



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
FACULTADE DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOXÍA CELULAR E MOLECULAR
Área de Microbioloxía



**Producción, purificación y
caracterización de ficocianina de
Synechococcus sp. IO9201 aislada
en aguas de Cuba**

LILIANA BETANCOURT FERNANDEZ
A Coruña, 1997



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
FACULTADE DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOXÍA CELULAR Y MOLECULAR

ÁREA DE MICROBIOLOXÍA

**Producción, purificación y caracterización de la
ficocianina de *Synechococcus* sp. IO9201 aislada
en aguas de Cuba**

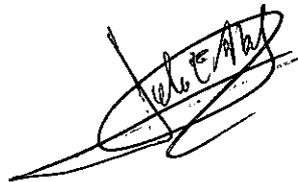
Memoria que para optar al Grado
de Doctor presenta **LILIANA
BETANCOURT FERNÁNDEZ**

A Coruña, 1997

JULIO ERNESTO ABALDE ALONSO, Profesor Titular de Microbiología,
del Departamento de Biología Celular y Molecular de la Facultad de
Ciencias de la Universidad de La Coruña,

INFORMAN: que la presente Tesis Doctoral titulada "**Producción,
purificación y caracterización de la ficocianina de
Synechococcus sp. IO9201 aislada en aguas de Cuba**",
que para optar al Grado de Doctor en Biología presenta
D^a. Lilibiana Betancourt Fernández, ha sido realizada bajo
mi dirección en el Departamento de Biología Celular y
Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de
La Coruña y que, hallándose concluida, autorizamos su
presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal
correspondiente.

Y para que así conste, firmo el presente en La Coruña a 1
de abril de 1997.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Julio E. Abalde', is written over a large, stylized, circular scribble or flourish.

Fdo. Prof. Dr. Julio E. Abalde Alonso

A mis padres y hermana

A Alejandro

Agradecimientos

Deseo expresar en primer lugar mi más sincero agradecimiento a los Dres Julio Abalde y Concepción Herrero por su constante apoyo y orientaciones durante el desarrollo del trabajo y por darme la oportunidad de ampliar mi formación como investigadora y conocer otros mundos y formas de vivir.

Quisiera agradecer además a la Dra. Angeles Cid por sus acertadas sugerencias y por haberme acompañado con su natural entusiasmo y sentido de la amistad.

Al Dr. Pablo Fidalgo por su paciencia en la enseñanza de algunas técnicas; al Dr. Enrique Torres por su colaboración sin reparos ante cualquier pregunta y su ayuda en los análisis de aminoácidos; a Marcial y a Juan por su apoyo espontáneo y alegre en cualquier circunstancia, a Susana, Miguel, Loly, Rosa, Lilitana M. el estar siempre prestos a ayudar. En fin a todos por haberme creado un clima favorable para hacer de mi trabajo y mi estancia en el laboratorio una experiencia muy positiva.

A la Dra. Angela Noguero por su amable ayuda y valiosas orientaciones en el campo de la taxonomía. A Ana por su colaboración siempre que fue necesario.

Al Dr. Clive Barwell por poner a mi disposición con amistad y paciencia su laboratorio y por los muchos conocimientos adquiridos. A los Dres. Silvana y Alex Sampaio en quienes descubrí lo mejor de la amistad y encontré mi familia brasileña en tierras inglesas. A Ming, Sipra y a todos los compañeros del Laboratorio de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Portsmouth por su ayuda.

A Roberto Pérez por su ánimo y guía en los momentos iniciales, a J. Lagomasino por sus orientaciones cromatográficas y apoyo en la distancia.

A mis padres mi más sincero y eterno agradecimiento. Por todo, gracias. A Lise por su constante optimismo, a Juana por estar siempre ahí y junto a toda mi familia por su cariño reflejado en las letras a distancia. A los abuelos Pepe y Ademina por haberme aceptado como una hija más.

A mi esposo, gracias por estar siempre presente y porque sin su ánimo y ayuda "esto" no se hubiera hecho realidad.

Gracias especiales a Marina, Mary y Juan por el inmenso cariño y ánimo que me han brindado durante este tiempo y a todos los amigos que siempre han tenido tiempo para escuchar y acompañar.

No quisiera acabar estos agradecimientos sin darles las gracias a mis amigos "del grupo de inglés" por su inestimable y alegre apoyo en todos los momentos.

A TODOS,

muchas gracias.

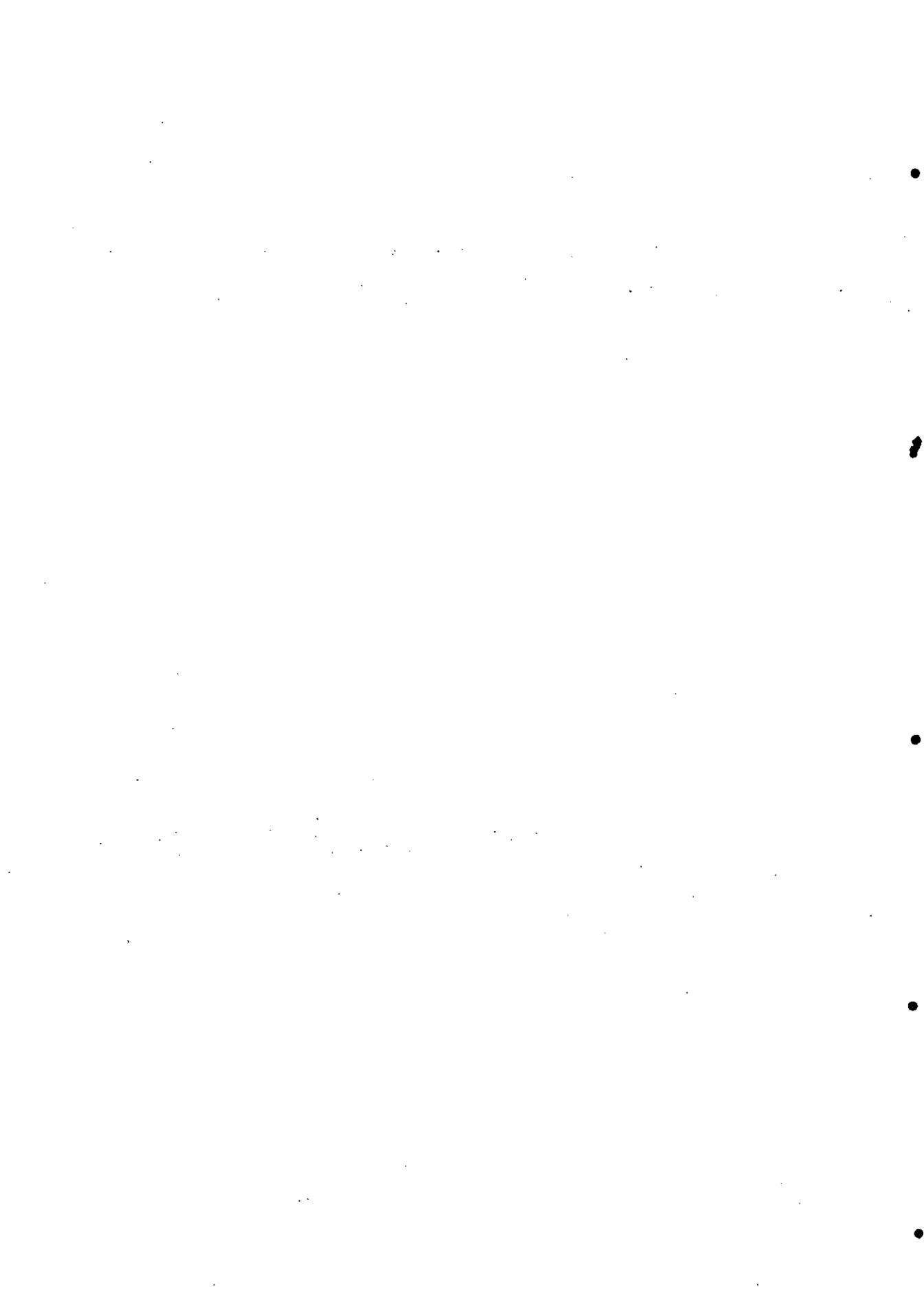
La realización de esta Tesis fue posible gracias a una beca del *Instituto de Cooperación Iberoamericana* (I.C.I.) correspondiente al Plan MUTIS y a la financiación de la *Xunta de Galicia* a través de proyectos de investigación (refs.: XUGA-10302B90 y XUGA-10301B94). Igualmente, este trabajo ha sido posible gracias a la colaboración de la *Universidad de La Coruña*, que ha apoyado institucionalmente la permanencia de la autora durante el tiempo de realización de la misma, y, en particular, queremos agradecer la colaboración prestada por los *Servicios Xerais de Apoio a Investigación* del *Vicerrectorado de Investigación* de la Universidad de la Coruña por su apoyo técnico para la realización de parte de los trabajos experimentales de esta tesis.

