

Producción de pigmentos procedentes de *Arthrospira maxima* cultivada en fotobiorreactores

Production of pigments from *Arthrospira maxima* cultivated in photobioreactors

Lolymar Romero*, Miguel Guevara**, Bladimir Gómez***, Bertha Arredondo-Vega****, Roraisy Cortez*****, Berenice Licet*****

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.59671

RESUMEN

El cultivo de cianobacterias, como *Arthrospira*, puede realizarse en sistemas abiertos y sistemas cerrados o fotobiorreactores. El objetivo de la presente investigación fue evaluar la producción de pigmentos de *Arthrospira maxima* cultivada en dos tipos de fotobiorreactores. El cultivo se realizó de forma discontinua (Batch) bajo ambiente controlado, en fotobiorreactores helicoidales y cilíndricos, durante 30 días, en medio Zarrouk. La determinación de los pigmentos se realizó en las fases de crecimiento exponencial y estacionario. Para los pigmentos liposolubles, la biomasa se sometió a extracción con acetona 90%, y posterior determinación por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia, y para la extracción de los pigmentos ficobiliproteínicos se ensayaron cuatro métodos: 1. regulador de fosfatos/enzimas; 2. solución alcalina, previo tratamiento con CaCl_2 ; 3. buffer de fosfato, previo tratamiento con hielo seco y 4. agua (4°C), y posterior determinación por Espectrofotometría UV-Visible. Los mayores valores de pigmentos liposolubles fueron obtenidos en los cultivos realizados en fotobiorreactor helicoidal durante la fase exponencial (clorofila a $11,08 \pm 0,006 \mu\text{g mL}^{-1}$; β -caroteno $1,82 \pm 0,003 \mu\text{g mL}^{-1}$; zeaxantina $0,72 \pm 0,002 \mu\text{g mL}^{-1}$); mientras que los mayores contenidos de los pigmentos ficobiliproteínicos se obtuvieron en fotobiorreactor cilíndrico, durante la fase estacionaria, utilizando el buffer de fosfato tratado con hielo seco para la extracción. Dentro de las ficobiliproteínas, fue la ficocianina la que se encontró en mayor proporción ($\text{FC} = 77,74 \pm 0,767 \text{ mg L}^{-1}$), seguido por la aloficocianina y ficoeritrina. Se concluye que la biomasa de *Arthrospira maxima* presenta potencial biotecnológico por sus altos contenidos de pigmentos.

Palabras clave: pigmentos, *Arthrospira maxima*, fotobiorreactores.

ABSTRACT

The culture of the cyanobacteria *Arthrospira maxima* can be done in open systems and closed systems or photobioreactors. The objective of the present research was to evaluate the pigment production of *Arthrospira maxima* grown on two types of photobioreactors. Batch system culture with Zarrouk's medium was carried out under controlled conditions in a helicoidal and cylindrical photobioreactors during 30 days. Pigments determination was carried out in exponential and stationary growth phases. Biomass was extracted with 90% acetone, and the liposoluble pigments were injected in a HPLC. For the phycobiliprotein pigments extractions, four methods were tested: 1.- phosphate regulator/enzyme, 2.- alkaline solution, after treatment with CaCl_2 ; 3.- phosphate buffer, previous treatment with dry ice, and 4.- water (4 °C), and subsequent determination by UV-Visible Spectrophotometry. The highest pigments content was obtained in the helicoidal photobioreactor cultures during the exponential phase (chlorophyll a

* MSc. en Ciencias Marinas, Mención Oceanografía Química. Dpto. de Petróleo, Universidad Politécnica Territorial del Oeste de Sucre "Clodosbaldo Russián" Sucre, Venezuela. Carretera Cumaná-Cumanacoa, Km 4. Sucre, Venezuela. 6101. lolyrome@yahoo.com (autor de correspondencia).

** Ph.D. en Biología, Mención Botánica. Instituto Oceanográfico de Venezuela, Departamento de Biología Pesquera, Universidad de Oriente. Sucre, Venezuela. 6101. miguevara2003@yahoo.es.

*** MSc. en Ciencias Marinas, Mención Biología Marina. Museo del Mar, Av. Vela de Coro, Complejo Cultural Luis Manuel Peñalver, Universidad de Oriente. Sucre, Venezuela. 6101. bladimirgomez@gmail.com.

**** Ph.D. en Biología. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR). Baja California, México. Kitty04@cibnor.mx.

***** MSc. en Ciencias Marinas, Mención Biología Marina. Instituto Oceanográfico de Venezuela, Departamento de Biología Pesquera, Universidad de Oriente. Sucre, Venezuela. 6101.

***** MSc. en Ciencias Marinas, Mención Biología Marina. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Av. Carúpano. Sucre, Venezuela. 6101. Berenicelict20@yahoo.com.

