

PROGRAMA DE APOYO A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN TECNOLÓGICA

DATOS GENERALES

Clave del proyecto:	IT201119
Título:	Producción de alfa-glucano, lípidos, proteína y ficocianina con la microalga extremófila Galdieria sulphuraria
Etapas:	Informe Final 2019
Modalidad:	b) Proyectos de investigación aplicada o de innovación tecnológica
Disciplina:	Biotechnología
Especialidad:	Microbiología Industrial, Ingeniería Metabólica y Fermentaciones
Adscripción del proyecto:	Instituto de Biotechnología
Duración:	3 Años
Palabras clave:	Biorrefinería, Ficocianina, Galdieria sulphuraria, Glucano, Lípidos, Microalgas, Proteínas
Situación:	Proyecto aprobado

CANTIDADES ASIGNADAS

Primer año:	\$ 205,000.00
Segundo año:	\$ 199,500.00
Tercer año:	\$ 185,000.00
Total:	<hr/> \$ 589,500.00

TITULAR(ES) DEL PROYECTO

Responsable:	ALFREDO MARTINEZ JIMENEZ
Adscripción:	Instituto de Biotechnología

SÍNTESIS DEL PROYECTO

Algunas microalgas se usan para la producción de diferentes compuestos comerciales de alto valor, p. ej., beta-carotenoides y ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) (Sakurai et al., 2016), así como biomasa para aplicaciones en acuicultura. El cultivo de microalgas, en el contexto de biorrefinería, presenta ventajas, entre estas la posibilidad de llevar a cabo su producción sin necesidad de utilizar suelo agrícola y de esta manera no competir con el cultivo de alimentos destinados para el consumo humano.

Las fuentes de azúcares de biomasa terrestre en América son abundantes en Brasil y los EUA, como la caña de azúcar y el maíz, entre otros, que se utilizan en biorrefinerías para obtener etanol combustible (denominados de primera generación), alimento para ganado, electricidad, edulcorantes, energía en forma de vapor y en algunos casos etanol para la industria química y para bebidas alcohólicas. Sin embargo, los problemas relacionados con la competencia por tierras destinadas al cultivo de alimentos han llevado a la búsqueda de otras alternativas. Las materias primas lignocelulósicas de residuos agrícolas y forestales se han reconocido como una materia prima más sostenible para la generación de biocombustibles y el establecimiento de biorrefinerías de segunda generación (Caspeta et al., 2014; Vargas-Tah et al., 2015). No obstante, estas biomásas son recalcitrantes y requieren tratamientos complejos para liberar los azúcares polimerizados (Mayers et al., 2018, Pérez-Pimienta et al., 2017; Utrilla et al., 2016). Teniendo en cuenta lo anterior, la biomasa de microalgas representa una materia prima (denominada de tercera generación) prometedora para la obtención de carbohidratos, lípidos, proteínas y pigmentos, que podrían utilizarse en la producción de diferentes compuestos químicos, productos de fermentación, biocombustibles, pigmentos y también aplicarse al área de alimentación humana y animal.

G. sulphuraria es un alga unicelular perteneciente al grupo de las algas rojas (Rhodophyceae) y se clasifica como extremófilo, sobrevive en ambientes ácidos con valores de pH entre 0 a 4 y a temperaturas de hasta 56 °C; en la mayoría de los reportes científicos es cultivada a pH 2 y 42 °C. Además, *G. sulphuraria* puede crecer autotróficamente, realizando fotosíntesis en presencia de luz y CO₂, o heterotróficamente (en oscuridad) usando diversos compuestos orgánicos como fuente de carbono, o bien mixotróficamente (Martínez-García et al., 2016). Los escasos reportes que existen del cultivo de esta microalga permiten concluir que durante su crecimiento puede acumular alfa-poliglucanos, lípidos y proteínas, y bajo ciertas condiciones de estrés acumula más lípidos, poliglucanos o pigmentos como la ficocianina.