Indice

1.- Introducción	11
2.- Objetivo	35
3.- Material y métodos	39
3.1.- Origen y descripción de la especie utilizada, <i>Synechococcus</i> sp. IO9201	41
3.2.- Cultivo de <i>Synechococcus</i> sp. IO9201	43
3.3.- Determinación de la densidad celular	44
3.4.- Determinación de peso seco y cenizas	45
3.5.- Determinación espectrofotométrica de los pigmentos fotosintéticos ..	46
3.6.- Determinación del contenido de proteínas	48
3.7.- Análisis elemental (CNH)	50
3.8.- Determinación del contenido de carbohidratos	51
3.9.- Determinación del contenido de lípidos	52
3.10.- Análisis estadístico	53
3.11.- Purificación del extracto de ficobiliproteínas	54
Cromatografía de interacción hidrofóbica	54
Cromatografía de intercambio iónico	55
3.12.- Caracterización molecular de la ficocianina	56
3.12.4.- Análisis de la composición de aminoácidos	62
4.- Experiencias y resultados	65
4.1.- Evaluación de diferentes métodos de extracción de ficocianina de <i>Synechococcus</i> sp. IO9201.	67
4.2.- Efecto de la concentración de nitrógeno sobre el crecimiento y composición bioquímica de <i>Synechococcus</i> sp. IO9201.	71

4.3.- Efecto de la relación inicial N/P en el crecimiento y composición bioquímica de <i>Synechococcus</i> sp. IO9201.	85
4.4.-Efecto de la calidad espectral en el crecimiento y pigmentación de <i>Synechococcus</i> sp. IO9201.	99
4.5.-Composición bioquímica de la biomasa liofilizada de <i>Synechococcus</i> sp. IO9201.	109
4.6.- Proceso de Purificación de la Ficocianina	111
Evaluación de resinas de cromatografía de interacción hidrofóbica	111
Cromatografía de interacción hidrofóbica	113
Cromatografía de intercambio iónico	115
4.7.- Estimación del peso molecular de la fracción de ficocianina purificada	
4.8.- Determinación del punto isoelectrico	125
4.9.- Determinación del peso molecular mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida	127
4.10.- Análisis de la composición de aminoácidos de la fracción de ficocianina purificada	129
5.- Discusión	131
6.- Conclusiones	161
7.- Bibliografía	165

1.- Introducción



Los microorganismos fotosintéticos se agrupan en principio en dos categorías: bacterias fotosintéticas y microalgas. Las primeras realizan fotosíntesis anoxigénica y poseen bacterioclorofila, químicamente diferente de la clorofila *a* presente en los otros organismos fotosintéticos (algas y plantas superiores). Las “algas verde-azules” ocupan una posición intermedia entre estas bacterias y las algas eucariotas; no poseen bacterioclorofila, sino clorofila *a*, y realizan fotosíntesis oxigénica. Sin embargo, su estructura celular procariota las sitúa taxonómicamente dentro del grupo de las bacterias (Reino Procaryotae), con la denominación de cianobacterias (Staley *et al.*, 1989)

No obstante, en un sentido amplio y desde el punto de vista biotecnológico, el término microalga suele referirse a aquellos microorganismos que contienen clorofila *a* y otros pigmentos fotosintéticos, capaces de realizar fotosíntesis oxigénica. En este contexto, las cianobacterias o algas verde-azules, procariotas, se han considerado tradicionalmente dentro del grupo de las microalgas. De hecho, algunas de estas cianobacterias, como las del género *Spirulina*, están entre las principales protagonistas de la biotecnología microalgal (Rodríguez & Guerrero, 1992). Recientemente, algunas especies de *Synechococcus* se han revelado muy prometedoras en este sentido (Matsunaga *et al.*, 1991; Takano *et al.*, 1992). Por tanto, el término microalga no tiene sentido taxonómico alguno y dentro del mismo se incluyen organismos con dos tipos celulares distintos: cianobacterias, que tienen una estructura celular procariota, y las restantes microalgas con estructura celular eucariota.

Las cianobacterias tienen una fisiología versátil y una amplia tolerancia ecológica. Son comunes en todos los hábitats naturales y la mayoría son especies cosmopolitas, con una amplia distribución. Se presentan como componentes casi permanentes del plancton y el bentos de océanos y lagos de zonas tropicales y templadas. Otras especies se encuentran adaptadas a hábitats terrestres y son especialmente abundantes en suelos tropicales y en terrenos inundados. Suelen aparecer también en ambientes con condiciones extremas, principalmente los que son cálidos, secos o ambos. Algunas crecen incluso

dentro de las rocas del desierto, en una capa delgada de la superficie (Friedmann & Borowitzka, 1982). Todo esto contribuye a su éxito competitivo en un amplio espectro de ambientes (Shilo, 1989).

