

## Producción de pigmentos por *Aphanothece microscopica* Nägeli a partir de residuos industriales lácteos

*Pigment production by Aphanothece microscopica Nägeli from dairy industrial waste*

Nívia M. Streit<sup>1</sup> Luis G. Ramírez-Mérida<sup>2\*</sup> Leila Queiroz Zepka<sup>3</sup>  
Eduardo Jacob-Lopes<sup>3</sup> Maria I. Queiroz<sup>1</sup>

Recibido 5 de marzo de 2015, aceptado 17 de junio de 2016  
*Received: March 5, 2015 Accepted: June 17, 2016*

### RESUMEN

Los sistemas basados en el uso de microalgas para la obtención de bioproductos son considerados un área prometedora para aplicaciones industriales. El objetivo del trabajo fue evaluar la producción de ficobiliproteínas y clorofila-*a* cuando *Aphanothece microscopica* Nägeli es cultivada en sistemas autotróficos y heterotróficos. Para ello, se desarrollaron sistemas de cultivos heterotróficos (en ausencia de luz) y autotróficos (2 klux de intensidad luminosa) en biorreactores a pH 7,6, 20 °C, 1 vvm de aireación, empleando como medios de cultivo un efluente de industria láctea con relación C/N 20 y N/P 10, y BG11. Inóculo inicial 200 mg/L. Se efectuó el monitoreo de concentraciones de clorofila-*a* y ficobiliproteínas en fase logarítmica y estacionaria. Se observaron las mayores concentraciones de pigmento en la fase logarítmica: mayores concentraciones de clorofila-*a* en cultivos autotróficos y predominio de aloficocianina y ficoeritrina en cultivos heterotróficos. Los resultados mostraron el efecto de las variables en estudio para la producción de pigmentos, en la fase de crecimiento logarítmico, lo que indica la posibilidad de producir en sistemas heterotróficos de *Aphanothece microscopica* Nägeli, aproximadamente 3.185 ton/año de biomasa, para 3.127 kg/año clorofila, 232.825 kg/año ficocianina, 47.775 kg/año aloficocianina y 7.008 kg/año ficoeritrina, cuando se utiliza efluente de industria láctea como medio de cultivo.

Palabras clave: Biorrefinería, cianobacterias, clorofila, efluentes lácteos, ficobiliproteína.

### ABSTRACT

*The systems that use microalgae to obtain bioproducts are considered a promising area for industrial applications. The objective of this work was to evaluate the production of phycobiliproteins and chlorophyll-a by Aphanothece microscopica Nägeli, when it is cultivated in autotrophic and heterotrophic systems. Thus, the cultures were grown in heterotrophic (absence of light) and autotrophic (2 klux of light intensity) system, in bioreactors at pH 7.6, 20 °C, 1 vvm aeration, using a dairy industry effluent, with C/N 20 and N/P 10, and BG11 as culture media. Initial inoculum 200 mg/L. The concentrations of chlorophyll-a and phycobiliproteins in logarithmic and stationary phase were monitored. The highest concentrations of pigment were observed in logarithmic phase: The highest concentrations of chlorophyll-a*

<sup>1</sup> Escuela de Química y Alimentos. Laboratorio de Biotecnología. Universidade Federal do Rio Grande. Eng. Alfredo Huch 475, CEP 96201-900. Rio Grande, RS, Brasil. E-mail: niviast@mail.ufsm.br; mariaisabel.queiroz@pesquisador.cnpq.br

<sup>2</sup> Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Tecnología, Centro de Biotecnología Aplicada. Universidad de Carabobo. Av. Universidad, 2002, Valencia, Venezuela. E-mail: luisguillermolgrm@gmail.com; lgramire@uc.edu.ve

<sup>3</sup> Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria. Av. Roraima 1000, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: zepkaleila@yahoo.com.br; jacoblopes@pq.cnpq.br

\* Autor de correspondencia

*in autotrophic cultures, and predominance of allophycocyanin and phycoerythrin in heterotrophic cultures. The results show the effect of the variables under study for pigment production, bearing in mind the logarithmic growth phase, suggesting the possibility of producing in heterotrophic systems by Aphanothece microscopica Nägeli, around 3,185 ton/year of biomass, and 3,127 kg/year of chlorophyll, 232,825 kg/year of phycocyanin, 47,775 kg/year of allophycocyanin and 7,008 kg/year of phycoerythrin, when dairy effluent is used as culture medium.*

**Keywords:** Biorefinery, chlorophyll, cyanobacteria, dairy waste, phycobiliprotein.

## INTRODUCCIÓN

Las microalgas son una fuente natural de muchos compuestos biológicamente activos como proteínas, ácidos grasos poliinsaturados, vitaminas y pigmentos fotosintéticos como clorofila, carotenoides y ficobiliproteínas; estas últimas son exclusivas de algas rojas, criptomonas y cianobacterias. Los sistemas basados en el uso de microalgas para la obtención de bioproductos son considerados un área emergente prometedora para aplicaciones industriales [1]. Varios estudios han aportado elementos importantes para el desarrollo de industrias de alimentos, química, farmacéutica y ambiental [2]. Con base en las características espectrales de las ficobiliproteínas, estas se pueden dividir en tres clases: ficoeritrina, ficocianina y aloficocianina; siendo utilizadas como colorantes naturales en la industria de alimentos: goma de mascar, productos deshidratados, helados, gelatinas, entre otros [3]. Por otro lado, estas ficobiliproteínas han sido utilizadas como marcadores fluorescentes unidas a otras proteínas de interés clínico, además en pruebas inmunológicas basadas en microscopia de fluorescencia, ensayos de DNA, marcadores no radioactivo. Su alta capacidad antioxidante también ha llamado la atención en el área médica y en formulaciones cosméticas [3].