En crecimiento autótrofo y diferentes condiciones de estrés, usando la microalga extremófila *G. sulphuraria* en este proyecto se propone llevar a cabo el estudio de la biosíntesis de α -poliglucanos, lípidos y proteínas; determinar la estructura de α -poliglucanos y la composición de los ácidos grasos generados; y favorecer la producción de ficocianina en cultivos heterotróficos y mixotróficos mediante la exposición a fotoperíodos controlados y utilizando xilosa como principal fuente de carbono, así como hidrolizados de la fracción hemicelulósica de rastrojo de maíz. El proyecto a largo plazo pretende establecer biorrefinerías de tercera generación basadas en el cultivo de microalgas extremófilas.

CONTRIBUCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Contribuciones

Como parte del desarrollo de este proyecto se evaluó la producción de biomasa y ficocianina a partir de una cepa UTEX 2919 de *Galdieria sulphuraria* bajo condiciones heterótrofas de crecimiento, utilizando como fuentes de carbono glucosa, xilosa, mezclas de glucosa-xilosa y azúcares provenientes de hidrolizados de la fracción hemicelulósica y celulósica del rastrojo de maíz, y en condiciones mixotróficas y heterotróficas, en medio mineral a 42°C y pH 2. Se determinaron los parámetros cinéticos y estequiométricos de crecimiento, así como el contenido de carbohidratos, lípidos, proteínas y particularmente de ficocianina. La generación del pigmento es mucho menor cuando se utiliza xilosa y el acético presente, por arriba de 0.6 g/L en los hidrolizados, inhibe el crecimiento celular, además reprime catabólicamente el metabolismo de glucosa. Usando jarabes de la sacarificación enzimática de celulosa se obtiene ficocianina en menor concentración a la obtenida con medios de laboratorio y glucosa. También, se encontró que la formación de biomasa en cultivos hetero y mixotróficos es muy eficiente a partir de glucosa, alcanzando rendimientos de biomasa a partir de glucosa consumida del 60%. En el caso de la xilosa, este rendimiento es menor en condiciones heterotróficas; sin embargo, la luz ejerce un efecto sinérgico y en condiciones mixotróficas la microalga también logra rendimiento de biomasa mayores al 50% a partir de la xilosa consumida. No obstante, en las mezclas de glucosa-xilosa, la glucosa reprimió catabólicamente el consumo de xilosa, obteniéndose un consumo secuencial de ambos azúcares, el rendimiento de biomasa también fue mayor al 50% y la velocidad de crecimiento similar a la obtenida usando xilosa como fuente de carbono. La producción de ficocianina es menor cuando se utiliza xilosa como fuente de carbono. Estos resultados nos permiten postular que es mejor utilizar glucosa como fuente de carbono en cultivos mixotróficos, con el fin de generar una elevada cantidad de biomasa y la mayor acumulación de ficocianina.

Basados en los resultados obtenidos en heterotrofia y mixotrofia con glucosa como fuente de carbono, estudiamos la producción de ficocianina utilizando fotoperiodos controlados en cultivos mixotróficos en comparación. Se encontró que con iluminación continua y alta concentración celular (1.4 g/L) se obtiene la mayor acumulación y mejor velocidad de producción de ficocianina. Además, probamos que la ficocianina generada por las cepas CCME 5587.1 y UTEX 2919 prácticamente no se degrada en 8 días, lo cual es una característica relevante y positiva con Gs. La degradación intracelular de ficocianina en cianobacterias es un fenómeno común y rápido, en 24 h puede degradarse más del 80%, y la ficocianina generada por *G. sulphuraria* no se degrada aun cuando se encuentra intracelularmente o en suspensión a 42°C.

Además, se evaluaron 5 cepas de *G. sulphuraria* (Gs), bajo condiciones autotróficas, en fotobiorreactores de 800 mL, se determinaron los parámetros cinéticos y estequiométricos de crecimiento, así como el contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas. Se encontró que acumulan 37 a 47 % de proteína (p/p) en condiciones autotróficas sin limitación de nitrógeno, del 4 al 9 % (p/p) de carbohidratos y de 5 a 13 % de lípidos. Destacan las cepas a) CCME 5587 por crecer muy rápido (4.3 días de tiempo de duplicación), ser la de menor tamaño celular y generar la mayor cantidad de biomasa (2.3 g/L en 21 días). Además, se determinó el contenido porcentual de aminoácidos mediante una metodología de HPLC implementada en nuestro laboratorio. Estos resultados permiten también proponer a *G. sulphuraria* como una microalga para la generación de proteína unicelular, para la alimentación de humanos y animales terrestres y marinos.