En la actualidad, existe un interés creciente en el desarrollo de técnicas eficientes de cultivo de microalgas y cianobacterias, debido a que estos microorganismos constituyen una fuente de sustancias de uso industrial y farmacológico de gran valor económico. La utilización de estas especies en biotecnología se justifica por las importantes ventajas que les confiere la diversidad y la combinación de características de plantas y microorganismos presentes en las microalgas y cianobacterias. El grado de diversidad se manifiesta en sus hábitats, tamaños y niveles de organización, ciclo de vida, pigmentos fotosintéticos y su metabolismo.

Las cianobacterias poseen más tipos de pigmentos fotosintéticos que cualquier otro grupo de plantas y su clasificación está, en parte, basada en esta diversidad. Un grupo de pigmentos encontrados sólo en cianobacterias, algas rojas y criptofíceas, las ficobiliproteínas, recientemente han atraído la atención debido a su capacidad de formar conjugados altamente fluorescentes, con moléculas que poseen especificidad de enlace, como por ejemplo los anticuerpos (Glazer & Stryer, 1984; Glazer, 1994), y por otras múltiples aplicaciones.

Además de ser autótrofos fotosintéticos, las cianobacterias tienen características microbianas, tales como una alta tasa de crecimiento, un alto contenido proteico y un metabolismo variable que responde rápidamente a los cambios en las condiciones ambientales, características de considerable valor en biotecnología (Myers, 1980). De esta forma, además de los cultivos extensivos de la cianobacteria del género *Spirulina* y de otras microalgas que se han desarrollado durante años, principalmente en el sudeste asiático, para su utilización como alimento dietético y como aporte proteico en dietas de animales (Shelef & Soeder, 1980), continuamente se amplía la búsqueda de nuevas fuentes naturales para la obtención de compuestos químicos de múlti-

ples aplicaciones y, en este sentido, las especies de *Synechococcus* ocupan cada vez un lugar más importante.

Parámetros físicos de crecimiento

En el ambiente natural las microalgas y cianobacterias son capaces de crecer bajo requerimientos mínimos y en diversas condiciones, lo cual explica su amplia diversidad de hábitats, sobre todo en el caso de estas últimas. A pesar de las grandes diferencias estructurales entre ambos tipos de células, son fisiológicamente similares y presentan un metabolismo fotosintético parecido al de las plantas superiores.

No obstante, para lograr un cultivo masivo de cianobacterias y microalgas en crecimiento activo es necesario un inóculo viable de tamaño mínimo, suministro de nutrientes y microelementos, adecuadas condiciones fisico-químicas (temperatura, pH, salinidad, etc.) y luz como fuente de energía.

La luz constituye un factor fundamental en todo cultivo masivo de cianobacterias y microalgas, tanto por sí misma como por sus interrelaciones con otros parámetros. La radiación fotosintéticamente activa cae dentro del espectro visible (400-700 nm). Representa la fuente de energía para la fotosíntesis y, por tanto, la intensidad luminosa, la longitud de onda y el fotoperíodo, que marca el mecanismo para muchos ritmos circadianos, afectan al crecimiento y metabolismo de estas especies (Darley, 1982; Richmond, 1986a; Richmond, 1986b).

La temperatura es un parámetro físico, fundamental para el crecimiento de las microalgas y cianobacterias. La temperatura óptima para el crecimiento de la mayoría de las microalgas se sitúa entre 18 y 25 °C (Darley, 1982). Sin embargo, el intervalo de temperatura adecuado para el crecimiento de las cianobacterias es mucho más amplio que para las restantes especies microalgales (Fogg *et al.*, 1973).

La biomasa de las cianobacterias y microalgas responde continuamente a la temperatura ambiental y, de hecho, la temperatura intracelular se iguala a la del medio de cultivo. Además de afectar a las reacciones celulares, la temperatura también afecta a la naturaleza del metabolismo y a la composición de la biomasa (Richmond, 1986a). La interacción entre la temperatura y la intensidad de luz es muy acusada (Collins & Boylen, 1982). Por otra parte, si la temperatura del cultivo es alta, sobre todo en la fase de oscuridad, se puede producir una pérdida de biomasa considerable debida a una respiración intensiva (Hall, 1986).

La salinidad es otro de los parámetros a tener en cuenta, ya que puede afectar al crecimiento de las microalgas y cianobacterias en cultivo bien en función de su actividad osmótica o de su composición elemental. La célula de estos organismos se encuentra separada del medio por una membrana plasmática libremente permeable al agua pero no a los solutos; en respuesta a salinidades altas, debe equilibrar su presión osmótica con el exterior aumentando la síntesis de solutos o la incorporación de éstos del medio circundante. Aparte de esta respuesta osmorregulatoria, la adaptación a salinidades altas implica algunos cambios fisiológicos, tales como la pérdida de la actividad fotosintética (Richmond, 1986a).

Generalmente, las salinidades altas no son favorables para el crecimiento de las cianobacterias. En *Anacystis nidulans* se produce un descenso en la fotosíntesis con el incremento de la concentración de sal (Tadros *et al.*, 1995). Aquellas especies que toleran altos valores de salinidad no son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico, característica típica sólo de algunas cianobacterias. De esto se deduce que la fijación de nitrógeno es un proceso más sensible a cambios de salinidad que la fotosíntesis (Tel-Or, 1980). En otro sentido, altas salinidades provocan un aumento en el contenido de los aminoácidos esenciales metionina y fenilalanina de la cianobacteria *Aphonethece halophytica* (Brown *et al.*, 1989).

El pH es otro de los factores importantes en el cultivo masivo de las especies microalgales y de cianobacterias, pues determina la solubilidad del CO_2 y de los minerales, así como la distribución relativa de las formas inorgánicas de carbono (CO_2 , H_2CO_3 , HCO_3^- , CO_3^{2-}) e influye directa o indirectamente en su metabolismo (Becker, 1994). Cada especie tiene un óptimo de pH para su cultivo; un descenso de éste suele ser letal; en cambio suelen soportar mejor los incrementos del pH (Richmond, 1986a). A su vez, el pH de los cultivos masivos se ve afectado o puede ser influenciado por varios factores como composición y capacidad tampón del medio de cultivo, cantidad de CO_2 disuelto, temperatura (que a su vez controla la solubilidad del CO_2) y actividad metabólica de las células en cultivo (Venkataraman, 1983); la fuente de nitrógeno suministrada para el crecimiento juega un papel interactivo muy importante (Raven, 1988).

