importantes para la producción de lípidos, ya que diversos estudios sugieren que una alta intensidad de luz y una alta temperatura favorecen la acumulación de triglicéridos con alto perfil de saturación (Floreto *et al.*, 1993; Van Wagenen *et al.*, 2012). Mientras tanto, las bajas intensidades de luz y la baja temperatura promueven la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados, siendo esto lo último una posible causa del aumento del ácido γ -linolénico (poliinsaturado), dejando en segundo lugar el contenido de ácido palmítico (saturado) que mostró diferencias estadísticas significativas entre el medio Zarrouk y los otros dos medios. Además de

una concentración menor en lo descrito en la bibliografía con concentraciones cerca de 40% (Muhling *et al.*, 2005). (Cuellar-Bermúdez, 2015). El pH también puede afectar el metabolismo de los lípidos, ya que el estrés de pH en *Chlamydomonas sp.* aumentó el contenido de lípidos totales en comparación con valores de pH más altos (Tatsuzawa *et al.*, 1996). Sin embargo, en *Chlorella spp.* el pH alcalino acumulo triacilglicéridos (Guckert y Cooksey, 1990. Cuellar-Bermúdez, 2015), aunque en los medios de cultivos se mantuvo entre 8 y 11.8 el pH, rango ideal para el crecimiento de *A. máxima* durante el crecimiento, permitiendo el aprovechamiento de nutrientes, mientras que si el pH era mayor o cerca de 12 el cultivo empezaba la fase de muerte.

Enfocándose en los ácidos poliinsaturados que son objeto de interés debido a los beneficios para la salud asociados al consumo (Wen *et al.*, 2003; Sijtsma *et al.*, 2004), estos incluyen el ácido α -linolénico (ALA 18: 3 ω -3), ácido γ -linolénico (GLA, 18: 3 ω -6), ácido eicosapentaenoico (EPA, 20: 5 ω -3), ácido araquidónico (ARA, 20: 6 ω -6) ácido docosapentaenoico (22: 5 ω -3) y ácido docosahexaenoico (DHA, 22: 6 ω -3) (Fraeye *et al.*, 2012; Ryckebosch *et al.*, 2012). En el presente trabajo se encontró un mayor porcentaje de ácido γ -linolénico en los tres medios de cultivo, siendo el medio RM6 el de mayor producción a comparación con el medio Zarrouk (53.66%) y el medio ZM (42.33%). Un ácido graso esencial para la nutrición y la salud humana, ya que es precursor de los ácidos grasos ω -3 mencionados anteriormente y según Adarme-Vega *et al.*, (2012) el consumo brinda importantes beneficios para la salud, particularmente en la reducción de enfermedades cardíacas como arritmias, derrames cerebrales y presión arterial alta. Además, tienen efectos beneficiosos contra la depresión, la artritis reumatoide, el asma y se pueden utilizar para el tratamiento de enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa, la psoriasis, el lupus y la fibrosis quística (Pulz *et al.*, 2004). Por ser un ácido graso esencial se ha buscado la producción y extracción adecuada para un aumento y calidad de este metabolito de interés, siendo la principal fuente de extracción del ácido γ -linolénico el *Mortierella ramanniana* (hongo), semillas de onagra y *Espirulina*, pero de acuerdo a Oliveira P, *et al.*, (1999) se podría superar el contenido de la principal de *Mortierella ramanniana*, ya que se ha registrado 15% de lípidos totales y ácido γ -linoleico de 24%, mientras que en el presente trabajo *Arthrospira maxima* obtuvo un contenido mayor a 58% del perfil de ácidos grasos. Previamente Habib *et al.*, (2008) consideró a *Arthrospira* como una fuente rica de este ácido graso.

El ácido palmítico (C16:0) puede ser transformado a ácido oleico (Ácido *cis* octadec-9-enoico) por la ruta ácido esteárico y palmítico, luego de procesos de elongación y de saturación, y este es importante para la etapa de embarazo y lactancia, crecimiento infantil, transporte y metabolismo del cerebro, así como el control en enfermedades cardiovasculares convirtiéndolo en un ácido graso saludable para su consumo (Jacob-Lope, *et al.*, 2018)

El contenido de ácido undecanoico en el presente trabajo está en una concentración de 23,47% en el medio Zarrouk, 12.2% en RM6 y 21.7% en ZM, comparado con la evidencia científica donde no se ha encontrado una concentración significativa (Prates *et al.*, 2018. Romero *et al.*, 2011), o una concentración menor a

3.35% volviéndolo un AG de interés, ya que se utiliza como agente antifúngico dérmico, productos de higiene personal, cosméticos y perfumería. Se ha encontrado que extractos en disolventes orgánicos de *Arthrospira* son eficaces contra *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* y *Candida albicans* y podría ser por la presencia de AG undecanoico (Oltu *et al.*, 2019).