Se caracterizó el tamaño de los polímeros de poliglucanos y se determinó el grado de polimerización de este obtenido en 4 cepas de *G. sulphuraria* en condiciones mixótrofas, heterótrofas y autótrofas de crecimiento, limitación de nitrógeno, temperaturas de 30 y 42°C, y dos intensidades luminosas. La mayor acumulación de poliglucano fue del 20% en condiciones mixotróficas y la menor fue del 5% en condiciones autotróficas. El polímero extraído de las células cultivadas en condiciones autotróficas presentó una distribución bimodal, con tamaños de polímeros que varían en dos órdenes de magnitud, a diferencia del polímero sintetizado en condiciones heterotróficas y mixotróficas, el cual presentó una distribución unimodal y con una distribución del tamaño del polímero en el mismo orden de magnitud. También se comprobó que el polímero que acumulan estas cepas es un homopolímero constituido únicamente por glucosa. Sorprendentemente, aunque la microalga está clasificada como termófila la velocidad de crecimiento obtenida en condiciones autótrofas fue mayor cuando se cultivó 10°C por debajo de la temperatura reportada como óptima. Así mismo, el incremento en la intensidad lumínica también permitió

incrementar la velocidad de crecimiento, sin que ambos factores afectaran el contenido de clorofila, un efecto negativo sobre los fotosistemas y sin generar muerte celular.

Para facilitar futuros análisis genómicos y transcripcionales, relacionados con la acumulación de ficobiliproteínas y otros aspectos metabólicos y fisiológicos de condiciones ambientales en *G. sulphuraria*, se encuentra en proceso de secuenciación genómica cinco cepas de *Gs* mediante la plataforma Illumina con profundidad de 100X. Se ha completado el preensamblado de dos de ellas, CCME 5587.1 y UTEX 2919 con secuencias obtenidas en la plataforma OXFORD Nanopore. Estamos en espera de las secuencias por Illumina para completar el ensamble de los cinco genomas.

Artículos indizados

A finales del 2021 se generaron dos publicaciones indizadas que fueron sometidas a dos revistas de circulación internacional. A la fecha uno de ellos fue notificado de aceptación el 21 de marzo del 2021 (“Single-cell protein production potential with the extremophilic red microalgae *Galdieria sulphuraria*: growth and biochemical characterization”, has been accepted for publication in *Journal of Applied Phycology*). Durante la primera quincena de marzo de 2022 se sometió la segunda revisión del artículo (Growth and phycocyanin production with *Galdieria sulphuraria* UTEX 2919 using xylose, glucose, and corn stover hydrolysates under heterotrophy and mixotrophy). Así mismo, se han elaborado dos manuscritos adicionales los cuales serán sometidos durante el primer semestre del 2022 a revistas indizadas.

Artículos Nacionales Arbitrados

Durante el 2021 publicamos un número especial con el tema de microalgas en la revista *BioTecnología*, revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, en este número especial publicamos cinco artículos de revisión relacionados con el tema del proyecto. El número especial es producto del curso-tópico realizado en el 2020 de biotecnología microalgal y contiene dos publicaciones adicionales de participantes del curso y el editorial cuyos autores son los dos estudiantes de doctorado y el responsable del proyecto.