Para un crecimiento óptimo, el cultivo debe contener los nutrientes necesarios y en las cantidades adecuadas. Los elementos necesarios para el crecimiento de cianobacterias y microalgas pueden clasificarse en función de la cantidad en que son requeridos. Los macronutrientes son los elementos que forman parte de las moléculas estructurales: C, O, H, N, P, S y, en función de la especie, también pueden incluirse el Mg, Ca y K. Los micronutrientes se requieren en concentraciones en el medio de $\mu\text{g l}^{-1}$ o menores y forman parte de moléculas esenciales como factores de crecimiento o enzimas, o bien son necesarios como cofactores de enzimas: Fe, B, Mn, Cu, Zn, Mo, Co y vitaminas. Los principales macronutrientes a tener en cuenta en el cultivo masivo de cianobacterias y microalgas marinas son: C, N y P. Además, en la formulación de un medio de cultivo, no sólo son importantes las cantidades totales de nutrientes, sino también las proporciones entre ellos, por ejemplo la relación de N/P (Noûe & Pauw, 1988).

Satisfechos los requerimientos nutritivos y en condiciones ambientales adecuadas, la agitación constituye el requisito más importante para la obtención de altos rendimientos de biomasa de cianobacterias y microalgas, dado que

implica una serie de efectos positivos, tales como mejorar la distribución de nutrientes y luz a las células en cultivo, y evitar que éstas se depositen en el fondo del recipiente de cultivo, produciendo además una estimulación general del metabolismo celular (Richmond & Becker, 1986).

Otro factor importante para iniciar un cultivo masivo es la densidad inicial óptima o tamaño de inóculo. Concentraciones demasiado bajas pueden perderse por fotooxidación u otras causas, mientras que si son demasiado altas se producen pérdidas provocadas por la respiración o una ineficiente utilización de la energía luminosa, debido al propio ensombrecimiento (Becker & Venkataraman, 1982).

Variación en la composición bioquímica

La diversificación de las aplicaciones de los metabolitos de interés en las cianobacterias y microalgas cultivadas ha provocado un incremento de los estudios sobre el metabolismo, composición y producción de biomasa en estas especies.

Las condiciones ambientales tales como la intensidad y calidad de la luz (Falkowski & Owens, 1978; Kowallik, 1987; Sukenik & Wahnou, 1991), temperatura (Tadros & Johansen, 1988; Thompson *et al.*, 1992), concentración y tipo de nutrientes (Shifrin & Chisholm, 1981; Fábregas *et al.*, 1984; Fábregas *et al.*, 1989b), (Herrero *et al.*, 1991), salinidad (Tadros & Johansen, 1988), y fase de crecimiento (Emdadi & Berland, 1989; Fernández-Reiriz *et al.*, 1989; Henderson & Sargent, 1989) afectan al crecimiento y metabolismo de las cianobacterias y microalgas. No obstante, no pueden realizarse generalizaciones sobre las respuestas de estos microorganismos a las alteraciones ambientales dado que tales respuestas difieren según la especie (Brown *et al.*, 1989).

La modificación del medio de cultivo y la elección de diferentes puntos del ciclo de crecimiento para la recogida es probablemente el modo menos

costoso de obtener variabilidad en la composición bioquímica de la biomasa de cianobacterias y microalgas. En muchas de estas especies puede alterarse la proporción de los componentes celulares principales, proteínas, carbohidratos, lípidos y pigmentos, modificando la composición del medio de cultivo (Witt *et al.*, 1981).

Entre los distintos componentes del medio de cultivo, la fuente y la concentración de nitrógeno son determinantes de importantes cambios en el crecimiento y composición bioquímica de las especies microalgales y de cianobacterias en cultivo (Utting, 1985; Kaplan *et al.*, 1986; Vieira & Klaveness, 1986; Vonshak, 1986; Wikfors, 1986). Tanto el contenido proteico (Boussiba & Richmond, 1980; Rajasekaran *et al.*, 1981; Fábregas *et al.*, 1989a; Fábregas *et al.*, 1989b) como el contenido de pigmentos (Talarico, 1996) y la fracción lipídica (Cohen, 1986; Fábregas *et al.*, 1989a; Fábregas *et al.*, 1989b; Sriharan *et al.*, 1989) varían sustancialmente en función del nitrógeno (fuente y/o concentración) del medio.

En general, bajo limitación o deficiencia de N ó P, los niveles de proteína y pigmentos fotosintéticos decrecen mientras que los niveles de carbohidratos y/o lípidos tienden a aumentar (Wynne & Rhee, 1986).

Las ficobiliproteínas constituyen los pigmentos fotosintéticos más importantes en las cianobacterias; además de su función primaria en la fotosíntesis, pueden servir como reserva de nitrógeno celular (Lau *et al.*, 1977; Yamanaka & Glazer, 1980; Grossman *et al.*, 1986). Bajo condiciones de limitación de nitrógeno en la célula, las ficobiliproteínas son degradadas y utilizadas para la síntesis de otras proteínas esenciales y constituyentes celulares nitrogenados, reapareciendo de nuevo cuando la disponibilidad de nitrógeno es adecuada (Lau *et al.*, 1977; Yamanaka & Glazer, 1980; Grossman *et al.*, 1986). En estas últimas condiciones, el contenido de ficobiliproteínas puede llegar a constituir hasta el 60% de las proteínas solubles de la célula en el medio de cultivo (Gantt, 1981; Kana & Glibert, 1987). Un efecto similar ocurre con los compuestos de

azufre (Collier & Grossman, 1992), aunque su influencia suele ser menor en las cianobacterias debido a que la relación azufre/nitrógeno es más bien baja en la ficocianina comparada con otras muchas proteínas (Gantt, 1981). De igual forma, se sintetizan grandes cantidades de glucógeno durante períodos de limitación de nitrógeno y se movilizan cuando hay nitrógeno disponible (Fay, 1983).

Por otra parte, la presencia de los gránulos de cianoficina en las cianobacterias constituye también material de reserva nitrogenado y se acumulan durante la fase estacionaria de los cultivos deficientes de N, siendo degradados rápidamente al volverse a iniciar el crecimiento. Los gránulos de cianoficina son copolímeros de ácido aspártico y arginina de alto peso molecular y han sido caracterizados en *Anabaena cylindrica* (Simon & Weathers, 1976) y *Aphanocapsa* 6308 (Allen *et al.*, 1980; Allen & Weathers, 1980). De forma general, están presentes en todos los géneros de cianobacterias excepto en *Spirulina* (Humm & Wicks, 1980).

La habilidad de incorporar rápidamente los nutrientes esenciales y su inmediata acumulación en forma de material de reserva concentrado y, finalmente, la movilización controlada de dichas reservas es una adaptación sumamente importante de las cianobacterias frente a los cambios en el medio donde se encuentran.

La composición de los pigmentos en la célula es también controlada por la intensidad (densidad de flujo fotónico) y por la calidad (composición espectral) de la luz y sus variaciones producen efectos notables en los procesos metabólicos celulares. Los organismos fotosintéticos pueden modular su contenido relativo de pigmento en respuesta a cambios producidos en la intensidad de luz o en la longitud de onda. Generalmente, se observa una correlación inversa entre la intensidad de luz y el contenido de pigmentos: a menor energía luminosa disponible, se sintetizan más pigmentos fotosintéticos por las células (Tandeau de Marsac, 1983).