En este sentido, las cianobacterias han despertado un gran interés biotecnológico por su empleo en procesos de biorrefinería, que resulta en la generación de productos de forma integrada a partir de fuentes renovables [4, 2]. El cultivo de las cianobacterias puede afectarse por algunos aspectos fisicoquímicos, por lo que generar altas productividades de pigmentos requiere controles en sistemas de iluminación, fotobiorreactores adecuados y empleo de nutrientes económicos [5]. De allí que el empleo de efluentes industriales ricos en materia orgánica, nitrógeno y fósforo han sido utilizados como medio de cultivo.

Por lo tanto, la bioconversión de residuos agrícolas, por cianobacterias, y procesos de biorrefinería para la producción de compuestos como proteínas, lípidos y pigmentos le dan valor agregado a los residuos agroindustriales, resultando en beneficios económicos y ambientales [6-7].

A pesar de que *A. microscopica Nägeli* posee algunas ventajas como su fácil cultivo y bajo tiempo de generación celular en efluentes agroindustriales; en lo que concierne a la producción de pigmentos, es un tema que aún no se ha explorado debidamente. Por lo que, el objetivo de la investigación fue evaluar la producción de pigmentos (clorofina-*a* y ficobiliproteínas), cuando *A. microscopica Nägeli* es cultivada de manera autotrófica y heterotrófica en residuos industriales lácteos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Microorganismo y mantenimiento de cultivo madre.** Se utilizó *A. microscopica Nägeli* (RSMAN92) aislada en el estuario de Laguna de los Patos, Rio Grande do Sul, Brasil (32°01'S-52°05'W). Fue preparado y mantenido en medio agarBG11 (Braun-Grunow), a 25 °C, 2klux de iluminación, fotoperíodo de 12h, pH 7,6 y agitación constante [8].

**Métodos de cultivo.** Se prepararon cultivos autotróficos y heterotróficos.

**Cultivo autotrófico:** se utilizó BG11 según especificaciones químicas [8].

**Cultivo heterotrófico:** se empleó agua residual recolectada en la salida de los tanques de equalización de procesamiento de una industria láctea ubicada en Pelotas, RS, Brasil. Las muestras fueron transportadas al laboratorio y congeladas a -18 °C hasta su utilización. El efluente fue caracterizado en cuanto a pH, demanda química de oxígeno (DQO),

nitrógeno total (NTK), fósforo (P-PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>), sólidos totales (ST), sólidos fijos (SF) y sólidos volátiles (VS), Tabla 1, según el procedimiento APHA [9].

**Biorreactores.** Se utilizaron reactores de columna de burbujas, de vidrio borosilicato para sistemas autotróficos y de policloruro de vinilo (PVC) para sistemas heterotróficos, con espesor de 0,5 mm, diámetro interno de 10 cm y altura de 100 cm, con volumen total de trabajo de 5 L. El sistema de dispersión de gases estuvo conformado por un difusor de 1,5 cm localizado en el centro de la base de la columna. El tiempo de mezcla del biorreactor fue 5 s y un KLa de 0,002 s<sup>-1</sup>.

Tabla 1. Caracterización del agua residual procedente del procesamiento de productos lácteos.

Parámetros	Media±DS
Potencial hidrogeniónico	9,40±0,13
Demanda química de oxígeno	1478,30±810,10
Nitrógeno total Kjeldahl	32,01±14,60
Fósforo total	23,01±0,84
Sólidos totales	2608,30±602,50
Sólidos fijos	1290,40±731,60
Sólidos volátiles	1317,90±618,10

**Obtención de datos cinéticos.** Se trabajó bajo sistema discontinuo en condiciones autotróficas y heterotróficas. Las condiciones experimentales fueron: inóculo de 200 mg/L, pH inicial 7,6, temperatura 20 °C, aireación de 1 vvm, intensidad de iluminación 2 klux para el sistema autotrófico y ausencia de luz en el sistema heterotrófico. El medio utilizado para el sistema heterotrófico fue ajustado para la razón C/N 20 y N/P 10. Las muestras fueron recolectadas en intervalos regulares de 4 y 8 h, para ambas condiciones: autotróficas y heterotróficas. La densidad celular fue determinada por gravimetría, utilizando filtro Millipore (0,45 µm) y secado a 60 °C por 24 h [10].