11.08±0.006 µg mL⁻¹, β-carotene 1.82±0.003 µg mL⁻¹, zeaxanthin 0.72±0.002 µg mL⁻¹). Moreover, the highest contents of phycobiliprotein pigments were obtained in a cylindrical photobioreactor, during the stationary phase, with phosphate buffer with dry ice extraction. Among the phycobiliproteins, the phycocyanin was in highest content (77.74±0.767 mg L⁻¹), followed by allophycocyanin and phycoerythrin. It is concluded that the biomass of *Arthrospira maxima* presents biotechnological potential due to its high pigment contents.

Key words: pigments, *Arthrospira maxima*, photobioreactors.

Recibido: agosto 19 de 2016

Aprobado: mayo 26 de 2017

INTRODUCCIÓN

Las cianobacterias, comúnmente denominadas algas verde azules, comprenden un grupo grande y heterogéneo de procariontes fotoautotróficos oxigénicos (Van Den Hoek *et al.*, 1995). Las mismas han sido aprovechadas para diferentes fines, destacándose su utilidad en la biorremediación de ambientes contaminados (Santos *et al.*, 2012), como productora de energía (Harun *et al.*, 2010), fertilizantes (Venkataraman, 1981), metabolitos secundarios de interés farmacológico (Nuhu, 2013) y muy especialmente como alimento para el consumo humano y animal (Kovaè *et al.*, 2013).

En vista de la gran aplicabilidad de las cianobacterias, se han diseñado dos métodos de producción para estos microorganismos: los sistemas abiertos en los que el cultivo está expuesto a la atmósfera y los sistemas cerrados, comúnmente denominados fotobiorreactores, en los que el cultivo tiene poco o ningún contacto con la atmósfera (Grobelaar, 2000). El segundo método de cultivo es el que más se ha desarrollado, ya que permite obtener mayores rendimientos en cuanto a biomasa y evita ciertas dificultades que se presentan en los sistemas abiertos a la hora de cultivar y cosechar microalgas (Ravelonandro *et al.*, 2011; Uslu *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2011).

Una de las cianobacterias más cultivada en fotobiorreactores es *Arthrospira* (*A. maxima* y *A. platensis*), anteriormente llamada *Spirulina*; y la producción de su biomasa o metabolitos dependerá de diversos factores tales como la temperatura (Pandey & Tiwari, 2010; Colla *et al.*, 2007a; Colla *et al.*, 2007b; Ogbonda *et al.*, 2007), tasa de aireación (Ravelonandro *et al.*, 2011), concentración de CO₂ (Soletto *et al.*, 2008; Ravelonandro *et al.*, 2011), fuentes de carbono (Soundarapandian & Vasanthi, 2010), fuentes de nitrógeno (Colla *et al.*, 2007a; Colla *et al.*, 2007b; Uslu *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2011), fosfato y fase de crecimiento (Ravelonandro *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2011).

Arthrospira se comercializa por su alto contenido de proteínas, ácidos grasos esenciales y vitaminas y sus efectos beneficiosos se han atribuido a sus componen-

tes, como los polifenoles, ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), terpenos, clorofila y pigmentos accesorios del aparato fotosintético. En general, estos compuestos son antioxidantes que reducen la intensidad del estrés oxidativo (Cano-Europa *et al.*, 2012). Adicional al alto contenido proteico, mineral y vitamínico que presenta *Arthrospira*, su cultivo se ha venido masificando con la finalidad de obtener biomasa con altos contenidos de pigmentos, tales como clorofila *a*, carotenos, xantófilas (mixoxantófilas, zeaxantina, criptoxantinas, entre otras) y muy especialmente las ficobiliproteínas: aloficocianina, ficocianina y ficoeritrina; las cuales presentan en su estructura grupos prostéticos que son cromóforos tetrapirrólicos de cadena abierta (Challem, 1981; Glazer, 1985).

Los pigmentos de las cianobacterias pueden ser extraídos, identificados y cuantificados por distintos métodos químicos. Generalmente, las extracciones se realizan con agua, solventes orgánicos, tales como acetona, metanol, etanol, entre otros (Medina-Jaritz *et al.*, 2011; Vonshak, 1997a; Vonshak, 1997b) o soluciones salinas, entre las que se cuentan: nitrato de sodio, cloruro de calcio, entre otras (Medina-Jaritz *et al.*, 2011; Rodríguez-Sánchez *et al.*, 2012); y actualmente, estos pigmentos naturales se emplean como aditivos en fórmulas farmacéuticas y alimentos procesados; como por ejemplo la clorofila, la cual proporciona una actividad quelante que puede utilizarse en tratamientos farmacológicos, especialmente la reparación celular, el aumento de la hemoglobina en la sangre y el aumento del crecimiento celular (Humphrey, 2004).