En las cianobacterias se produce la regulación de la síntesis de ficobiliproteínas por la calidad espectral de la luz, lo que se denomina adaptación cromática complementaria (Tandeau de Marsac & Houmard, 1988). En este tipo de adaptación, los cambios en la pigmentación celular en respuesta a una iluminación espectral específica provocan modificaciones en la cantidad relativa de los pigmentos rojos (ficoeritrina) y los azules (ficocianina), predominando la ficoeritrina en las células cultivadas con luz verde y la ficocianina en los cultivos expuestos a la luz roja. Al constituir éstas ficobiliproteínas los principales pigmentos captadores de la luz en el proceso fotosintético, el control cromático permite a las células captar la energía luminosa disponible con máxima eficiencia (Tandeau de Marsac, 1983).

Se distinguen tres grupos de adaptación cromática en las cianobacterias (Tandeau de Marsac, 1983; Tandeau de Marsac & Houmard, 1988). El grupo I no presenta adaptación cromática, por lo que la síntesis de ficocianina y ficoeritrina es independiente de la longitud de onda de la luz. El grupo II presenta una adaptación "unidireccional", pues sólo la síntesis de ficoeritrina es regulada por la longitud de onda de la luz. El grupo III presenta una adaptación "bidireccional" o con adaptación cromática complementaria completa. Al adaptar cianobacterias del grupo III a luz verde y transferirlas posteriormente a luz roja, la síntesis de ficoeritrina se reduce o detiene completamente, y lo mismo ocurre en sentido contrario.

Los cambios en la longitud de onda y la intensidad de luz no implican procesos degradativos específicos y la disminución en las concentraciones de bilinas dentro de las células comúnmente se considera como resultado de la dilución producto de la división celular, de acuerdo con estudios de las células en crecimiento exponencial, donde existe una notable estabilidad de las ficobilinas *in vivo* (Gantt, 1981). Los procesos reguladores que intervienen en la adaptación cromática complementaria son controlados por un sistema fotorreceptor de pigmentos, los cuales presumiblemente actúan a nivel transcripcional (Tandeau de Marsac & Houmard, 1988).

Estudios realizados con más de 100 especies de cianobacterias demuestran que el fenómeno de adaptación cromática está presente en la mayoría de las especies, pero no en todas (Bryant *et al.*, 1981; Tandeau de Marsac, 1983; Tandeau de Marsac, 1991) y sólo las cianobacterias capaces de sintetizar ficoeritrina pueden realizar dicha adaptación (Tandeau de Marsac & Houmard, 1988).

Caracterización de las ficobiliproteínas

Las ficobiliproteínas son los pigmentos fotosintéticos antena de mayor importancia presentes en las cianobacterias, las algas rojas y criptofceas. Se aíslan fácilmente como complejos pigmento-proteína, solubles en agua e intensamente fluorescentes (Glazer, 1981) y representan el constituyente bioquímico fundamental de aquellos organismos en los cuales se encuentran; su función primaria *in vivo* es como pigmento-proteína captador de la energía lumínica.

Según sus características espectrales, las ficobiliproteínas se dividen en tres grandes grupos: las ficoeritrinas (FE), que son de color rojo o naranja fluorescente; las ficocianinas (FC) que son azules; y las aloficocianinas (AFC) que son púrpuras; éstas dos últimas tienen fluorescencia roja (Grossman *et al.*, 1993). Las FE predominan en las algas rojas, y las FC en las cianobacterias o algas verde-azules. Las algas criptofceas contienen FC y FE pero no AFC, el componente central del aparato captador de la luz de la mayoría de los organismos que contienen ficobilinas. Se ha sugerido que el papel funcional de las AFC en éstas algas puede ser reemplazado por una FC con un máximo de absorción de 645 nm o tal vez por la clorofila c_2 , presente también en éstas algas (Hill & Rowan, 1989; Rowan, 1989).

Al analizar diferentes grupos de algas se observa que las características espectrales de la FE y FC varían ampliamente. Generalmente, las FE aisladas de las algas rojas presentan tres picos de absorción mayores, mientras que las

aisladas de las cianobacterias y de las criptofíceas tienen uno solo. De igual manera, las FC de las algas rojas y de las criptofíceas tienen dos máximos de absorción entre aproximadamente 550 y 650 nm; mientras que las FC de las cianobacterias tienen un pico de absorción sencillo y amplio que varía entre 615 y 620 nm, dependiendo de la fuerza iónica del medio. Las AFC suelen tener uno o dos máximos de absorción, con el pico mayor alrededor de 650 nm. Estas diferencias se atribuyen a que la composición y conformación de los cromóforos no es siempre la misma en biliproteínas igualmente coloreadas aisladas de grupos taxonómico diferentes (Glazer, 1988; Hall & Rao, 1994).

Estructura y organización de las ficobiliproteínas

Individualmente las ficobiliproteínas tienen una estructura núcleo conocida como apoproteína, con cromóforos unidos a ella. Los tipos de cromóforos adheridos a la apoproteína y la forma en que ambos se enlazan determina el color y las características de absorción de la ficobiliproteína (Gantt, 1981). Existen cuatro tipos de cromóforos en la familia de las ficobiliproteínas, que suelen denominarse como ficobilinas, y dos de los más frecuentemente encontrados en las ficoeritrinas, en las ficocianinas y en las aloficocianinas son los isómeros ficoeritrobilina y ficocianobilina.

El estudio detallado de los cromóforos de las ficobiliproteínas mostró que su estructura es muy similar a los pigmentos biliares de los mamíferos e incluso su nomenclatura sigue un patrón similar (Bryant *et al.*, 1979; Glazer, 1988). Así, el cromóforo de la ficocianina y la aloficocianina es el mismo en ambos pigmentos y se denomina ficocianobilina, mientras que el de la ficoeritrina es diferente y se conoce como ficoeritrobilina (Glazer, 1988). Cuando el cromóforo se encuentra unido a su apoproteína, la absorbancia máxima de la ficocianobilina se halla entre 590 y 670 nm y la de la ficoeritrobilina entre 535 y 567 nm (Bryant *et al.*, 1979). El máximo exacto de absorción de cada cromóforo bilínico está fuertemente influenciado por la conformación y la interacción de los residuos de