**Parámetros cinéticos.** Los parámetros cinéticos fueron determinados en base a la metodología descrita en trabajos anteriores [2, 10]. La productividad celular ( $P_x$ , mg/L.h) se calculó mediante la variación de pesos de la biomasa seca ( $X$ , mg/L) dentro de un período de cultivo ( $t$ , h) de acuerdo con la ecuación:

$$P_x = \frac{X_1 - X_0}{t_1 - t_0} \tag{1}$$

La máxima tasa de crecimiento celular ( $\mu_{max}$ , h<sup>-1</sup>), se calculó utilizando la ecuación:

$$\mu_{max} = \frac{\ln(X_1 / X_0)}{t_1 - t_0} \tag{2}$$

En el que  $X_1$  y  $X_0$  representa el peso seco de la biomasa (mg/L) en una hora  $t_1$  y  $t_0$  respectivamente.

El tiempo de generación celular ( $t_g$ , h) se calculó mediante la ecuación:

$$t_g = \frac{\ln(2)}{\mu_{max}} \tag{3}$$

**Evaluación de la producción de pigmento.** Clorofila-*a* y ficobiliproteínas (ficocianina, ficoeritrina y aloficocianina) se monitorearon al inicio del cultivo, en la fase logarítmica y en fase estacionaria. La biomasa celular fue extraída por centrifugación y posterior filtración. Posteriormente fue secada a 60 °C, por tres días. Para la determinación de la concentración de clorofila-*a* fue secada la biomasa a 60 °C y se procedió a la extracción en acetona 90%. El sobrenadante fue transferido para tubos de ensayo mantenidos en oscuridad, hasta su cuantificación espectrofotométrica a 664 nm, 647 nm y 630 nm [11].

Para la determinación de ficobiliproteínas fue necesario someter la biomasa a ruptura celular por ciclos de congelamiento (-8 °C) y descongelamiento (25 °C) durante 2 h, posteriormente se realizó la extracción utilizando buffer fosfato pH 5,5 [12]. El sobrenadante se transfirió a tubos de ensayo mantenidos en oscuridad, hasta su lectura espectrofotométrica. La cuantificación de ficocianinas y aloficocianinas se realizó a longitudes de onda de 614 y 651 nm, respectivamente, mientras que las ficoeritrinas fueron determinadas en el intervalo de 500-651 nm [11]. La concentración de proteína total se realizó mediante el método de Lowry, utilizando albúmina bovina como patrón [13]. Todas las muestras fueron determinadas por triplicado, los datos fueron analizados mediante estadística descriptiva utilizando *Statistica 7.0*.

## RESULTADOS

La Figura 1, presenta las curvas de crecimiento de *A. microscopica* Nägeli para los sistemas autotrófico (1a) y heterotrófico (1b). Se observa que para ambas curvas, no existe fase de adaptación. En la curva (1a) la fase logarítmica indica crecimiento exponencial hasta 196 h para el cultivo autotrófico, y la curva (1b) de 15,45 h para el cultivo heterotrófico; para luego percibirse la entrada en fase estacionaria. La máxima velocidad de crecimiento ( $\mu_{max}$ ), tiempo de generación ( $t_g$ ) y concentración celular alcanzada en cultivo heterotrófico, fueron  $0,066 \text{ h}^{-1}$ , 10,50 h y 590 mg/L; mientras que para cultivo autotrófico  $0,0068 \text{ h}^{-1}$ , 102 h y 960 mg/L, respectivamente.

Tabla 2. Relación de ficocianina y aloficocianina con base en la concentración de proteína unicelular de *Aphanothece microscopica* Nägeli en sistemas autotrófico y heterotrófico.

Cultivo	Proteína $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$	A+F $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ de proteína	% en función de F total	
			A	F
Autotrófico	45,9±0,2	19,0±0,1	11,6	86,1
Heterotrófico	41,5±0,1	21,4±0,0	17,2	80,3

A: aloficocianina, F: ficobiliproteína.

La Tabla 2 muestra, para ambos sistemas de cultivo, una alta proporción de proteína en la fase logarítmica, pudiéndose evidenciar una mayor relación en términos de ficobiliproteínas para el conjunto aloficocianina y ficocianina, para la cianobacteria en estudio. Para el sistema autotrófico se obtuvo 11,63 y 86,11% de aloficocianina y ficocianina, respectivamente; en relación al porcentaje total de ficobiliproteínas. Por otro lado, se observó 17,27 y 80,32% de aloficocianina y ficocianina para la biomasa producida en sistema heterotrófico.

En la Tabla 3 se muestra la relación entre las concentraciones de los diferentes pigmentos estudiados en la investigación. Se observa una alta correlación entre la ficocianina y aloficocianina, en el orden de 7,44 y 4,87 en la biomasa cultivada en sistemas autotrófico y heterotrófico, respectivamente. Así como una alta correlación, clorofila-*a*/ficocianina