11.5.3. Carbohidratos

El contenido de carbohidratos en el estudio de Prates *et al.*, (2018) fue de $11.72 \pm 0.44\%$ hasta $14.01 \pm 1.96\%$ en medio Zarrouk y en cultivo de 18 días, mientras que el porcentaje en el presente trabajo fue de 48.2% en medio Zarrouk, 35.6% en RM6 y 51.86% en Zarrouk Modificado. En condiciones similares se ha evidenciado un contenido de 47-63% en *Espirulina sp.* LEB 1, cultivado con medio con 0.25 g/L de NaNO₃ (Zarrouk contiene 2.5 g/L), diferentes concentraciones de CO₂, y cenizas como nutrientes (Silva-Braga *et al.*, 2018). Muchas microalgas producen grandes cantidades de proteínas, pero en este trabajo se presentó mayor concentración de carbohidratos que se debió a la capacidad mixotrófica al usar CO₂ como fuente de carbono, esto debido a que durante el crecimiento de la biofijación de CO₂ de las microalgas a través de la fotosíntesis (Silva-Braga *et al.*, 2018). Por otro lado, la limitación de nitrógeno promueve la biosíntesis de almidón en lugar de proteínas y clorofila (Wang *et al.*, 2009. Turpin, 1991), carbohidratos de reserva y que pueden transformarse en componentes de la pared celular (Braga *et al.*, 2019). En este mismo estudio se menciona que el carbono proveniente de NaHCO₃ tiene una duración de 6 días en el medio Zarrouk (16.8 g/L), por lo que a partir de este tiempo se activa la actividad mixotrófica, haciendo que la capacidad de almacenar carbohidratos aumente y el CO₂ se convierte en la segunda fuente de carbono (Silva-Braga *et al.*, 2018. Wood *et al.*, 1992). *S. platensis* realiza un mecanismo eficiente en respuesta al aumento de CO₂ ambiental para mantener el equilibrio entre carbono y nitrógeno.

11.5.4. Relación costo- beneficio

Para probar la viabilidad económica del medio de cultivo y uso, se llevó a cabo un análisis simple de gasto de nutrientes (Tabla 18). El carbono, el nitrógeno y el fósforo son los elementos fundamentales de la biomasa de algas. En esta investigación, el medio de cultivo más costoso fue el Medio Zarrouk (\$2.9 pesos) pero con una producción de biomasa seca mayor, aunque si se compara con el medio RM6 y ZM no hay diferencia estadísticamente significativos ($p > 0.05$), sin embargo, si hubo diferencias estadísticamente significativas en compuestos industriales de interés: proteínas, pigmentos y lípidos. El primer compuesto de interés, las proteínas, resultaron en menor cantidad y sin diferencia estadísticamente significativa en los tres medios de cultivo.

El medio RM6 es 73% menos costoso que el medio Zarrouk, sin embargo, presentó un contenido similar al medio Zarrouk en biomasa seca, clorofila total, clorofila A y ficocianina, así como un contenido proteico de $40.42 \pm 7.9\%$, siendo el mayor porcentaje entre los medios de cultivo, aunque sin diferencias estadísticamente significativas. En particular el perfil de ácidos grasos resultó en mayor porcentaje el ácido γ -linolénico y ácido palmítico a comparación del medio ZM y Zarrouk. Por lo que su uso del medio RM6 es una opción económica para la producción de estos compuestos (ácidos grasos) es una opción más económica.

El medio Zarrouk Modificado es 85% menos costoso que el medio Zarrouk, pero se obtuvo un contenido de compuestos de interés menor; proteínas y ficocianina con diferencias estadísticamente significativas en estas última, por lo que no es el medio ideal para la producción de pigmentos, así como la producción ácidos grasos de interés comercial.