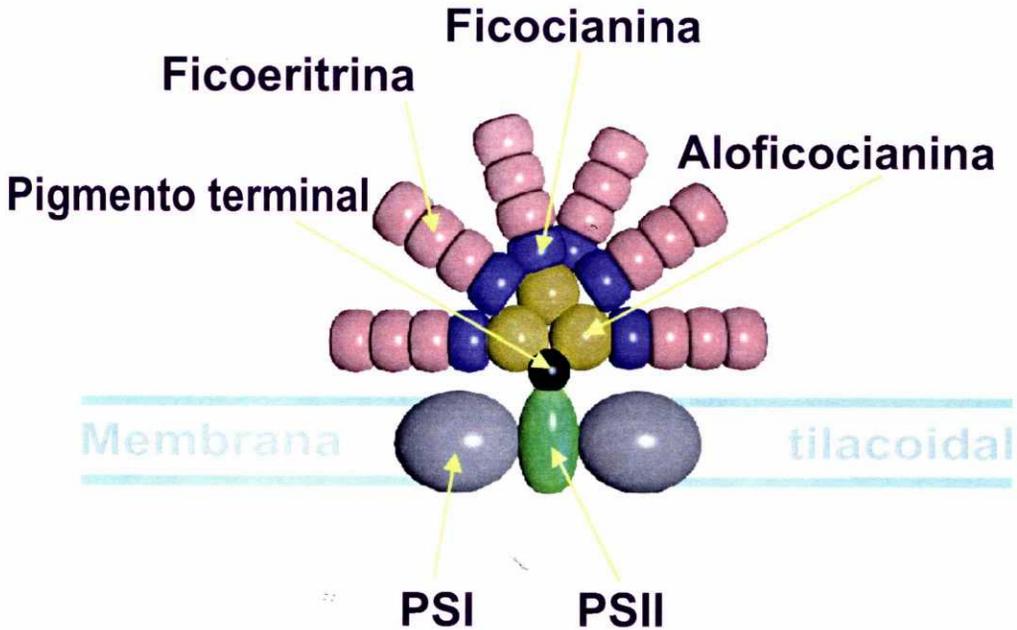


Figura 1.1. Modelo del ficobilisoma con el ordenamiento fundamental de las ficobiliproteínas. Tomado de Gantt (1981).

aminoácidos en las proteínas de la molécula, que a su vez están considerablemente afectados por el estado de agregación de las subunidades proteicas.

Estructuralmente las ficobilinas son tetrapirroles de cadena abierta, y pertenecen a la misma familia química de la clorofila y el grupo hemo. Una o más ficobilinas se unen mediante enlaces covalentes a las cadenas polipeptídicas (cadenas α , β y γ) de diferente tamaño molecular. En la mayoría de los casos el aminoácido enlazante es la cisteína, formándose un puente tioéter entre dicho aminoácido y la parte de la cadena de un anillo A. Así la asociación polipéptidos-ficobilinas forma subunidades que se unen en dímeros, trímeros o hexámeros (Kremer, 1988).

En las cianobacterias y las algas rojas las ficobilinas participan en el proceso de fotosíntesis en forma de grandes agregados multiméricos llamados ficobilisomas, los cuales están dispuestos en varillas espaciadas regularmente

en la superficie protoplasmática de la membrana tilacoidal; el modelo de esta disposición ha sido desarrollado después de extensos estudios bioquímicos, biofísicos y de microscopía electrónica (Figura 1.1) (Bryant *et al.*, 1979; Lundell & Glazer, 1981; Glazer, 1988). El bloque básico de construcción es un monómero que contiene dos subunidades apoproteicas: α y β . La subunidad α contiene un cromóforo por apoproteína mientras que las subunidades β tienen dos (Chapman, 1973). Sus pesos moleculares difieren con el organismo, pero los polipéptidos α son comúnmente más pequeños que los β (Grant, 1981). Estas subunidades conforman un grupo de proteínas relacionadas, cuya secuencia aminoacídica se conoce para algunas cianobacterias (Frank *et al.*, 1978; Cohen-Bazire & Bryant, 1982). Es interesante señalar que la secuencia de aminoácidos en las ficobiliproteínas se mantiene, sobre todo dentro de cada grupo polipeptídico α o β más que entre los grupos, lo cual sugiere una divergencia evolutiva entre los α y β polipéptidos (Gantt, 1981).

Forman parte también del ficobilisoma los llamados péptidos de unión, la mayoría de los cuales son incoloros y cuya función consiste en dirigir el ensamblaje de las biliproteínas y mantener la estructura de los ficobilisomas (Cohen-Bazire & Bryant, 1982).

El modelo propuesto consiste en un núcleo de aloficocianina presente como trimeros de las subunidades $\alpha\beta$. Como la aloficocianina está presente en cantidades trazas en todas las especies (Oi *et al.*, 1982) es posible que este núcleo sea la estructura universal sobre la cual se construyen todos los ficobilisomas. El núcleo está rodeado por varias estructuras compuestas por hexámeros de subunidades de ficocianina y ficoeritrina, y se estabiliza por la presencia de péptidos asociados que sirven también para modular las características de absorción de los pigmentos dentro de los ficobilisomas. La superposición de los espectros de absorción y emisión de las biliproteínas en el ficobilisoma da lugar a un flujo unidireccional de la energía luminosa de pigmento a pigmento en el siguiente orden: ficoeritrina-ficocianina-

aloficocianina-clorofila α , en un proceso cuya eficiencia alcanza un 90% (Ojima *et al.*, 1982; Glazer, 1985; Glazer, 1989).

Además, los ficobilisomas están conectados al PSII a través de partículas situadas en el exterior de la membrana del tilacoide, que se han observado en preparaciones de criofractura (MacColl & Guard-Friar, 1987). Estas partículas se consideran como complejos clorofila α -proteína que enlazan los sitios de los ficobilisomas al PSII (Talarico, 1996).

El espectro de un ficobilisoma intacto es una representación compuesta de sus cromatóforos componentes, las asociaciones individuales y la energía de acoplamiento global. El espectro definitivo de las biliproteínas individuales solo puede obtenerse después del aislamiento *in vivo* de sus estructuras.

Los espectros de absorción y emisión de las biliproteínas individuales dependen de la fuente de la ficobiliproteína, el medio en el cual ésta ha sido aislada y la forma de aislamiento. Las características espectrales de una ficobiliproteína individual dependen del estado de conformación de la apoproteína, por ejemplo, la transición de agregado (hexámero) a trímero o monómero (Glazer & Stryer, 1983). Las bilinas isoméricas unidas a la ficobiliproteína son las responsables de su espectro de absorción. Sus propiedades espectroscópicas distintivas provienen de los diferentes ordenamientos de sus dobles enlaces. Las propiedades de emisión y absorción de las ficobiliproteínas han sido extensamente utilizadas en investigaciones biomédicas y de laboratorio.