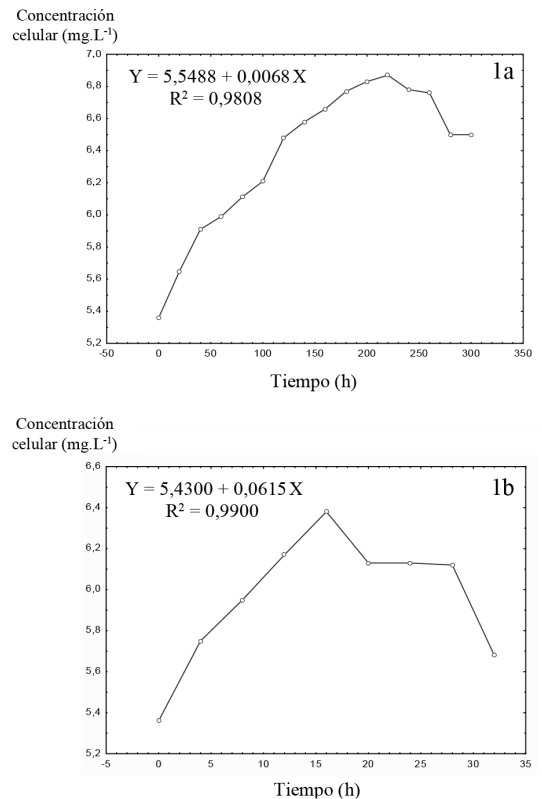


Figura 1. Curvas de crecimiento de *Aphanothece microscopica* Nägeli en medio BG11 (1a), y en efluente de industria láctea (1b).

Tabla 3. Relación entre las concentraciones de pigmento en biomasa de *A. microscopica* Nägeli cultivada en sistemas autotrófico y heterotrófico, en fase de crecimiento logarítmico.

Autotrófico				
	A	B	C	D
A	1	0,14	1,03	7,64
B	7,23	1	7,44	55,30
C	0,97	0,21	1	6,82
D	0,13	0,02	0,13	1
Heterotrófico				
	A	B	C	D
A	1	0,01	0,07	0,46
B	74,44	1	4,87	33,23
C	0,97	0,13	1	6,81
D	2,16	0,03	0,15	1

A: clorofila-a; B: ficocianina; C: aloficocianina; D: ficoeritrina.

en el sistema heterotrófico en relación al sistema autotrófico.

La Tabla 4 evidencia que existe mayor producción de pigmentos en la fase de crecimiento logarítmico con relación a la demás fases. La concentración de clorofila es 10 veces superior en la fase logarítmica (10,6 mg/g) y en la fase estacionaria (8,3 mg/g), en el sistema de cultivo autotrófico respecto a las concentraciones en el sistema heterotrófico. Asimismo, se evidencian concentraciones similares en el comportamiento de ficocianina. Asimismo, se evidencian concentraciones similares en el comportamiento de ficocianina. A su vez se observa, un incremento en el orden de 63%, para la fracción ficoeritrina, durante la fase de crecimiento logarítmico, en el sistema heterotrófico, una condición que demuestra la influencia del medio de cultivo en la formación de estos biopigmentos.

Estos resultados indican que la cianobacteria en estudio, es una fuente potencial de ficoeritrina cuando es cultivada heterotróficamente, usando como medio de cultivo un efluente de productos lácteos.

Tabla 4. Concentración de clorofila-*a* y ficobiliproteínas en la biomasa de *A. microscopica Nægeli* durante la fase inicial, logarítmica y estacionaria en cultivos heterotrófico y autotrófico.

Autotrófico				
	A	B	C	D
FI	2,1±0,0	23,2±0,2	13,5±1,0	1,4±0,0
FL	10,6±0,5	77,4±0,3	10,3±0,3	1,3±0,0
FE	8,3±0,3	64,1±0,6	13,8±0,6	1,0±0,0
Heterotrófico				
	E	F	G	H
FI	2,0±0,2	23,0±0,1	12,8±0,3	1,4±0,0
FL	0,9±0,0	73,1±0,1	15,0±1,2	2,1±0,0
FE	0,7±0,0	78,9±1,1	13,9±0,0	1,6±0,0

FI: fase inicial, FL: fase logarítmica, FE: fase estacionaria. Cultivo autotrófico: A, B, C, D; cultivo heterotrófico: E, F, G, H; A: clorofila-*a* (mg·g<sup>-1</sup>); B: ficocianina (mg·g<sup>-1</sup>); C: aloficocianina (mg·g<sup>-1</sup>); D: ficoeritrina (mg·g<sup>-1</sup>); E: clorofila-*a* (mg·g<sup>-1</sup>); F: ficocianina (mg·g<sup>-1</sup>); G: aloficocianina (mg·g<sup>-1</sup>); H: ficoeritrina (mg·g<sup>-1</sup>). Concentración en masa seca.

La Tabla 5 muestra la producción estimada de la clorofila-*a* y ficobiliproteínas por *A. microscopica Nægeli* a partir de la generación anual de efluente de una industria láctea regional, cuando el microorganismo se cultiva en un sistema heterotrófico. Los datos mostrados evidencian una alta conversión de nitrógeno en biomasa, expresado por el rendimiento de 14,43 mg biomasa/mg nitrógeno, así como altas proporciones en término de toneladas por año para la producción de biomasa y pigmentos.

Tabla 5. Producción estimada de pigmentos de *A. microscopica Nægeli* en fase de crecimiento logarítmico en sistema heterotrófico utilizando como medio de cultivo efluentes lácteos.