La principal restricción a la industria de la *Espirulina* es el costo relativamente alto de cultivo en cada paso, aunque sea de manera continua, ya que se ha evidenciado que el costo para producir 1 kg de biomasa seca de *Espirulina* representa aproximadamente el 30% del costo, por lo que el uso de medios de cultivos más económico, pero con un rendimiento en la producción de compuestos de interés en la industria resulta ser mayor interés (Cui *et al.*, 2019). Y es que la industria depende de esto para que los precios de comercialización y venta sean menores, aunque también es de interés poder ofrecer productos de calidad que dependerán de los procesos de extracción de los compuestos de interés que puede representar del 50-80% de los costos totales, por las características químicas del compuesto de interés y la pureza que se quiera lograr, pero esto dependerá de la evaluación de los métodos usados para su extracción y reducción de costo (Cuellar-Bermúdez *et al.*, 2015).

12. Conclusiones

- El análisis filogenético realizado con la secuencia obtenida a partir de la amplificación del operón de la ficocianina β (cpc-B) determinó que la especie con la que se trabajó en este proyecto corresponde a ***Arthrospira maxima***.
- La cinética de crecimiento de *A. maxima* en el medio Zarrouk y el medio RM6 fue mayor a 30 días, presentando un contenido de biomasa seca y pigmentos mayor en comparación con el medio ZM.
- El contenido de proteínas de *A. maxima* no fue estadísticamente diferente entre los 3 medios evaluados ($32.19 \pm 3.9\%$ a partir del medio ZM, $29.4 \pm 8.8\%$ para el medio Zarrouk y $40.42 \pm 7.95\%$ en RM6).
- La cantidad de lípidos obtenida a partir de los diferentes cultivos de *A. maxima* no fue estadísticamente significativa (ZM: $5.05 \pm 1.34\%$ Z: $6.1 \pm 0.25\%$ RM6: $4.13 \pm 1.42\%$).

- El contenido de carbohidratos en el medio ZM fue de 51.86%, para el medio Zarrouk de 48.21% y RM6 de 35.61%.
- El AG que se produjo en mayor cantidad en los tres medios de cultivo fue el ácido γ -linolénico (RM6: 63.84%, Z: 53.66%, ZM: 47.66%), registrándose en el medio RM6 con un porcentaje superior estadísticamente significativo entre los tres medios de cultivo. El AG que ocupa el segundo lugar en cantidad registrada en los tres medios de cultivo fue el ácido undecanoico (C11:0) que se encuentra con mayor porcentaje en el medio Zarrouk (23.47%) y ZM (21.72%). En tercer lugar, se encontró el ácido palmítico (C16:0) con un porcentaje de 7.48% en el medio RM6 (7.48%) y 7.41% en el medio ZM.
- El contenido de ficocianina fue mayor en el medio Zarrouk (0.7812 ± 0.3698) en comparación con el obtenido en el medio RM6 y ZM, con diferencias estadísticamente significativas.
- El medio RM6 es 73% más económico que el medio Zarrouk, aun así, el contenido de proteínas, biomasa seca, clorofila total, clorofila A fue similar al medio Zarrouk.
- El medio RM6 es de bajo costo para el cultivo de *A. maxima*.
- Si se plantea la producción de *Athrospira maxima* como suplemento alimenticio en polvo, se recomienda usar el medio RM6 debido a que es más económico, obteniendo así un valor nutricional similar al medio Zarrouk, mismo que se sugiere si se busca producir el pigmento ficocianina.

13. Bibliografía

- Acosta, Y. J. Cayama, E. Gómez, N. Reyes, D. Rojas, D. & García, H. (2006). Respiración microbiana y prueba de fitotoxicidad en el proceso de compostaje de una mezcla de residuos orgánicos. *Multiciencias*. 6(3), 220-227.
- Ananyev, G., y Dismukes, G. C. (2021). How fast can photosystem II split water? Kinetic performance at high and low frequencies. *Photosynth. Res.* 84, 355-365.
- Andrade, B. Cardoso, L. Assis, D. Vieira, J. Druzian, J. & Cunha, S. (2019). Production and characterization of *Spirulina sp. LEB 18* cultured in reused Zarrouk's medium in a raceway-type biorreactor. *Bioresource Technology*, 284, 340-348.
- Arias, D. García, J. Uggetti, E. (2020). Production of polymers by cyanobacteria grown in wastewater: Current status, challenges and future perspectives. *New biotechnology*. 55, 46–57.
- Babadzhanov, A.S., Abdusamatova, N., & Yusupova, F.M. (2004). Chemical Composition of *Spirulina platensis* Cultivated in Uzbekistan. *Chemistry of Natural Compounds* 40, 276–279.