Biosíntesis de las ficobilinas

Las bilinas de las plantas se sintetizan a partir de la ruptura del anillo hemo para formar un tetrapirrol lineal, en exacta analogía a la formación de los pigmentos bilínicos en mamíferos. La biosíntesis de las clorofilas tiene lugar

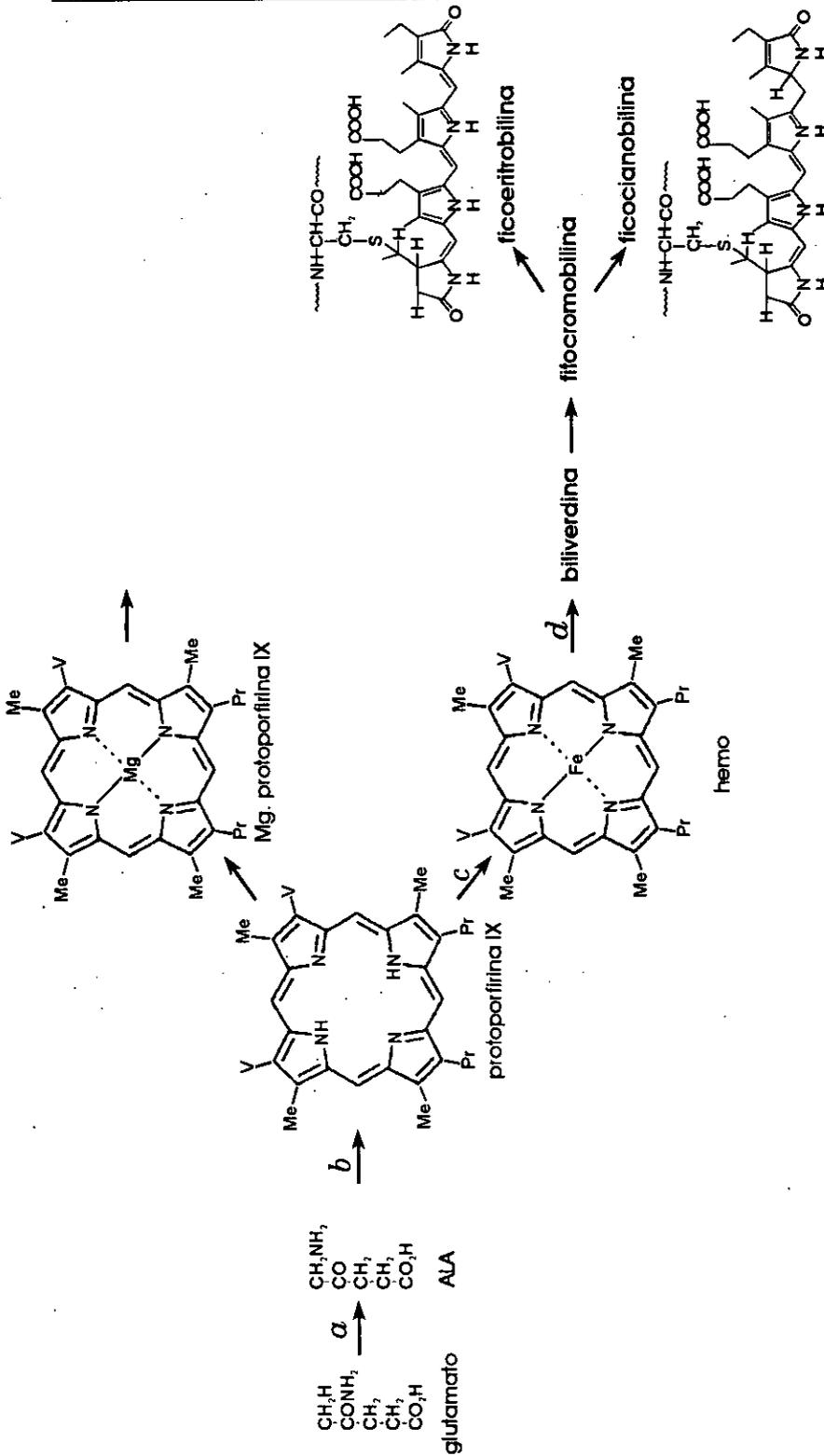


Figura 1.2. Resumen de la vía biosintética para la formación de hemo, bilinas y clorofilas a partir de glutamato. Las enzimas responsables para las etapas biosintéticas señaladas son: (a) aminolevulico-sintetasa; (c) ferroquelatasa; las letras b y d indican una serie de reacciones que se describen en el texto.

por la misma vía que las bilinas hasta un punto determinado en el cual ambas vías biosintéticas divergen. Un resumen de esta ruta se muestra en la figura 1.2.

La biosíntesis de los tetrapirroles se produce en todos los organismos a partir de un aminoácido que no se encuentra en proteínas, el ácido 5-aminolevulínico (ALA); esto se demuestra por la excreción de porfobilinógeno, porfirinas y ficocianobilinas por la rodofita *Cyanidium caldarium* cuando se incuba con ALA. Existe, no obstante, una dicotomía en lo que respecta a la biosíntesis de ALA. En la mayoría de los organismos, ALA es producto de una condensación entre glicina y succinil-CoA, mientras que en las cianobacterias se forma a partir del ácido L-glutámico. Esto último se ha demostrado en experiencias realizadas con *Synechococcus* 6301 mediante el empleo de las técnicas de marcaje isotópico (^{13}C) (Smith & Rogers, 1988).

La ruta biosintética de las ficobiliproteínas continúa con la condensación de dos moléculas de ALA y forman porfobilinógeno, gracias a la actividad de la d-aminolevulínico-deshidrogenasa. La síntesis del anillo porfirínico se realiza por la condensación de cuatro moléculas de porfobilinógeno, para formar un tetrapirrol lineal unido a la enzima. Por cada puente metilo formado se libera un ión amonio. Este tetrapirrol lineal se cicla por la pérdida de otro amonio. El producto ciclado es el uroporfirinógeno III, que tiene una disposición asimétrica de las cadenas laterales. Estas reacciones requieren de una sintetasa y una cosintasa.

La transformación del uroporfirinógeno III en coproporfirinógeno III implica la descarboxilación de los cuatro restos etilo y su conversión en restos metilo; este paso es catalizado por una descarboxilasa. La insaturación del anillo de porfirina y la conversión de dos cadenas laterales de propionato en grupos vinilo, origina la protoporfirina IX, que constituye un intermediario de la síntesis de las clorofilas en un sentido y en el otro, por quelación del hierro, da lugar a la formación del grupo hemo, que representa el grupo prostético de varias proteínas. La enzima ferroquelatasa es la que cataliza la incorporación

del hierro en forma ferrosa. El grupo hemo es el precursor de un compuesto denominado biliverdina, un tetrapirrol lineal, a partir del cual se sintetiza la fitocromobilina, que al reducirse da lugar finalmente a las ficobilinas (Beale & Cornejo, 1991).