Parámetros	Producción estimada
Volumen de efluente año (L/año)	27.3600.000
Concentración de nitrógeno en el efluente (mg/L)	65,4
Conversión de nitrógeno en biomasa (mg <sub>biomasa</sub> /mg <sub>nitrógeno</sub> )	14,43
Producción de biomasa (ton/año)	3.185,03
Concentración de clorofila en la biomasa (mg/g)	0,982
Producción de clorofila (kg/año)	3.127,7
Concentración de ficocianina en la biomasa (mg/g)	73,1
Producción de ficocianina (kg/año)	232.825,7
Concentración de aloficocianina en la biomasa (mg/g)	15,0
Producción de aloficocianina (kg/año)	47.775,4
Concentración de ficoeritrina en la biomasa (mg/g)	2,2
Producción de ficoeritrina (kg/año)	7.008,1

## DISCUSIONES

Al comparar las curvas de crecimiento, mediante prueba de correlación de Spearman, en sistema autotrófico y heterotrófico, se evidencia que existe una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,01$ ). En la gráfica de crecimiento microbiano, resultante de los condiciones de cultivo, se puede observar ausencia de la fase estacionaria para ambos sistemas, y tiempos más largos de fase logarítmica en sistemas autotróficos. Esto es un comportamiento característico en curvas de crecimiento de microalgas desarrolladas en sistema autotrófico y característico

de medios de cultivo con disponibilidad de carbono y nutriente como medios minerales, como medios provenientes de efluentes agroindustriales [14]. Este comportamiento coincide con lo reportado en otros estudios realizados con efluentes provenientes de industrias de procesamiento de lácteos, de hidrolizados alimenticios y pescadería [10, 15-17]. El medio de cultivo utilizado, tiene una influencia marcada sobre el crecimiento celular. Los datos cinéticos mostrados en la investigación, se asemejan a los presentados por otros investigadores [18], que en cultivo de *A. microscopica Nægeli* con medio BG 11 a 30 °C y 0,96 klux reportó un  $\mu_{\max}$  de 0,008 h<sup>-1</sup> correspondiendo con un  $t_g$  de 86,94 h; igualmente los datos obtenidos son similares a los reportados por otros autores en cultivos de cianobacterias como *Anabaena variabilis* en condiciones fotoautotróficas [19]. De esta forma, el metabolismo celular y, por consiguiente, la formación de bioproductos, estará fuertemente influenciada por el medio de cultivo utilizado. Este hecho es corroborado si se comparan los valores de  $\mu_{\max}$  obtenidos para el microorganismo en cultivos autotrófico y heterotrófico. Las diferencias en las velocidades específicas de crecimiento se atribuyen, entre otros factores, a presencia de fuentes de nitrógeno, debido a el crecimiento de microalgas ha mostrado ser más lento en medios con nitrato. En los efluentes agroindustriales la fuente de compuestos nitrogenados está constituida de compuestos orgánicos y nitrógeno amoniacal [20].

La tasa máxima de crecimiento específico para el microorganismo desarrollado en el efluente de productos lácteos es 10 veces mayor a la observada cuando se utiliza el cultivo con medio BG11, y mostró diferencias significativas ( $p < 0,005$ ). Este comportamiento es típico de cianobacterias que crecen en los residuos agroindustrial, lo que demuestra la capacidad de estos microorganismos de asimilar heterotróficamente efluentes orgánicos e inorgánicos. Los datos cinéticos obtenidos para *A. microscopica Nægeli* demuestran el potencial de exploración de bioprocesos para la generación de bioproductos en la industria alimentaria, utilizando como medio de cultivo un efluente de la industria láctea.

En cianobacterias, el número de moléculas de ficobiliproteínas aumenta en relación a la ficocianina al compararse con las otras fracciones proteínicas [21]. La ficocianina, ha sido descrita como la principal ficobiliproteína que constituye

los pigmentos que caracterizan a las cianobacterias. La aloficocianina y ficocianina en cianobacterias como *Spirulina platensis* representan normalmente el 20% de la proteína celular, siendo los pigmentos dominantes desde el punto de vista cuantitativo [22]. El contenido de las fracciones de ficobiliproteínas aquí mostrados son más altos que los presentados en otros estudios con especies de *Galdieria sulphuraria*, lo que demuestra la variabilidad entre géneros y la potencialidad de *A. microscopica Nægeli* como fuente biotecnológicamente activa de este tipo de proteínas [23].

En cuanto a la relación entre las concentraciones de pigmento, durante la fase de crecimiento logarítmico, en la biomasa cultivada en sistema autotrófico y heterotrófico; se evidencian valores que son notablemente superiores a los registrados en otras investigaciones; por ejemplo, para *S. platensis* cultivada en condiciones autotróficas a temperatura 28-30 °C [24].

Considerando las variaciones características entre especies y el hecho que ficocianina, junto con aloficocianina representan la mayor fracción de los pigmentos totales que componen la biomasa, independientemente de las condiciones de cultivo, es posible considerar la alta relación de ficocianina/aloficocianina como una característica de cianobacterias como *A. microscopica Nægeli*.