- Bao, J. Zhanga, X. Zhenga, JH. Rena, DF. & Lub, J. (2018). Mixed fermentation of *Spirulina platensis* with *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis* by random-centroid optimization. *Food Chemistry*. 264, 64–72.
- Barros, C & Buenrostro M. (1999). La alimentación prehispánica en la obra de Sahagún (artículo de revista). *Arqueología Mexicana*. 6: 38-45, Recuperado de <https://arqueologiamexicana.mx/mexico-antiguo/la-alimentacion-prehispanica-en-la-obra-de-sahagun>
- Bermejo, P. Piñero, E. & Villar, A. (2008). Iron-chelating ability and antioxidant properties of phycocyanin isolated from a protean extract of *Spirulina platensis*. *Food Chemistry*. 110 (2), 436-445.
- Bhat VB, Madyastha KM. (2000). C-phycocyanin: a potent peroxy radical scavenger in vivo and in vitro Biochemical. *Biophysical Research Community*. 275, 20-25.
- Blé-Castillo, JL. Rodríguez-Hernández, A. Miranda-Zamora R. Juárez-Oropeza, M. & Díaz-Zagoya, J. (2002). *Arthrospira maxima* prevents the acute fatty liver induced by the administration of simvastatin, ethanol and a hypercholesterolemic diet to mice. *Life Sciences*. 70(22), 2665-2673.
- Braga, V. S., Moreira, J. B., Costa, J. A., & Morais, M. G. de. (2019). Enhancement of the carbohydrate content in *Spirulina* by applying CO₂, thermoelectric fly ashes and reduced nitrogen supply. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 1241–1247.
- Campbell J., Stevens S.E. & Balkwill D.L. (1982). Accumulation of Polyhydroxybutyrate in *Spirulina platensis*. *J. Bacteriology*. 149, 361-363. DOI: 10.1128/jb.149.1.361-363.1982
- Chiu, H., Yang, S., Kuo, Y., Lai, Y., & Chou, T. (2000). Mechanisms involved in the antiplatelet effect of C-phycocyanin. *British Journal of Nutrition*. 95. 2: 435-440. DOI:10.1079/BJN20051643
- Colla, L.M. Reinehr, C.O. Reichert, C. & Vieira, J.A. (2007). Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresource Technology*. 98 (7). 1489-1493.
- Cuellar-Bermudez, S. P., Aguilar-Hernandez, I., Cardenas-Chavez, D. L., Ornelas-Soto, N., Romero-Ogawa, M. A., & Parra-Saldivar, R. (2015). Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: Essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. *Microbial Biotechnology*, 8(2), 190–209.
- Dadheech P., Ballot A. Casper P. Kotut K. Novelo E. Lemma B. Pröschold T. & Krienitz L. (2010). Phylogenetic relationship and divergence among planktonic strains of *Arthrospira* (*Oscillatoriales*, Cyanobacteria) of African, Asian and American origin deduced by 16S–23S ITS and phycocyanin operon sequences, *Phycologia*, 49(4), 361-372. doi: 10.2216/09-71.1
- Dehghani, J., Adibkia, K., Movafeghi, A., A., Pourseif, M. M., Maleki, H. & Omid, Y. (2018). Stable transformation of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis*: a promising microalga for production of edible vaccines. *Applied Microbiology Biotechnology*. 102 (21), 9267–9278. doi: 10.1007/s00253-018-9296-7