En Venezuela, las investigaciones sobre producción de biomasa de *Arthrospira* y productos derivados de ésta, son escasos (Loreto *et al.*, 2007; Romero, 2009; Romero *et al.*, 2011; Rincón *et al.*, 2013; Licet *et al.*, 2014) y no se ha logrado desarrollar una tecnología que pueda aprovechar los beneficios que brinda esta microalga. Por tal motivo, el trabajo aquí descrito será pionero en la evaluación del contenido de pigmentos liposolubles (β-caroteno, clorofila *a*, zeaxantina) y ficobiliproteínicos (ficocianina, ficoeritrina, aloficocianina) extraídos de *Arthrospira maxima*, cultivada en dos sistemas de fotobiorreactores, en ambientes controlados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo. Se utilizó una cepa de *Arthrospira maxima* procedente de la colección de Texas (UTEX), donada por el Laboratorio de Microalgas del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR, México) y mantenida en el Banco de Germoplasma de Algas de la Universidad de Oriente (Código: BGAUDO-260), ubicado en el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas, Departamento de Biología Pesquera, Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente.

Condiciones de cultivo. *A. maxima* fue cultivada en medio Zarrouk (Zarrouk, 1966), de forma discontinua, durante 30 días, en dos tipos de fotobiorreactores, como se describe en Romero *et al.* (2011), con suministro de luz artificial haciendo uso de lámparas fluorescentes de 40 w, las cuales suministraban una intensidad luminosa de 5000 lux, con fotoperiodo de 12:12. En estos sistemas de cultivo se determinaron las fases de crecimiento exponencial y estacionario. Durante este periodo de cultivo, diariamente se midió el pH, utilizando un pHmeter Denver, AP 10.

Determinación del contenido de pigmentos

Clorofila a, β -caroteno y zeaxantina. Los pigmentos fueron determinados durante las fases de crecimiento exponencial (día 12) y estacionaria (día 24), a partir de 20 mg de biomasa húmeda, obtenida por filtración en papel de fibra de vidrio Advantec GC50 (1,2 μ m) haciendo uso de equipo Millipore, la cual se homogeneizó con 10 mL de acetona al 90%, durante 24 h, a 4 °C. Seguidamente, se centrifugó (3500 r.p.m., 5 min) para obtener el extracto de pigmentos, el cual se llevó a sequedad bajo ambiente de nitrógeno gaseoso y se mantuvo a -20 °C hasta su posterior análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La columna utilizada fue Agilent Hypersil MOS (4,6 x 100 mm, 5 μ m de tamaño de partícula); detector de arreglo de diodos, utilizando estándares de clorofila a y β -caroteno y zeaxantina, bajo parámetros periódicos de flujo de solventes de 1 ml min⁻¹, tiempo de corrida y post-corrída de 20 y 1 min respectivamente, con rangos de presiones entre 0–400 bar, longitud de onda de 440 y 667 nm; y tiempo de detección de 20 min; con volumen de inyección de 100 μ L; corrida por gradiente.

Pigmentos ficobiliproteínicos. Para la extracción de estos pigmentos se evaluaron, por triplicado, cuatro (04) métodos. En todos los casos, la cuantificación de los contenidos de ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina se realizó mediante espectrofotometría UV-Visible, midiendo las absorbancias de los extractos a los máximos de absorción de 650, 620 y 565nm (Boussiba & Richmond, 1979; Bryant *et al.*, 1979):

Primer método: extracción con regulador de fosfatos y enzima (Boussiba & Richmond, 1979).

Segundo método: extracción con solución alcalina, previo tratamiento con CaCl₂, la cual consistió en mezclar 20 mg de la biomasa de la cianobacteria con 4 mL de una solución de CaCl₂ (10 mg L⁻¹) durante 45 min., posteriormente se realizaron lavados con 4 mL de CaCl₂, y se eliminó el sobrenadante. Al precipitado se le adicionó 4 mL de solución alcalina (pH = 10; NaHCO₃-Na₂CO₃). Se agitó por 2 horas, se centrifugó, y el sobrenadante fue lavado con 4 mL de C₆H₁₄; finalmente, la fase acuosa fue filtrada y se realizaron las medidas a las absorbancias a los máximos de absorción.

Tercer método: extracción con regulador de fosfato tratado con hielo seco. Para ello, se mezclaron 20 mg de la biomasa de la cianobacteria con 4mL de regulador de fosfato y se sometió a congelación inmediata, incorporándole hielo seco; seguidamente se dejó a temperatura ambiente para su descongelación, repitiéndose tres veces este ciclo. Posteriormente, se centrifugó (3500 r.p.m., 5 min) y al sobrenadante se le midió las absorbancias a los máximos de absorción.

Cuarto método: extracción con agua a baja temperatura. Consistió en triturar en vortex, 20 mg de la biomasa de la cianobacteria con 4 mL agua destilada fría (4°C); posteriormente, se centrifugó y al sobrenadante se le midió las absorbancias a los máximos de absorción.