El estrés provocado por la intensidad de iluminación es decisivo para el cambio del patrón de pigmento durante el cultivo de especie de microalgas, lo que representa una característica común de microalgas para adaptarse fácilmente a las fluctuaciones de condiciones durante la biosíntesis, lo que es típicamente caracterizado por una relación aumentada de pigmentos. Esto se estudió ampliamente en el caso de varias especies de microalgas [25]. Al respecto, se puede apreciar (Tabla 3), la influencia de la luz en la producción de este compuesto, en las diferentes etapas de crecimiento celular. La ficoeritrina se destaca por ser una de las ficobilinas más flexibles, adaptándose fácilmente a los cambios ambientales. Esta fácil adaptación de la ficoeritrina, se refleja en *A. microscopica Nægeli* demostrando su versatilidad metabólica en cuanto a la producción de este biopigmento, ya que las concentraciones más altas se registran en la biomasa cuando crece en oscuridad y con el efluente de la industria láctea, en

comparación con la producción de este pigmento en la biomasa desarrollada en condiciones autotróficas.

También es evidente la superioridad de la clorofila en las condiciones de producción autotrófica. Esto se justifica, ya que la luz es uno de los factores más importantes que influyen en la biosíntesis de la clorofila. Además, los cambios en los niveles de clorofila y ficobilinas son una respuesta de la adaptación de las microalgas a la ausencia y disponibilidad de iluminación [26].

Se han reportado trabajos donde se estudió la influencia de la luz sobre el crecimiento y la producción de clorofila por *Spirulina platensis* cultivada en un medio que contenía  $\text{KNO}_3$  como fuente de nitrógeno. Los autores informaron un aumento del 29% en la producción de este pigmento en condiciones de 2 klux de intensidad luminosa y 30 °C, en comparación con los cultivos que crecieron a 5 klux a la misma temperatura [27]. El aumento en la concentración de este pigmento se atribuyó al hecho de que la concentración de nitrógeno en el medio no fue un factor limitante. Esta condición es equivalente para el cultivo autotrófico de la cianobacteria en estudio, considerando el medio sintético BG11. La adaptación de algas unicelulares en medios heterotróficos, conlleva a una baja producción de clorofila [28]. Esto puede justificar las concentraciones más bajas en clorofila-*a* registradas para *A. microscopica Nægeli* en cultivo heterotrófico.

*S. platensis* se caracteriza por tener concentraciones de clorofila-*a* correspondiente al 1,15% de su biomasa [27]. Los resultados de clorofila-*a* registrados para *A. microscopica Nægeli* en condiciones autotróficas en fase de crecimiento logarítmico están muy cerca (1,06%) a lo expresado en la literatura para *S. platensis*. En este sentido, estos resultados hacen de *A. microscopica Nægeli* una potencial fuente de producción de clorofila-*a*. Por otro lado, a pesar que en el cultivo heterotrófico la producción de clorofila-*a* es aproximadamente 10,86 veces menor que en cultivo autotrófico, cuando se evalúa el comportamiento en las curvas de crecimiento generadas por *A. microscopica Nægeli* (Figura 1), se observa que cuando el microorganismo es cultivado en ausencia de luz, utilizando el efluente de la industria láctea, la fase logarítmica se alcanza entre las 5 y 15 h. Sin embargo, en el sistema autotrófico,

la fase logarítmica se registra después de 100 h. En este sentido, la menor producción en clorofila-*a* en sistemas heterotróficos se compensa con el tiempo de cultivo, para alcanzar la concentración máxima de clorofila-*a* en el sistema autotrófico.

La bioconversión de efluentes de origen industrial mediante cultivos de microalgas puede representar un gran aporte e términos agrobiológicos, en vista que la remoción de nutrientes mostrado en el proceso, es una evidencia del metabolismo heterotrófico microalgal, lo que conduce a un tratamiento terciario de aguas residuales. A su vez, la capacidad de reducir los costos de producción de estos pigmentos utilizando residuos del procesamiento industrial.

El alto rendimiento en conversión de nitrógeno a biomasa, es notablemente superior, para este microorganismo, cuando es cultivado en efluentes industriales [16]. Por lo que estos resultados muestran al efluente lácteo como un importante medio de cultivo, cuando se trata de la aplicación del concepto de biorrefinería.

## CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo son de interés biotecnológico, en cuanto a la producción de pigmentos mediante cianobacterias. Los factores de conversión de sustrato en biomasa demuestran que el efluente de la industria láctea, es un importante medio de cultivo para *A. microscopica Nægeli*. La variación de las condiciones de cultivo tuvo un efecto especialmente superior, en la producción de clorofila-*a*, en cultivos bajo condiciones autotróficas en comparación con el cultivo heterotrófico. La misma relación fue observada para la producción de ficoeritrina, donde se registraron concentraciones en el orden de 63% más elevadas en cultivo heterotrófico en relación con el autotrófico.

*A. microscopica Nægeli* se caracteriza por tener una relación elevada ficocianina/aloficocianina. La producción de ficocianina aunque significativamente mayor en sistema autotrófico, no difiere mucho en términos cuantitativos, al comparar este comportamiento con la producción de clorofila-*a* y ficoeritrina. Es posible originar mediante sistema heterotrófico, empleando un efluente de la industria láctea, una producción anual de 3.185 toneladas de biomasa, que puede generar 3.128 kilogramos de

clorofila, 232.825 kilogramos de ficocianina, 47.775 kilogramos de aloficocianina y 7.008 kilogramos de ficoeritrina. Por lo tanto, *A. microscopica Nägeli*, se muestra como una fuente alternativa, renovable y de bajo costo para obtener pigmentos con potencial para ser explorado para una amplia gama de aplicaciones.