- Delsin S.D., Mercurio D.G., Fossa M.M. & Campos, M. (2015). Clinical efficacy of dermocosmetic formulations containing *Spirulina* extract on young and mature skin: effects on the skin hydrolipidic barrier and structural properties. *Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics*. 4 (4). doi: 10.4172/2167-065X.1000144
- Desmorieux, H. & Decaen, N. (2005). Convective drying of *Spirulina* in thin layer. *Journal of Food Engenering*. 66 (4): 497-503, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2004.04.021
- Dineshkumar, R. Narendran R. & Sampathkumar, P. (2015). Cultivation of *Spirulina platensis* in different selective media. *Indian Journal of Geo Marine Sciences*. 45 (12): 1749-1754. Recuperado de [http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/40537/1/IJMS%2045\(12\)%201749-1754.pdf](http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/40537/1/IJMS%2045(12)%201749-1754.pdf)
- Elshobary, M.E., Osman, M., Abu-Shady, A.M., & Piercey-Normore, M. (2015). Comparison of Lichen-Forming Cyanobacterial and Green Algal Photobionts with Free-Living Algae. *Cryptogamie Algologie*. 36(1):81-100.
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 39(9),783-791. doi: 10.1111/j.15585646.1985.tb00420.x
- Gang-Guk C. Chi-Yong A. Hee-Mock O. (2015). Phylogenetic relationships of *Arthrospira* strains inferred from 16S rRNA gene and *cpcBA-IGS* sequences. *Algae*. 27 (2), 75-82, doi: 10.4490/algae.2012.27.2.075.
- García-Garibay, M. Gómez-Ruiz, L. Cruz-Guerrero, A.E. Barzana, E. (2013). Single-Cell protein | Algae. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second Edition). Suiza: Springer Nature Switzerland.
- Glazer, A. (1985). Light harvesting by phycobilisomes. *Annual Review Biophysics Chemistry*, 14, 47-77. doi: 10.1146/annurev.bb.14.060185.000403
- Gouveia, L. (1996). Evolution of pigment composition in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 57(2), 157–159, doi:10.1016/0960-8524(96)00058-2
- Guerrero, M. Rodríguez, H. Vargas, M. García-González, M. del Campo, J. Moreno, J. Rivas. J. (2013, 6 de junio). Las microalgas como productoras de pigmentos con interés comercial. Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis. *Universidad de Sevilla-CSIC*. 8: 215-232. Recuperado de <https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/10773/CC%2048%20art%2011.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Hernández-Lepe, M. Wall-Medrano, A. Juárez-Oropeza, M. Ramos-Jiménez, A. Hernández-Torres, R. (2015). *Spirulina* y su efecto hipolipemiente y antioxidante en humanos: una revisión sistemática. *Nutrición Hospitalaria*, 32(2), 494-500. <https://dx.doi.org/10.3305/nh.2015.32.2.9100>
- Ho, S.-H., Huang, S.-W., Chen, C.-Y., Hasunuma, T., Kondo, A., & Chang, J.-S. (2013). Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella vulgaris*. *FSP-E. Bioresource Technology*, 135, 157–165. doi:10.1016/j.biortech.2012.10.10

- Hoseini, S. Khosravi-Darani K. & Mozafari, M. (2013). Nutritional and medical applications of *Spirulina* microalgae. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 13 (8). 1231 - 1237. doi: 10.2174/1389557511313080009
- Hu J. Li Y. Pakpour S. Wang S. Pan Z. Liu J. Wei Q. She J. Cang H. & Zhang R.X. (2019). Dose effects of orally administered *Spirulina* suspension on colonic microbiota in healthy mice. *Frantiers in cellular and infection microbiology*. 9, 243. doi: 10.3389/fcimb.2019.00243
- Huarachi-Olivera. R. Yapó-Pari, U. Dueñas-Gonza, A. González-Juárez, R. Condori-Huamanga, J. Pacheco-Salazar, D. & Soto-Flores, J. (2015). Adaptabilidad de *Spirulina (Arthrospira) platensis (Cyanophyta)* en fotobiorreactor tubular cónico bajo condiciones ambientales. *Idesia*, 33(1), 103-112. doi: 10.4067/S0718-34292015000100011
- İlter I. Akyıl S. Demirel Z. Koç M, Conk-Dalay M. & Kaymak-Ertekin F. (2018). Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using different techniques. *Journal of Food Composition and Analysis*, 70, 78-88, doi:10.1016/j.jfca.2018.04.007.
- Jacob-Lopes, E. Queiroz, & Zepka, M. (2020). Pigments from microalgae handbook. Suiza, Springer Nature Switzerd .
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., & Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 35:1547-1549.
- López-Alarcón, C. Aspée, A. & Lissi, E. (2007). Antioxidant reactivity evaluated by competitive kinetics: Influence of the target molecule concentration. *Food Chemistry*. 104 (4): 1430-1435. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.02.006
- Madhubalaji, C. K., Rashmi, V., Chauhan, V. S., Shylaja, M. D., & Sarada, R. (2019). Improvement of vitamin B12 status with *Spirulina* supplementation in Wistar rats validated through functional and circulatory markers. *Journal of Food Biochemistry*. doi:10.1111/jfbc.13038
- Madkour, F. Kamil, A. Nasr, H. (2012). Production and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*. 38 (1): 51-57. doi: 10.1016/j.ejar.2012.09.003
- Marín-Prida, J. Llópiz-Arzuaga, A. Pavón, N. Pentón-Rol, G. Pardo-Andreu, G. (2015). Aplicaciones de la c-ficocianina: métodos de obtención y propiedades farmacológicas. *Revista de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias*. 1: 29-43. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/280923028_La_c-ficocianina_metodos_de_obtencion_y_propiedades_farmacologicas
- Markou, G. Chatzipavlidis, I. Georgakakis, D. (2012). Effects of phosphorus concentration and light intensity on the biomass composition of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28: 2661–2670. doi: 10.1007/s11274-012-1076-4
- Mühling, M., Somerfield, P. J., Harris, N., Belay, A., & Whitton, B. A. (2006). Phenotypic analysis of *Arthrospira (Spirulina)* strains (cyanobacteria). *Phycologia*, 45(2), 148–157. doi: 10.2216/05-21.1