Formación de Recursos Humanos

En este proyecto participaron tres estudiantes de posgrado, uno de maestría y dos de doctorado. Con diferente grado de avance los tres han terminado sus respectivos proyectos de investigación. El estudiante de maestría el QFB Ricardo A. Alvarado Cosío desarrollo el proyecto “Evaluación de la acumulación de ficocianina en *Galdieria sulphuraria* en condiciones de inanición por nitrógeno”, actualmente su tesis está en revisión por parte del comité sinodal. El estudiante de doctorado Francisco Vera López-Portillo está en espera de respuesta a la segunda revisión de su artículo indizado (Growth and phycocyanin production with *Galdieria sulphuraria* UTEX 2919 using xylose, glucose, and corn stover hydrolysates under heterotrophy and mixotrophy), y ya solicitó su comité para examen de candidatura de doctorado para presentar la tesis: “Crecimiento y acumulación de ficocianina en *Galdieria sulphuraria* 2919 bajo condiciones hetero-, mixó- y autótrofas”. Finalmente, ya ha sido aceptado para su publicación el artículo del estudiante de doctorado Carlos A. Montenegro Herrera (Single-cell protein production potential with the extremophilic red microalgae *Galdieria sulphuraria*: growth and biochemical characterization), y procederá a solicitar su comité para examen de candidatura de doctorado para presentar la tesis: “Biosíntesis de α -poliglucanos en la microalga *Galdieria sulphuraria* bajo condiciones de estrés”.

Vinculación

Como parte del desarrollo de este proyecto y para el desarrollo de este, nos vinculamos con la Dra. Helena Porta (IBt-UNAM) para abordar temas relacionados con el metabolismo y genética de *G. sulphuraria* y con la Dra. Marisol Córdova (ICAT-UNAM) para la evaluación de la microalga en productos alimentarios. La colaboración con la Dra. Córdova inicio a finales del 2021 y esta vinculación junto con aplicaciones en el área de alimentos la desarrollaremos en proyectos futuros. Aunque no pudimos realizar todas las investigaciones originalmente planteadas, los resultados obtenidos nos permiten determinar usar como modelo de estudio a *G. sulphuraria*, tanto para realizar estudios de investigación para generar conocimiento, como investigaciones de desarrollo tecnológico con el fin de buscar diferentes aplicaciones de la biomasa de la microalga y de la ficocianina.

Grupo de Investigación

La línea de investigación del cultivo de microalga extremófilas y la obtención de diferentes productos en el concepto de biorrefinería está en desarrollo. El financiamiento otorgado a través del proyecto IT201119 permitió iniciar el desarrollo de la línea de investigación con microalgas extremófilas. El proyecto

contribuyó a integrar a la Dra. Helena Porta, investigadora titular del IBt, experta en biología molecular de plantas y a la Dra. Mariana Manzoni, posdoctorante DGAPA que trabaja en este proyecto y experta en cultivo de microalgas.

A futuro esperamos integrar a más colegas relacionados con este tema de investigación. Cabe mencionar que la Dra. Rosario Vera, también investigadora titular y experta en biología molecular de plantas, en un inicio, formaba parte de este equipo de trabajo. Sin embargo, por cuestiones particulares, la Dra. Vera dejó de participar en el proyecto y actualmente está jubilada. También esa fue una de las razones por las cuales invitamos a colaborar a la Dra. Helena Porta.

Relacionado con la productividad del proyecto y la integración del grupo de investigación, la colaboración con la Dra. Helena Porta permitió el desarrollo de la tesis de maestría del QFB Ricardo Adrián Alvarado Cosío, quién desarrollo la tesis: Evaluación de la acumulación de ficocianina en *Galdieria sulphuraria* en condiciones de inanición por nitrógeno. Adicionalmente, con la Dra. Helena Porta en apoyo a las investigaciones realizadas por el estudiante de doctorado Francisco Vera López-Portillo, participó en la integración del manuscrito "Effect of light intensity, photoperiods, and cell concentration on biomass growth and phycocyanin accumulation in *Galdieria sulphuraria* UTEX 2919", del cual tenemos un borrador con dos revisiones y lo esperamos someter a una revista indizada en mayo de 2022. Por las contribuciones realizadas por la Dra. Rosario Vera y su participación en el proyecto y también como parte de asesoría al estudiante de doctorado Francisco Vera López-Portillo, se desarrolló en artículo "Growth and phycocyanin production with *Galdieria sulphuraria* UTEX 2919 using xylose, glucose, and corn stover hydrolysates under heterotrophy and mixotrophy" del cual a inicio de marzo de 2022 sometimos la segunda revisión a la revista *Algal Research*. Con la Dra. Mariana Manzoni como parte indirecta de su participación en el proyecto se escribió una revisión en un capítulo libro, la cual fue aceptada para su publicación el 25 de octubre del 2021. El capítulo se encuentra en el libro: "Waste Biorefinery (Springer-nature), y fue el capítulo tres (Chapter 3: Waste Biorefineries facilities:The feedstock choice); los autores fueron: Mariana Manzoni Maroneze, Estefania Sierra-Ibarra, Carlos A. Montenegro-Herrera, Alfredo Martínez.