Análisis estadísticos

Una vez evaluados los datos en el cumplimiento de los supuestos de homogeneidad y normalidad, los resultados de pigmentos liposolubles (clorofila a, β -caroteno y zeaxantina) se analizaron a través de una ANOVA de dos vías (factor 1: fases de crecimiento, factor 2: sistema de cultivo). Los contenidos de ficobiliproteínas se analizaron a través de un ANOVA de tres vías (factor 1: fases de crecimiento, factor 2: sistema de cultivo y factor 3: metodología de extracción), siguiendo recomendaciones de Sokal & Rohlf (1995). La existencia de diferencias significativas ($P < 0,05$) se contrastó mediante el método de comparaciones múltiples de Scheffé (Zar, 1984), empleándose en ambos análisis el paquete estadístico Statgraphics plus 4.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de pH registrados en los cultivos de *A. maxima* en ambos fotobiorreactores variaron entre 9,81 y 10,32 unidades de pH, los cuales están en concordancia con lo reportado por la mayoría de los autores, quienes indican que el metabolismo de *A. maxima*, así como el de otras especies del género *Arthrospira* es óptimo a pH entre 9 y 11 (Rafiqul *et al.*, 2005), lo cual garantiza, además, que los cultivos sean me-

nos contaminados por otros organismos competidores y/o depredadores, tipo microalgas o protozoarios (Ciferri, 1983). Situación está que se corroboró en este trabajo, ya que no se evidenció en los cultivos la presencia de este tipo de organismos. El estudio del pH como un factor que afecta el crecimiento de cianobacterias ha sido estudiado por Monaselidze *et al.* (2002), quienes concluyen que el rango óptimo de pH para *S. platensis* (en medio Zarrouk, en fase estacionaria y en oscuridad) varió entre 9,4 y 10,3; y que la termoestabilidad de las macromoléculas y los complejos responsables de la respiración celular depende débilmente del pH, más no así la morfología de los tricomas, células y composición proteica.

Los contenidos de clorofila *a*, zeaxantina y β -caroteno se muestran en la figura 1. El análisis de varianza reveló diferencias significativas ($P < 0,05$) en el contenido de estos pigmentos tanto en los tipos de fotobiorreactores como en las fases de crecimiento, siendo el fotobiorreactor helicoidal y la fase de crecimiento exponencial (12 días) donde se obtuvieron los mayores contenidos de clorofila *a* ($11,08 \pm 0,006 \mu\text{g mL}^{-1}$; 0,96%), zeaxantina ($0,72 \pm 0,002 \mu\text{g mL}^{-1}$; 0,06%) y β -caroteno ($1,82 \pm 0,003 \mu\text{g mL}^{-1}$; 0,16%).

Los resultados del contenido de clorofila *a* en esta investigación coinciden con lo reportado por Godoy *et al.* (2011), y Parages *et al.* (2012), quienes encontraron en *Arthrospira* contenidos de este pigmento entre 0,6–1,6%. Contenidos de clorofila *a*, superiores a los encontrados en esta investigación ($11,08 \mu\text{g mL}^{-1}$, 0,96% con respecto a la masa seca) fueron señalados por otros autores. Sin embargo, otros trabajos han reportado valores superiores, por ejemplo Leema *et al.* (2010), llegó a determinar hasta $350 \mu\text{g mL}^{-1}$ en la fase estacionaria para *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivada en medio Zarrouk modificado con NaHCO_3 y agua de mar; y Jain & Singh (2012) obtuvieron contenidos de clorofila *a* de hasta 2,1% en cultivos de *Spirulina (Arthrospira) platensis* enriquecidos con NaHCO_3 , NaCl , NaNO_3 y extractos (30%) de calabaza blanca (*Benincasa hispida*). Esta discrepancia de resultados puede deberse a las diferencias en las condiciones de cultivos y a los métodos de cuantificación empleados.

Contenidos de β -caroteno similares a los determinados en esta investigación ($1,82 \pm 0,003 \mu\text{g mL}^{-1}$; 0,16% con respecto a la masa seca) fueron señalados por Rafiqul *et al.* (2003), con *Spirulina platensis*; sin embargo, Leema *et al.* (2010), cuantificaron valores de β -caroteno superiores (0,37%) en *A. platensis* cultivada en medio Zarrouk. Estas diferencias de resultados podría deberse a que los anteriores autores utilizaron intensidades luminosas de $140 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mayores que las empleadas en este trabajo (95

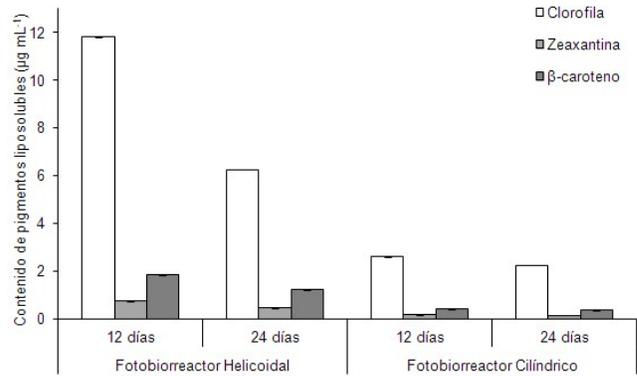


Figura 1. Contenido de pigmentos liposolubles ($\mu\text{g mL}^{-1}$, promedio \pm desv. estándar) en *A. maxima*, cultivada bajo condiciones controladas de laboratorio en fotobiorreactores.