- Mühling, M. Somerfield, P. Harris, N. Belay, A. & Whitton, B. (2006). Phenotypic analysis of *Arthrospira* (*Spirulina*) strains (Cyanobacteria). *Phycologia*. 45. 148-157, doi: 10.2216/05-21.1.
- Narasimha, D. Venkataraman, G. Surinder K. Duggalb & Bjorn-Eggum, C. (1982). Nutritional quality of the blue-green alga *Spirulina platensis*. Geitler. *Journal of the Sciences of Food and Agriculture*. 33 (5): 456-460 doi: 10.1002/jsfa.2740330511
- Neyrinck A, Taminiou, B. Walgrave H, Daube, G, Cani, P. Bindels, L. & Delzenne, N. (2017). *Spirulina* protects against hepatic inflammation in aging: an effect related to the modulation of the gut microbiota?. *Nutrients*. 9, 633, doi:10.3390/nu9060633
- Nishanth R, Ramakrishna B, Jyotsna R, Roy K, Reddy G, Reddy P, & Reddanna P. (2010). C-Phycocyanin inhibits *MDR1* through reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 mediated pathways in human hepatocellular carcinoma cell line. *European Journal of Pharmacology*. 649, 74–83. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.09.011
- Nossa, C. W. Oberdorf, W. E. Yang, L. Aas, J. A. Paster, B. J. Desantis, T. Z. Brodie, E. L. Malamud, D. Poles, M. A. & Pei, Z. (2010). Design of 16S rRNA gene primers for 454 pyrosequencing of the human foregut microbiome. *World journal of gastroenterology*, 16(33), 4135–4144, doi: 10.3748/wjg.v16.i33.4135
- Nowicka-Krawczyk, P., Mühlsteinová, R. & Hauer, T. (2019). Detailed characterization of the *Arthrospira* type species separating commercially grown taxa into the new genus *Limnospira* (Cyanobacteria). *Sci Rep*. 9, 694 doi:10.1038/s41598-018-36831-0
- Ogbonda, K.H. Aminigo, R.E. & Abu, G.O. (2006). Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina sp.* *Bioresource Technology*. 98 (11): 2207-2211. doi: 10.1016/j.biortech.2006.08.028
- Oltu I, Cepoi L. Rubic V. Rubi L. Chiriac T. Valuta T. & Codreanu S. (2019) Current Research and New Perspectives in Antifungal Drug Development. Cham, Springer.
- Ortiz-Villota, M. T., Romero-Morales, M. A., & Meza-Rodríguez, L. D. (2018). La biorremediación con microalgas (*Spirulina maxima*, *Spirulina platensis* y *Chlorella vulgaris*) como alternativa para tratar la eutrofización de la laguna de Ubaque, Colombia. *Revista de investigación, desarrollo e innovación*. 9(1), 163-176. doi: 10.19053/20278306.v9.N1.2018.8153
- Papapanagiotou G. & Gkelis S. (2019). Taxonomic revision of commercially used *Arthrospira* (Cyanobacteria) strains: a polyphasic approach. *European Journal of Phycology*, 54(4), 595-608, DOI: 10.1080/09670262.2019.1624832
- Ponce-López, E. (2013). Superalimento para un mundo en crisis: *Spirulina* a bajo costo. *Idesia (Arica)*, 31(1): 135-139. doi: 10.4067/S0718-34292013000100016