## REFERENCIAS

- [1] E. Jacob-Lopes, L.G. Ramírez Mérida, M.I. Queiroz and L.Q. Zepka. "Microalgal Biorefineries". In: E. Jacob-Lopes, L.Q. Zepka. Biomass Production Uses. InTech. 1ed., pp. 81-106. Rijeka, Croatia. ISBN: 978-953-51-2181-7. 2015. DOI: 10.5772/59969. 2015.
- [2] M.I. Queiroz, M.O. Hornes, A.G. Silva-Manetti and E. Jacob-Lopes. "Single-cell oil production by cyanobacterium *Aphanothece microscopica Nägeli* cultivated heterotrophically in fish processing wastewater". Applied Energy. Vol. 88, pp. 3438-443. October, 2011. ISSN: 0306-2619. DOI: 10.1016/j.apenergy.2010.12.047.
- [3] M.F.J. Raposo, R.M.S.C. Morais and A.M.M.B. Morais. "Health applications of bioactive compounds from marine microalgae". Life Sciences. Vol. 93, pp. 479-486. October 2013. ISSN: 0024-3205. DOI: 10.1016/j.lfs.2013.08.002.
- [4] D. Rodrigues, E. Flores, J. Barin, A. Mercadante, E. Jacob-Lopes and L.Q. Zepka. "Production of carotenoids from microalgae cultivated using agroindustrial wastes". Food Research International. Vol. 65 Part B, pp. 144-148. July, 2014. ISSN: 0963-9969. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.06.037.
- [5] L. Ramírez-Mérida, Q.L. Zepka y E. Jacob-Lopes. "Fotobiorreactor: herramienta para cultivo de cianobacterias". Ciencia y Tecnología. Vol. 6 N° 2, pp. 9-19. Septiembre 2013. ISSN: 1390-4051. [http://www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C2\\_V6N2%202fotobiorreactor.pdf](http://www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C2_V6N2%202fotobiorreactor.pdf)
- [6] E. Jacob-Lopes, L.Q. Zepka and M.I. Queiroz. "Cyanobacteria and carbon sequestration". In: N. Sharma, A. Rai and L. Stal. Cyanobacteria an economic perspective. Wiley Blackwell. 1ª ed., pp. 65-71. Chichester, England. ISBN: 978-1-119-94127-9. 2013. DOI: 10.1002/9781118402238.ch4.
- [7] L. Ramírez-Mérida, Q.L. Zepka y E. Jacob-Lopes. "Microalgas y cianobacterias Aplicación en Medicina". Revista Electrónica PortalesMedicos.com. Vol. 9 N° 4, pp. 149. Febrero 2014. ISSN: 1886-8924.
- [8] R. Rippka, J. Deruelles, J.B. Waterbury, M. Herdman and R.Y. Stanier. "Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria". Journal of General Microbiology. Vol. 111, pp. 1-61. March, 1979. ISSN: 0022-128. DOI: 10.1099/00221287-111-1-1.
- [9] APHA. "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater". American Public Health Association. 20th Ed. Washington, D.C., United States. ISBN-10: 0875530133. 1999.
- [10] N. Streit, L. Ramírez-Mérida, Q.L. Zepka y E. Jacob-Lopes, y M.I. Queiroz. "Producción de pigmentos naturales (clorofila-*a*) en biorrefinerías agroindustriales". Ciencia y Tecnología. Vol. 8 N° 2, pp. 27-34. Diciembre 2015. ISSN 1390-4051. URL: [http://www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C2\\_V8%20N2%203Streit%20et%20al.pdf](http://www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C2_V8%20N2%203Streit%20et%20al.pdf).
- [11] S.W. Jeffrey and G.F. Humphrey. "New spectrophotometric equations for the determination of chlorophylls *a*, *b*, *c*<sub>1</sub>, and *c*<sub>2</sub> in higher plants, algae, and natural phytoplankton". Biochemistry Physiology Pflanzen. Vol. 167, pp. 191-194. 1975.
- [12] T.A. Kursar, J. Van der Meer and R.S. Alberte. "Light-Harvesting System of the Red Alga *Gracilariatikiavahiae*. I. Biochemical Analyses of Pigment Mutations". Plant Physiology. Vol. 73, pp. 353-360. October 1983. ISSN: 0032-0889. DOI: 10.1104/pp.73.2.353.
- [13] O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr and U.L. Randall. "Protein measurement with the Folin Phenol Reagent". Journal of Biological Chemistry. Vol. 193, pp. 265-275. May 1951. ISSN 0021-9258. URL: <http://www.jbc.org/content/193/1/265.full.pdf>
- [14] E. Jacob-Lopes and Teixeira Franco. "From oil refinery to microalgal biorefinery". Journal of CO<sub>2</sub> Utilization. Vol. 2, pp. 1-7. July 2013. ISSN: 2212-9820. DOI:10.1016/j.jcou.2013.06.001.
- [15] J. Silva, V. Vásquez y F. Merino. "Producción de biomasa de *Tetraselmis suecica* empleando agua de mar con sanguaza". Scientia Agro-