Infraestructura

Con los recursos otorgados por el programa, adquirimos un analizador de gases, el cual sirve para medir O₂ y CO₂ en fase gaseosa, el intervalo de medición de CO₂ va de 0-5% y el O₂ de 0-25%. Este equipo lo hemos utilizado para cuantificar la fracción de oxígeno y de CO₂ presente en la alimentación de aire y en los gases de salida de experimentos selectos en fotobiorreactores de 1L. A partir de estos datos se puede cuantificar la velocidad de consumo de O₂ en cultivos y producción de CO₂ en cultivos heterótrofos, y la velocidad de consumo de CO₂ y generación de O₂ en cultivos autótrofos. El equipo fue utilizado por el estudiante de doctorado Carlos Montenegro Herrera. Los resultados obtenidos serán integrados a una publicación donde reportaremos el efecto de la intensidad luminosa y la cooperación del crecimiento de la microalga a 42 y 32°C.

PARTICIPANTES INFORME FINAL

NOMBRE	TIPO DE PARTICIPANTE	PROCEDENCIA
CARLOS ALBERTO MONTENEGRO HERRERA	Alumno UNAM	I. de Biotecnología
FRANCISCO VERA LOPEZ PORTILLO	Alumno UNAM	I. de Biotecnología
GEORGINA TERESA HERNANDEZ CHAVEZ	Académico UNAM	Instituto de Biotecnología
HELENA PORTA DUCOING	Académico UNAM	Instituto de Biotecnología
MARIANA MANZONI MARONEZE	Becario posdoctorales	Universidade Federal de Santa Maria
RICARDO ADRIAN ALVARADO COSIO	Alumno UNAM	I. de Biotecnología

PRODUCTIVIDAD

ARTICULOS CON ARBITRAJE

Nombre de la revista BioTecnología

Título del artículo Editorial

Dirección de descarga https://smbb.mx/wp-content/uploads/2021/12/Editorial-2021_25_5.pdf

ISSN Factor de impacto 0.00

Año de publicación 2021 **DOI Difusión** Nacional

Idioma Español

Participantes

ALFREDO MARTINEZ JIMENEZ Autor

CARLOS ALBERTO MONTENEGRO HERRERA Coautor

FRANCISCO VERA LOPEZ PORTILLO Coautor

Nombre de la revista BioTecnología

Título del artículo Pigmentos en microalgas: funciones, aplicaciones y técnicas de sobreproducción

Dirección de descarga

<https://smbb.mx/wp-content/uploads/2021/12/Vera-Lopez-Portillo-y-Martinez-Jimenez-2021.pdf>

ISSN Factor de impacto 0.00

Año de publicación 2021 **DOI Difusión** Nacional

Idioma Español

Participantes

ALFREDO MARTINEZ JIMENEZ Coautor

FRANCISCO VERA LOPEZ PORTILLO Autor

Nombre de la revista BioTecnología

Título del artículo Poliglucanos de reserva en microalgas: química, biosíntesis y manipulación de condiciones de cultivo

Dirección de descarga

<https://smbb.mx/wp-content/uploads/2021/12/Montenegro-Herrera-et-al.-2021.pdf>

ISSN Factor de impacto 0.00

Año de publicación 2021 **DOI Difusión** Nacional

Idioma Español

Participantes

ALFREDO MARTINEZ JIMENEZ Coautor

CARLOS ALBERTO MONTENEGRO HERRERA Autor

FRANCISCO VERA LOPEZ PORTILLO Coautor

MARIANA MANZONI MARONEZE Coautor

Nombre de la revista BioTecnología

Título del artículo Ficocianina y su acumulación en la microalga roja Galdieria sulphuraria