$\mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$), y se ha demostrado que cultivos de microalgas expuestos a mayores intensidades luminosas tienden a acumular mayores contenidos de carotenoides para contrarrestar la fotooxidación (Demming-Adams & Adams, 2002).

Con respecto a los contenidos de ficobiliproteínas, de acuerdo a los diferentes métodos de extracción, el análisis de varianza reveló diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los 4 métodos de extracción usados, los dos tipos fotobiorreactores y los dos periodos de cosecha, para cada uno de los pigmentos analizados; obteniéndose los mayores contenidos en el fotobiorreactor cilíndrico, en la fase de crecimiento estacionario (24 días) y cuando la extracción fue realizada con regulador de fosfato tratado con hielo seco (figura 2). El pigmento en mayor proporción fue la ficocianina ($78,51 \pm 0,778 \text{ mg L}^{-1}$; 8,72% con respecto a la masa seca), seguido por la aloficocianina ($49,24 \pm 0,767 \text{ mg L}^{-1}$; 5,36% con respecto a la masa seca) y ficoeritrina ($20,27 \pm 0,235 \text{ mg L}^{-1}$; 2,25% con respecto a la masa seca).

El mayor contenido de ficocianina obtenido en esta investigación ($78,51 \text{ mg L}^{-1}$, equivalente al 8,72%) fue superior que el obtenido por Sandeep *et al.* (2015), en *A. platensis* (5%) utilizando buffer fosfato como solvente de extracción y similar a los señalados por Becker (1994) y Simpoire *et al.* (2005), quienes indicaron que en *Arthrospira* las concentraciones de ficocianina pueden llegar a alcanzar entre el 9 y 15% de la masa seca del alga. Las mayores concentraciones de ficocianina presentes en los cultivos realizados en el fotobiorreactor cilíndrico se puede deber a limitación lumínica que afectó a este cultivo, ya que a juicio de Verneirey *et al.* (2001), quienes realizaron un estudio relacionado con el diseño de fotobiorreactores para el cultivo de *Spirulina platensis*, se podría propiciar la síntesis de

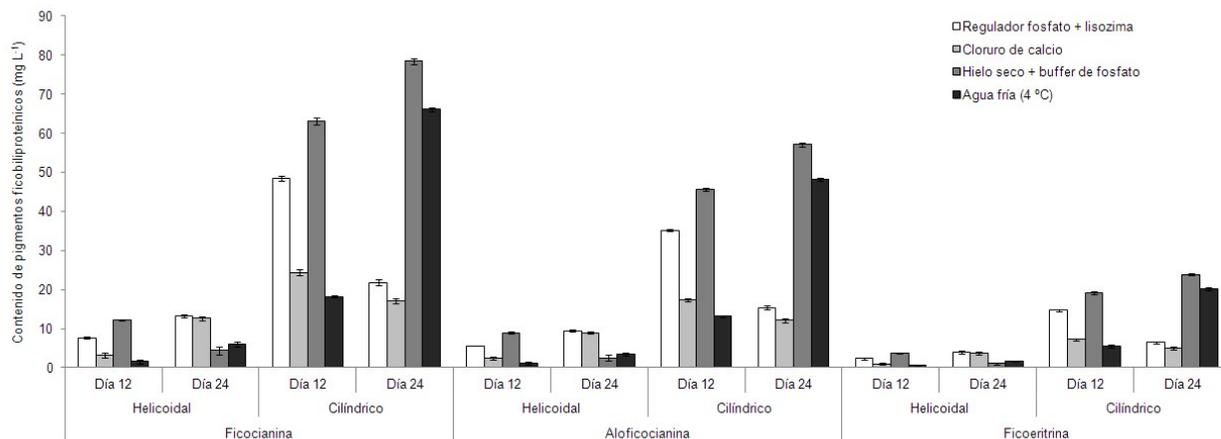


Figura 2. Contenido de ficobiliproteínas (mg L^{-1} ; promedio \pm desv. estándar), obtenido a través de los diferentes métodos de extracción, de *A. maxima* cultivada bajo condiciones controladas de laboratorio en fotobiorreactores helicoidal y cilíndrico y cosechada durante las fases de crecimiento exponencial (12 días) y estacionario (24 días).

ficocianina por parte de las células de esta cianobacteria al verse limitadas de luz, para captar de manera más eficiente la energía luminosa.

Así mismo, Ajayan *et al.* (2012), además de reportar altos valores de clorofila *a*, también cuantifican el contenido de ficobiliproteínas ($\text{PC} = 148,1 \text{ mg g}^{-1}$; $\text{APC} = 45,2 \text{ mg g}^{-1}$; $\text{FE} = 5,8 \text{ mg g}^{-1}$), encontrando que las mayores concentraciones de estos pigmentos, al realizar la extracción con buffer fosfato, se logran producirse por *Spirulina (Arthrospira) platensis* dependiendo del tipo de nutriente utilizado para su cultivo (urea y KNO_3) y las distintas intensidades lumínicas.