- pecuaria. Vol. 2, pp. 13-23. Marzo 2011. ISSN: 2077-9917. DOI: 10.17268/sci.agropecu.2011.01.02.
- [16] M.I. Queiroz, M. Hornes, A.G.S. Manetti, Q.L. Zepka and E. Jacob-Lopes. "Fish processing wastewater as a platform of the microalgal biorefineries". *Biosystems Engineering*. Vol. 115, pp. 195-202. December 2012. ISSN: 1537-5110. DOI: 10.1016/j.biosystemseng.2012.12.013.
- [17] K.Y. Lau, D. Pleissner and C.S. Ki Lin. "Recycling of food waste as nutrients in *Chlorella vulgaris* cultivation". *Bioresource Technology*. Vol. 170, pp. 144-151. October 2014. ISSN: 0960-8524. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.07.096.
- [18] E. Jacob-Lopes, L.M.C.F. Lacerda and T.T. Franco. "Biomass production and carbon dioxide fixation by *Aphanothece microscopica Nágeli* in a bubble column photobioreactor". *Biochemical Engineering Journal*. Vol. 40, pp. 27-34. May, 2008. ISSN: 1369-703X. DOI:10.1016/j.bej.2007.11.013.
- [19] J.H. Yoon, S.S. Choi and T.H. Park. "The cultivation of *Anabaena variabilis* in a bubble column operating under bubbly and slug flows". *Bioresource Technology*. Vol. 110, pp. 430-436. April 2012. ISSN: 0960-8524. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.01.061.
- [20] L. Lin, G.Y.S. Chan, B.L. Jiang and C.Y. Lan. "Use of ammoniacal nitrogen tolerant microalgae in landfill leachate treatment". *Waste Management*. Vol. 27 N° 10, pp. 1376-1382. January 2007. ISSN: 0956-053X. DOI:10.1016/j.wasman.2006.09.001.
- [21] H.W. Chen, T.S. Yang, M.J. Chen, Y.C. Chang, E.I.C. Wang, C.L. Ho, Y.J. Lai, C.C. Yu, J.C. Chou, L.K.P. Chao and P.C. Liao. "Purification and immune modulating activity of C-phycoyanin from *Spirulina platensis* cultured using power plant flue gas". *Process Biochemistry*. Vol. 49 N° 8, pp. 1337-1344. August 2014. ISSN: 1359-5113. DOI:10.1016/j.procbio.2014.05.006.
- [22] X. Zeng, M.K. Danquah, S. Zhang, X. Zhang, M. Wu, X.D. Chen, I.S. Ng, K. Jing and Y. Lu. "Autotrophic cultivation of *Spirulina platensis* for CO<sub>2</sub> fixation and phycocyanin production". *Chemical Engineering Journal*. Vol. 183, pp. 192-197. February 2012. ISSN: 1385-8947. DOI:10.1016/j.cej.2011.12.062.
- [23] J.K. Sloth, M.G. Wiebe and N.T. Eriksen. "Accumulation of phycocyanin in heterotrophic and mixotrophic cultures of the acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*". *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 38 N° 1-2, pp. 168-175. January 2006. ISSN: 0141-0229. DOI:10.1016/j.enzmictec.2005.05.010.
- [24] K.V. Ajayan, M. Selvaraju and K. Thirugnanamoorthy. "Enrichment of chlorophyll and phycobiliproteins in *Spirulina platensis* by the use of reflector light and nitrogen sources: An *in-vitro* study". *Biomass and Bioenergy*. Vol. 47, pp. 436-441. November, 2012. ISSN: 0961-9534. DOI: 10.1016/j.biombioe.2012.09.012.
- [25] M. Koller, A. Muhr and G. Braunegg. "Microalgae as versatile cellular factories for valued products". *Algal Research*. Vol. 6, Part A, pp. 52-63. October 2014. ISSN: 2211-9264. doi:10.1016/j.algal.2014.09.002.
- [26] B. George, I. Pancha, C. Desai, K. Chokshi, C. Paliwal, T. Ghosh and S. Mishra. "Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus* - A potential strain for bio-fuel production". *Bioresource Technology*. Vol. 171, pp. 367-374. August 2014. ISSN: 0960-8524. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.08.086.
- [27] E.D. Danesi, R.Y.C. Oliveira, S. Sato and J.C. Monteiro de Carvalho. "Growth and Content of *Spirulina platensis* Biomass Chlorophyll Cultivated at Different Values of Light Intensity and Temperature Using Different Nitrogen Sources". *Brazilian Journal of Microbiology*. Vol. 42 N° 1, pp. 362-373. January-March 2011. ISSN 1517-8382. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822011000100046>.
- [28] O. Pérez-García, F.M.E. Escalante, L.E. de-Bashan and Y. Bashan. "Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products". *Water Research*. Vol. 45 N° 1, pp. 11-36. January 2011. ISSN: 0043-1354. DOI:10.1016/j.watres.2010.08.037.