Dirección de descarga

<https://smbb.mx/wp-content/uploads/2021/12/Vera-Lopez-Portillo-et-al.-2021.pdf>

ISSN Factor de impacto 0.00

Año de publicación 2021 **DOI** **Difusión** Nacional

Idioma Español

Participantes

ALFREDO MARTINEZ JIMENEZ Coautor

CARLOS ALBERTO MONTENEGRO HERRERA Coautor

FRANCISCO VERA LOPEZ PORTILLO Autor

HELENA PORTA DUCOING Coautor

RICARDO ADRIAN ALVARADO COSIO Coautor

Nombre de la revista BioTecnología

Título del artículo Perspectivas sobre los sistemas de cultivo de microalgas: una revisión crítica

Dirección de descarga

<https://smbb.mx/wp-content/uploads/2021/12/Manzoni-Maroneze-et-al.-2021.pdf>

ISSN Factor de impacto 0.00

Año de publicación 2021 **DOI** **Difusión** Nacional

Idioma Español

Participantes

ALFREDO MARTINEZ JIMENEZ Coautor

CARLOS ALBERTO MONTENEGRO HERRERA Coautor

MARIANA MANZONI MARONEZE Autor

Nombre de la revista BioTecnología

Título del artículo Conceptos básicos y avances de la transformación genética de las microalgas

Dirección de descarga <https://smbb.mx/wp-content/uploads/2021/12/Porta-2021.pdf>

ISSN Factor de impacto 0.00

Año de publicación 2021 **DOI** **Difusión** Nacional

Idioma Español

Participantes

HELENA PORTA DUCOING Autor

DIFUSIÓN

PONENCIAS

Título de la ponencia Producción potencial de proteína con la microalga roja extremófila *Galdieria sulphuraria* UTEX 2919.

Nombre del evento XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 23-28 de junio, 2019.

Lugar León, Guanajuato, México **País** México **Difusión** Nacional

Participantes

CARLOS ALBERTO MONTENEGRO HERRERA Ponente

Título de la ponencia Cultivo hetero y mixotrófico de la microalga *Galdieria sulphuraria* utilizando xilosa o glucosa como fuentes de carbono.

Nombre del evento XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 23-28 de junio, 2019

Lugar León, Guanajuato, México. **País** México **Difusión** Nacional

Participantes

FRANCISCO VERA LOPEZ PORTILLO Ponente

Título de la ponencia Growth and phycocyanin production with *Galdieria sulphuraria* UTEX 2919 using xylose, glucose, and corn stover hydrolysates under heterotrophy and mixotrophy.

Nombre del evento International Conference on Alga Biomass, Biofuels and Bioproducts. June 14-16, 2021

Lugar On line live and on-demand **País** Estados Unidos **Difusión** Internacional

Participantes

FRANCISCO VERA LOPEZ PORTILLO Ponente

Título de la ponencia Potential single-cell protein production with the thermoacidophile microalgae *Galdieria sulphuraria*: growth and biochemical characterization

Nombre del evento International Conference on Alga Biomass, Biofuels and Bioproducts. June 14-16, 2021

Lugar On line live and on-demand **País** Estados Unidos **Difusión** Internacional

Participantes

CARLOS ALBERTO MONTENEGRO HERRERA Ponente

Título de la ponencia Increased phycocyanin productivity from the microalgae *Galdieria sulphuraria* through modulation of CN ratio.

Nombre del evento Simposio Latino Americano de Ciencias de los Alimentos (14 SLACA). 12-14 de diciembre, 2021.

Lugar Formato en línea. **País** Brasil **Difusión** Internacional

Participantes

MARIANA MANZONI MARONEZE Ponente

ORGANIZACIÓN DE EVENTOS ACADÉMICOS

Tipo Curso

Nombre del evento Principios y aplicaciones de biotecnología microalgal

Lugar Instituto de Biotecnología - UNAM (impartido por videoconferencia) **País** México **Difusión** Nacional

Institución Instituto de Biotecnología - UNAM

Participantes

ALFREDO MARTINEZ JIMENEZ Organizador

CARLOS ALBERTO MONTENEGRO HERRERA Organizador

FRANCISCO VERA LOPEZ PORTILLO Organizador

HELENA PORTA DUCOING Organizador