En vista del interés biotecnológico que representa la ficocianina, la búsqueda de sistemas de cultivo y técnicas de extracción y purificación más eficientes para la obtención de este pigmento se han venido incrementando. De esta manera, Furuki *et al.* (2003), lograron obtener un mayor contenido de ficocianina de *A. platensis*, utilizando irradiación ultrasónica 28 kHz, Lamela & Márquez-Rocha (2000) obtuvieron $19,83 \text{ mg g}^{-1}$ de ficocianina (1,9 % con relación a su masa seca) al aplicar sonicación y posterior congelación con buffer fosfato ($\text{pH} = 7$). García & Pérez (2011) incrementaron la extracción de ficocianina a partir de *Arthrospira platensis (Spirulina)*, realizando la extracción de las ficobiliproteínas con la técnica de congelación-descongelación de -4°C a 4°C , en cuatro ciclos consecutivos, reportando una pureza de ficocianina igual al 2%, con un porcentaje de recuperación del 2%.

De forma general, en la presente investigación se puede indicar que el tratamiento de la biomasa de *A. maxima* con buffer de fosfato más hielo seco permitió

extraer un contenido considerable de ficocianina similar al reportado por otros investigadores (Bryant *et al.*, 1979; Bryant, 1981; Fukushima & Aizaki, 2005), faltando por precisar mejores condiciones y sistemas de cultivo de esta microalga, a fin de optimizar la producción de este valioso metabolito.

Al culminar esta investigación se corroboró que *Arthrospira maxima* es una cianobacteria con potencial biotecnológico, debido, entre otras características, al contenido de pigmentos que posee, los cuales son productos base en la industria de la alimentación humana y animal, farmacéutica y de la medicina; Por tal motivo, es importante encontrar un sistema de cultivo que permita obtener biomasa con altos contenidos de estos pigmentos, aunado a ensayar metodologías que permitan la mejor obtención de los mismos, evitando su degradación.