- Rajasekar, P. Palanisamy, S. Anjali, R. Vinosha, M. Elakkiya, M. Marudhupandi, T. Tabarsa, M. You, SG. & Prabhu, N. (2019). Isolation and structural characterization of sulfated polysaccharide from *Spirulina platensis* and its bioactive potential: In vitro antioxidant, antibacterial activity and Zebrafish growth and reproductive performance. *International Journal of Biological Macromolecules*. 141: 809-821, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.09.024.
- Rajasekhar, P. Fan, L. Nguyen, T. & Roddick, F. (2012). Impact of sonication at 20 kHz on *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena circinalis* and *Chlorella sp.* *Water Research*, 46, 5, 1473-1481. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.017>.
- Ramadan M.F, Asker M.M.S, & Ibrahim Z.K (2008). Functional bioactive compounds & biological activities of *Spirulina platensis* lipids. *Czech Journal of Food Sciences. Sci*, 26: 211-222.
- Rámirez-Moreno, L. & Olvera-Ramírez, R. (2006). Uso tradicional y actual de *Spirulina sp.* (*Arthrospira sp.*). 31: 657-663. Recuperado de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006000900008&lng=es&tlng=es.
- Raooof, B. Kaushik, B.D. & Prasanna, R. (2006). Formulation of a low-cost medium for mass production of *Spirulina*. *Biomass and Bioenergy*. 30 (6): 537-542. doi: 10.1016/j.biombioe.2005.09.006.
- Ravelonandro, P. Ratianarivo, D. Joannis-Cassan, C. Isambert, A. Raherimandimby, M. (2011). Improvement of the growth of *Arthrospira (Spirulina) platensis* from Toliara (Madagascar): Effect of agitation, salinity, and CO₂ addition. *Food and Bioprocess Technology*. 89 (3), 209-216, doi: 10.1016/j.fbp.2010.04.009.
- Reichenbach, H., Ludwig, W. & Stackebrandt, E. (1986). Lack of relationship between gliding cyanobacteria and filamentous gliding heterotrophic eubacteria: comparison of 16S rRNA catalogues of *Spirulina*, *Saprospira*, *Vitreoscilla*, *Leucothrix*, and *Herpetosiphon* *Archives of microbiology*. 145, 391–395.
- Riss, J. Décordé, K. Sutra, T. & Delage, M. Baccou, JC. Jouy, N. Brune, JP. Oréal, H. Cristol, JP. & Rouanet, JM. (2007) Phycobiliprotein C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* is powerfully responsible for reducing oxidative stress and NADPH oxidase expression induced by an atherogenic Diet in Hamsters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55 (19): 7962-7967. doi: 10.1021/jf070529g
- Rivera, C. Zapata, A. Pinilla, G., Donato, J. Chaparro, B. & Jiménez, P. (2005). Comparación de la estimación de la clorofila-a mediante los métodos espectrofotométrico y fluorométrico. *Acta Biológica Colombiana*. 10(2): 95-103.
- Romay, Ch. Armesto, J. Ramirez, D. Gonzales, R. Ledon, N, & García, I. (1998). Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoyanin from blue-green algae. *Inflammation Research*. 47 (1): 36–41. doi: 10.1007/s000110050256
- Romero, L. Guevara M. Gomez B. Arredondo-Vega, B. Cortez, R. & Licet, B. (2017) Production of pigments from *Arthrospira maxima* cultivated in