CONCLUSIONES

El tipo de fotobiorreactor a utilizar para la obtención de pigmentos dependerá del interés que se tenga en un pigmento u otro. Así, para obtener los mayores contenidos de pigmentos liposolubles se recomienda utilizar un fotobiorreactor helicoidal, realizando la cosecha durante la fase exponencial. Si por el contrario, se quiere obtener mayores contenidos de ficobiliproteínas se recomienda utilizar fotobiorreactor cilíndrico, con cosecha en fase estacionaria, con extracción con regulador de fosfato tratado con hielo seco. Es importante seguir desarrollando nuevos diseños de fotobiorreactores que permitan obtener biomasa de *Arthrospira* rica en compuestos de interés biotecnológico.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Investigación, Postgrado en Ciencias Marinas del Instituto Oceanográfico de Venezuela y Museo del Mar de la Universidad de Oriente, Venezuela. Al CIBNOR.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ajayan, K. V., Selvaraju, M., & Thirugnanamoorthy, K. (2012). Enrichment of chlorophyll and phycobiliproteins in *Spirulina platensis* by the use of reflector light and nitrogen sources: An *in-vitro* study. *Biomass and bioenergy*, 4, 436-441.
- Becker, E. (1994). Microalgae: biotechnology and microbiology. En J. Baddiley, N. Carey, I. Higgins & W. Potter (Ed.), *Studies in Biotechnology* (p. 111-195). London: Cambridge University Press.
- Boussiba, S., & Richmond, A. (1979). Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Archives of Microbiology*, 120, 155-159.
- Bryant, D. (1981). The photoregulated expresión of multiple phycocyanin species. *European Journal of Biochemistry*, 119, 425-429.
- Bryant, D., Guglielini, G., Tandeau, N., Castets, A., & Cohen, G. (1979). The structure of cyanobacterial phycobilisomes: A model. *Archives of Microbiology*, 123, 113-127.
- Cano-Europa, E., Blas, V., Rodríguez, R., Torres, P., Franco, M., Hernández, A., & Ortiz, R. (2012). Uso terapéutico de algunos microorganismos, microalgas, algas y hongos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 43 (4), 22-30.
- Challem, J. (1981). *Spirulina*. A Good Health Guide. New Canaan: Keats Publishing.
- Ciferri, O. (1983). *Spirulina*, the edible microorganism. *Microbiological Reviews*, 47(4), 551-578.
- Colla, L., Furlong, E., & Vieira, J. (2007a). Antioxidant properties of *Spirulina (Arthrospira) platensis* cultivated under different temperatures and nitrogen regimes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(1), 161-167.
- Colla, L., Reinehr, C., Reichert, C., & Vieira, J. (2007b). Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresource Technology*, 98(7), 1489-1493.
- Demming-Adams, B., & Adams, W. 2002. Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. *Science*, 298, 2149-2153.
- Fukushima, T., & Aizaki, M. (2008). MeREM Training Course: Determination of microcystin and microalgal pigments. 3rd International Workshop on MeREM. Recuperado de <http://enews.agu.edu.vn/uploads/imgposts/MeREM/abstracts.pdf>.
- Furuki, T., Maeda, S., Imajo, S., Hiroi, T., Amaya, T., & Hirokawa T. (2003). Rapid and selective extraction of phycocyanin from *Spirulina platensis* with ultrasonic cell disruption. *Journal of Applied Phycology*, 15, 319-324.
- García, A., & Pérez, A. (2011). Desarrollo de una metodología alternativa para la optimización del proceso de obtención de la ficocianina proveniente de la microalga *Arthrospira platensis (Spirulina)* (Trabajo de Pregrado). Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- Glazer, A. (1985). Light harvesting by phycobilisomes. *Annual Review Biophysics Chemistry*, 14, 47-77.
- Godoy, E., Rangel-Yagui, C., Sato, S., & Monteiro, J. (2011). 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*, 42, 362-373.
- Grobbelaar, J. (2000). Physiological and technological considerations for optimizing mass algal cultures. *Journal of Applied Phycology*, 12, 201-206.
- Harun, R., Singh, M., Forde, G., & Danquah, M. (2010). Bio-process engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 1037-1047.
- Humphrey, A. (2004). Chlorophyll as a colour and functional ingredient. *Journal of Food Science*, 69, 422-425.
- Jain, S., & Singh, S. (2012). Optimization of biomass yield of *Spirulina platensis* grown in petha (*Benincasa hispida* Thumb.) waste in different culture conditions. *Indian Journal of Biotechnology*, 11, 498-501.
- Kovač, D., Simeunović, J., Babić, O., Mišan, A. & Milovanović, I. (2013). Algae in food and feed. *Food and Feed Research*, 40(1), 21-31.
- Lamela, T., & Márquez-Rocha, F. (2000). Phycocyanin production in seawater culture of *Arthrospira maxima*. *Ciencias Marinas*, 26(4), 607-619.
- Leema, J., Kirubakaran, R., Vinithkumar, N., Dheenan, P., & Karthikayulu, S. (2010). High value pigment production from *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultured in seawater. *Bioresource Technology*, 101, 9221-9227.
- Licet, B., Guevara, M., Lemus, N., Freitas, L., Romero, L., Lodeiros, C., & Arredondo-Vega, B. (2014). Crecimiento y composición bioquímica de *Arthrospira platensis* (División Cyanophyta) cultivada a diferentes salinidades y fuentes de nitrógeno. *Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela*, 53(1), 3-13.
- Loreto, C., G. Fuenmayor, B. Briceño, Rosales, N., & Morales, E. (2007). Calidad microbiológica y bioquímica de derivados comerciales de la cianobacteria *Spirulina*. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 41(1), 107-113.
- Medina-Jaritz, N., Perez-Solis, D., Ruiloba, S., & Olvera-Ramírez, R. (2011). Antimicrobial activity of aqueous and methanolic extracts from *Arthrospira maxima*. *FORMATEX*, 1267-1271.
- Monaselidze, J., Barbakadze, S., Kvirikashvili, S., Majagaladze, G., Khachidze, D., & Topchishvili, L. (2002). Thermal characteristics of *Spirulina platensis* cells under nongrowing conditions at various values of pH medium. *Biomacromolecules*, 3, 783-786.
- Nuhu, A. (2013). *Spirulina (Arthrospira)*: An Important Source of Nutritional and Medicinal Compounds. *Journal of Marine Biology*. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1155/2013/325636>.
- Ogbonda, K., Rebecca, E., & Gideon, O. (2007). Influence of temperature and pH on biomass production and protein

- biosynthesis in a putative *Spirulina* sp. *Bioresource Technology*, 98(11), 2207-2211.
- Pandey, J., & Tiwari, A. (2010). Optimization of biomass production of *Spirulina maxima*. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 1(2), 20-32.
- Parages, M., Rico, R., Abdala-Díaz, R., Chabrilón, M., Soti-Sotiroidis, T., & Jiménez, C. (2012). Acidic polysaccharides of *Arthrospira (Spirulina) platensis* induce the synthesis of TNF- α in RAW macrophages. *Journal of Applied Phycology*, 24, 1537-1546.
- Rafiqul, I., Hassan, A., Sulebele, G., Orosco, C., Roustaian, P., & Jalal, K. (2003). Salt stress culture of blue green algae *Spirulina fusiformis*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 6(7), 648-650.
- Rafiqul, I., Jalal, K. & Alam, M. (2005). Environmental factors for optimization of *Spirulina* biomass in laboratory culture. *Biotechnology*, 4(1), 19-22.
- Ravelonandro, P., Ratianarivo, D., Joannis-Cassan, C., Isambert, A., & Raherimandimby, M. (2011). Improvement of the growth of *Arthrospira (Spirulina) platensis* from To-liara (Madagascar): Effect of agitation, salinity and CO₂ addition. *Food and Bioproducts Processing*, 89(3), 209-216.
- Rincón Rodríguez, David D., Semprún Avendaño, Abraham M., Dávila Ojeda, Martín J., Velásquez Gonzalez, Humberto A., Morales Avendaño, Ever D., & Hernández, J. (2013). Producción de harina de *Spirulina máxima* para ser empleada como ingrediente en la elaboración de dietas para peces. *Zootecnia Tropical*, 31(3), 187-192. Recuperado en 26 de abril de 2017, de http://www.scielo.org/ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-72692013000300001&lng=es&tlng=es.
- Rodríguez-Sánchez, R., Ortiz-Butrón, R., Blas-Valdivia, V., Hernández-García, A., & Cano-Europa, E. (2012). Phycobiliproteins or C-phycoyanin of *Arthrospira (Spirulina) maxima* protect against HgCl₂-caused oxidative stress and renal damage. *Food Chemistry*, 135, 2359-2365.
- Romero, L. (2009). Estudio químico y establecimiento de un protocolo de extracción de ficocianina a partir de biomasa de *Arthrospira maxima* obtenida bajo dos condiciones de cultivo (Tesis de Maestría). Postgrado en Ciencias Marinas, Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela.
- Romero, L., Guevara, M., Arredondo, B., Gómez, B., Licet, B., & Freitas, L. (2011). Contenido de lípidos, ácidos grasos, exopolisacáridos y minerales de *Arthrospira maxima* cultivada en fotobiorreactores. *Agronomía Tropical*, 61 (3-4): 231-240.
- Sandeep, K., Shukla, S., Vennila, A., Purushothaman, C., & Manjulekshmi, N. (2015). Cultivation of *Spirulina (Arthrospira) platensis* in low cost seawater based medium for extraction of value added pigments. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 44(3), 1-10.
- Santos, M., Seno, L., Ferreira, L., Monteiro, J., Lodi, A., Finocchio, E., & Converti, A. (2012). Metal biosorption onto dry biomass of *Arthrospira (Spirulina) platensis* and *Chlor-ella vulgaris*: Multi-metal systems. *Journal of Hazardous Materials*, 217-218, 246-255.
- Simpore, J., Zongo, F., Kabore, F., Dansou, D., Bere, A., Nikiema, J., Pignatelli, S., Biondi, D., Ruberto, G., & Musumeci S. (2005). Nutrition Rehabilitation of HIV-Infected and HIV-Negative Undernourished Children Utilizing *Spirulina*. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 49, 373-380.
- Sokal, R., & Rohlf, J. (1995). *Biometry: The Principles and Practices of Statistics in Biological Research*. Third edition. W.H. Freeman and Company: New York. ISBN 978-0-7167-2411-7. xix, 887 pp.
- Soletto, D., Binaghi, L., Ferrari, L., Lodi, A., Carvalho, J., Zilli, M., & Converti, A. (2008). Effects of carbon dioxide feeding rate and light intensity on the fed-batch pulse-feeding cultivation of *Spirulina platensis* in helical photobioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 39(2), 369-375.
- Soundarapandian, P., & Vasanthi, B. (2010). Effects of chemical parameters on *Spirulina platensis* biomass production: Optimized method for phycocyanin extraction. *International Journal of Zoological Research*, 6(4), 293-303.
- Uslu, L., Işık, O., Koç, K., & Göksan, T. (2011). The effects of nitrogen deficiencies on the lipid and protein contents of *Spirulina platensis*. *African Journal of Biotechnology*, 10(3), 386-389.
- Van Den Hoek, C., Mann, D., & Jahns, H. (1995). *Algae. An introduction to Phycology*. Londres: Cambridge University Press.
- Venkataraman, G. (1981). Blue-green algae for rice production. *FAO Soil Bull*, 16, 33-42.
- Vernerey, A., Albiol, J., Lasseur, C., & Còdia, F. (2001). Scale-up and design of a pilot-plant photobioreactor for the continuous culture of *Spirulina platensis*. *Biotechnology Progress*, 17, 431-438.
- Vonshak, A. (1997a). *Spirulina*: growth, physiology and biochemistry. En A. Vonshak (Ed.), *Spirulina platensis (Arthrospira)*. Physiology, cell-biology and biotechnology (p. 43-65). Londres: Taylor y Francis.
- Vonshak, A. (1997b). *Spirulina platensis (Arthrospira)*: physiology, cell biology and biotechnology. *Journal of Applied Phycology*, 9, 295-596.
- Yuan, X., Kumar, A., Sahu, A., & Ergas, S. (2011). Impact of ammonia concentration on *Spirulina platensis* growth in an air lift photobioreactor. *Bioresource Technology*, 102 (3), 3234-3239.
- Zar, J. (1984). *Biostatistical analysis*. New Jersey: Prentice Hall, Englewoods Cliff.
- Zarrouk, C. (1966). Contribution l'étude d'ue cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croisse et la photosynth se de *Spirulina maxima* (Setch et Gardner) Geitler (Tesis Doctoral). Facultad de Ciencias, Universidad de París. Francia.