- photobioreactors. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 19(1). 118 – 114, doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.59671
- Romero, L. Guevara, M. Arredondo-Vega, B. Gómez, B. Licett, B. & Freites, L. (2011). Contenido de lípidos, ácidos grasos, exopolisacáridos y minerales de *Arthrospira maxima* cultivada en fotobiorreactores. *Agronomía Tropical*, 61(3-4), 231-240.
- Romero, L. Guevara, M. Gómez, B. Arredondo-Vega, B. Cortez, R. & Licet, B. (2017). Producción de pigmentos procedentes de *Arthrospira maxima* cultivada en fotobiorreactores. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19: 108-114.
- Ruiz F. Ruiz J, Hernández J. García, R. & Valadez A. (2019). Extracción y cuantificación de clorofila en hojas comestibles del estado de Tabasco. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 4, 891-896.
- Saini, D. Pabbi, S. & Shukla, P. (2018). Cyanobacterial pigments: Perspectives and biotechnological approaches. *Food and Chemical Toxicology*. 120: 616-624. doi: 10.1016/j.fct.2018.08.002
- Sarada, R. Pillai, M. & Ravishankar, G. (1999). Phycocyanin from *Spirulina sp*: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction method and stability studies on phycocyanin. *Process Biochemistry*. 34: 795 – 801.
- Shimamatsu, H. (2004). Mass production of *Spirulina*, an edible microalga. *Hydrobiologia*. 512: 39-44, doi: 10.1023/B: HYDR.0000020364.23796.04
- Silva, J. M., Farias, B. S., Gründmann, D. D. R., Cadaval, T. R. S., Moura, J. M., Dotto, G. L. and Pinto, L. A. A. (2016), Development of chitosan/*Spirulina* bio-blend films and its biosorption potential for dyes. *J. Appl. Polym. Sci.*, 134, 44580. doi: 10.1002/app.44580
- Soni, R. Sudhakar, K. & Rana, R. (2017). *Spirulina* - From growth to nutritional product: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 69: 157-171. doi: 10.1016/j.tifs.2017.09.010
- Streit, N. Jacob-Lopes, E. Zepka, L. Ramírez-Mérida, L. & Queiroz, M. (2016). Producción de pigmentos naturales (clorofila-a) en biorrefinerías agroindustriales. *Ciencia y tecnología*. 8, 27-34, doi: 10.18779/cyt.v8i2.108
- Subhashini, J. Suraneni V. Mahipal, K. Madhava, C. Mallikarjuna, M. Rachamalla, A. & Reddanna, P. (2004) Molecular mechanisms in C-Phycocyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562. *Biochemical Pharmacology*. 68 (3), 453-462, doi: 10.1016/j.bcp.2004.02.025.
- Sujatha, K. & Nagarajan, P. (2013). Optimization of growth conditions for carotenoids production from *Spirulina platensis* (Gletler). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2 (10), 325-328.
- Van Eykelenburg C. (1977) On the morphology and ultrastructure of the cell wall of *Spirulina platensis*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 43(2), 89-99, doi: 10.1007/BF00395664.
- Vieira Costa, J.A., Colla, L.M., Filho, P.D. Kabke, K. & Weber, A. (2002). Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18, 603–607, doi: 10.1023/A:1016822717583

- Vonshak, A. (2002). *Spirulina platensis (Athrospira)*: Physiology, Cell-biology and Biotechnology. Londres: *Taylor & Francis Inc.*
- Wang, Z.P. & Zhao, Y. (2005), Morphological reversion of *spirulina (arthrospira) platensis* (cyanophyta): from linear to helical. *Journal of Phycology*, 41: 622-628, doi:10.1111/j.1529-8817.2005.00087.x
- Yu, P., Li, JR. & Cen, PL. (2002) Cloning and sequencing of the phycocyanin gene from *Spirulina maxima* and its evolutionary analysis. *Journal of Applied Phycology*, 14, 307–310, doi: 10.1023/A:1021177414835
- Yuan, D., Yao, M., Wang, L., Li, Y., Gong, Y., & Hu, Q. (2019). Effect of recycling the culture medium on biodiversity and population dynamics of bio-contaminants in *Spirulina platensis* mass culture systems. *Algal research*, 44, doi: 10.1016/j.algal.2019.101718
- Zhai J. Li x. Li W, Rahaman H, Zhao Y, Wei B, & Wei H. (2017) Optimization of biomass production and nutrients removal by *Spirulina platensis* from municipal wastewater, *Ecological Engineering*. 108, 83-92, doi:10.1016/j.ecoleng.2017.07.023.
- Zhu W, Chiu LC, Ooi VE, Chan PK, Ang PO Jr. (2004). Antiviral property and mode of action of a sulfated polysaccharide from *Sargassum platens* against herpes simplex virus type 2. *International Journal of antimicrobial Agents*. 24 (3), 18–25, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2004.02.022