Extracción y purificación de las ficobiliproteínas

Las ficobilinas han sido extraídas de las algas y purificadas de diferentes formas, que van desde los ficobilisomas intactos hasta los cromóforos libres de proteínas. Estas formas, por definición, tienen diferentes propiedades de absorción, fluorescencia y estabilidad química por lo que es útil definir los procedimientos de purificación y la naturaleza de los productos bilínicos antes de discutir sus características individuales. El adecuado control de la fuerza iónica y del pH durante el proceso de extracción garantiza la estabilidad de la asociación del polímero y sus propiedades de fluorescencia (Glazer, 1982).

Tradicionalmente el problema de la pureza se ha solucionado por separaciones sucesivas de las ficobiliproteínas de los pigmentos celulares asociados y de otras proteínas celulares. Este proceso se facilita por el hecho de que las ficobiliproteínas son muy solubles en agua. Después de la ruptura celular es posible separar las ficobilinas de las clorofilas y carotenoides por centrifugación del homogenizado a alta velocidad. Del sobrenadante coloreado obtenido un 40% pueden ser ficobilinas, que probablemente están presentes como agregados derivados de la ruptura parcial de la estructura del ficobilisoma. Posteriormente la purificación del sobrenadante por precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico produce ficobilinas casi puras en la forma de subunidades α y β (Rowan, 1989).

Las similitudes químicas entre los diferentes tipos de ficobiliproteínas, hacen relativamente difícil el aislamiento de dichos pigmento-proteínas por los métodos comunes tales como la electroforesis y la cromatografía de intercambio iónico.

Aplicaciones de las ficobiliproteínas

Las propiedades de las ficobiliproteínas hacen de ellas un componente importante de los reactivos fluorescentes específicos para análisis de células y moléculas (Glazer, 1988; Glazer, 1994). Contienen múltiples cromóforos bilínicos y, por tanto, altos coeficientes de absorción (Grabowski & Grantt, 1978) y altos rendimientos de fluorescencia (Funchs *et al.*, 1988). Sus bandas de absorción comienzan a 440 nm y poseen una intensa emisión que comienza desde 550 nm y se extiende hasta el rojo lejano. También son solubles y estables en soluciones acuosas y pueden ser almacenadas largos períodos de tiempo. Además, son estables en amplios intervalos de pH y su fluorescencia no se ve afectada por la mayoría de las biomoléculas (Oi *et al.*, 1982).

Las ficobiliproteínas han sido explotadas inicialmente en los casos donde ciertas sustancias a medir o identificar muestran autofluorescencia en aquella región donde lo hacen los marcadores fluorescentes comúnmente utilizados. Por ejemplo, la aloficocianina se ha empleado para cuantificar los antígenos superficiales en macrófagos alveolares en bajo número de células (Funchs *et al.*, 1988). El empleo de las ficobiliproteínas con un máximo de fluorescencia mayor de 600 nm ha ayudado a resolver el problema de autofluorescencia de los macrófagos cuando se emplea tiocianato de fluoresceína, con un pico de emisión en 541 nm que se prolonga hasta 580 nm. La magnitud de la desviación de Stokes es un determinante importante de la sensibilidad de un reactivo analítico fluorescente. Se ha encontrado que las ficobiliproteínas en particular son especialmente útiles como donadores de energía que pueden usarse para ajustarse a la desviación de Stokes (Funchs *et al.*, 1988).

Las ficoeritrinas también se han empleado como marcadores para análisis cuantitativos, movilización del calcio después de simulación con mitógenos o anticuerpos anti-CD3 (Sei & Arora, 1991). Nuevamente el uso de una ficobiliproteína como marcador ha demostrado tener considerables ventajas sobre otras técnicas usadas para medir el calcio. Los tres tipos de ficobiliproteínas

se han usado ampliamente en citometría de flujo, principalmente en el marcaje de anticuerpos (Jung & Dailey, 1989) en mediciones del tiempo de vida de la fluorescencia en "phase-resolved" (Pinsky *et al.*, 1993), probando su ventaja sobre otros marcadores fluorescentes tradicionales.

Las ficobiliproteínas también se han usado en la determinación del potencial autooxidativo y antioxidativo de los azúcares simples (Wehmeier & Mooradian, 1994). Estos ejemplos muestran su amplio espectro de su uso como reactivos biomédicos de diagnóstico. Sus propiedades de fluorescencia les confieren ventajas adicionales que están siendo constantemente aplicadas.

Actualmente, las ficobiliproteínas están siendo utilizadas como colorantes naturales en la industria alimentaria y de cosméticos. La ficocianina de *Spirulina* es comercializada por la compañía Dainippon Ink & Chemicals de Japón; se sugiere como aditivo en preparados congelados, bebidas ligeras, productos con leche, caramelos y helados. Esta compañía ha descrito el tampón para la extracción del pigmento de *Spirulina* y su tratamiento con un solvente orgánico; el pigmento azul así obtenido se utiliza en cosméticos, pues como no es soluble en agua no se extiende por efecto de la humedad (Cohen, 1986; Borowitzka, 1988; Richmond, 1990).

La ficocianina pura es comercializada por Cyanotech Corporation con altos precios para su utilización en pequeñas cantidades como trazador bioquímico en inmunoensayos, microscopía y citometría (Herrera *et al.*, 1989).

Por otra parte, utilizando ficocianina extraída de *Spirulina* como dieta en ratones previamente inoculados con células tumorales de hígado, se demuestra que la ficocianina puede estimular de forma generalizada el sistema inmunitario, proporcionando protección frente a distintas enfermedades (Iijima *et al.*, 1982). Estos resultados dieron lugar a dos patentes respecto al uso de ficobilinas como agentes antitumorales, así como para el tratamiento de úlceras y hemorroides (Patente n° 79-138755, 1981; Patente n° JP58065216-A-830418, 1983).

Experimentos *in vitro* mostraron que los extractos celulares de las cianobacterias *Lyngbya lagerhermii* y *Phormidium tenue* protegían a las células del sistema linfático humano de los efectos citopáticos del virus HIV-1, aislando un nuevo tipo de compuesto inhibitorio (Gustafson *et al.*, 1989).

La inducción de la metamorfosis en moluscos por ficobiliproteínas extraídas de cianobacterias y algas rojas (Mianmanus, 1984; Morse *et al.*, 1984) es otra de las importantes aplicaciones de estos complejos pigmento-proteína; al igual que el uso de dietas ricas en ficocianina, para potenciar el color de las ostras perlíferas (Mianmanus, 1984).

Los pigmentos fotosintéticos de las cianobacterias tienen aplicación práctica en los estudios ecológicos por el papel que juegan estos elementos del picoplancton en la alimentación del zooplancton herbívoro, a través de la identificación de pigmentos específicos de las cianobacterias en el contenido estomacal de sus depredadores mediante HPLC (Sellner *et al.*, 1994).

Para la determinación de la concentración de cianobacterias en el agua, después de sus florecimientos, se emplean también métodos basados en sus características de fluorescencia *in vivo* pues sus espectros de emisión son diferentes a los de las algas eucarióticas (Lee *et al.*, 1994).

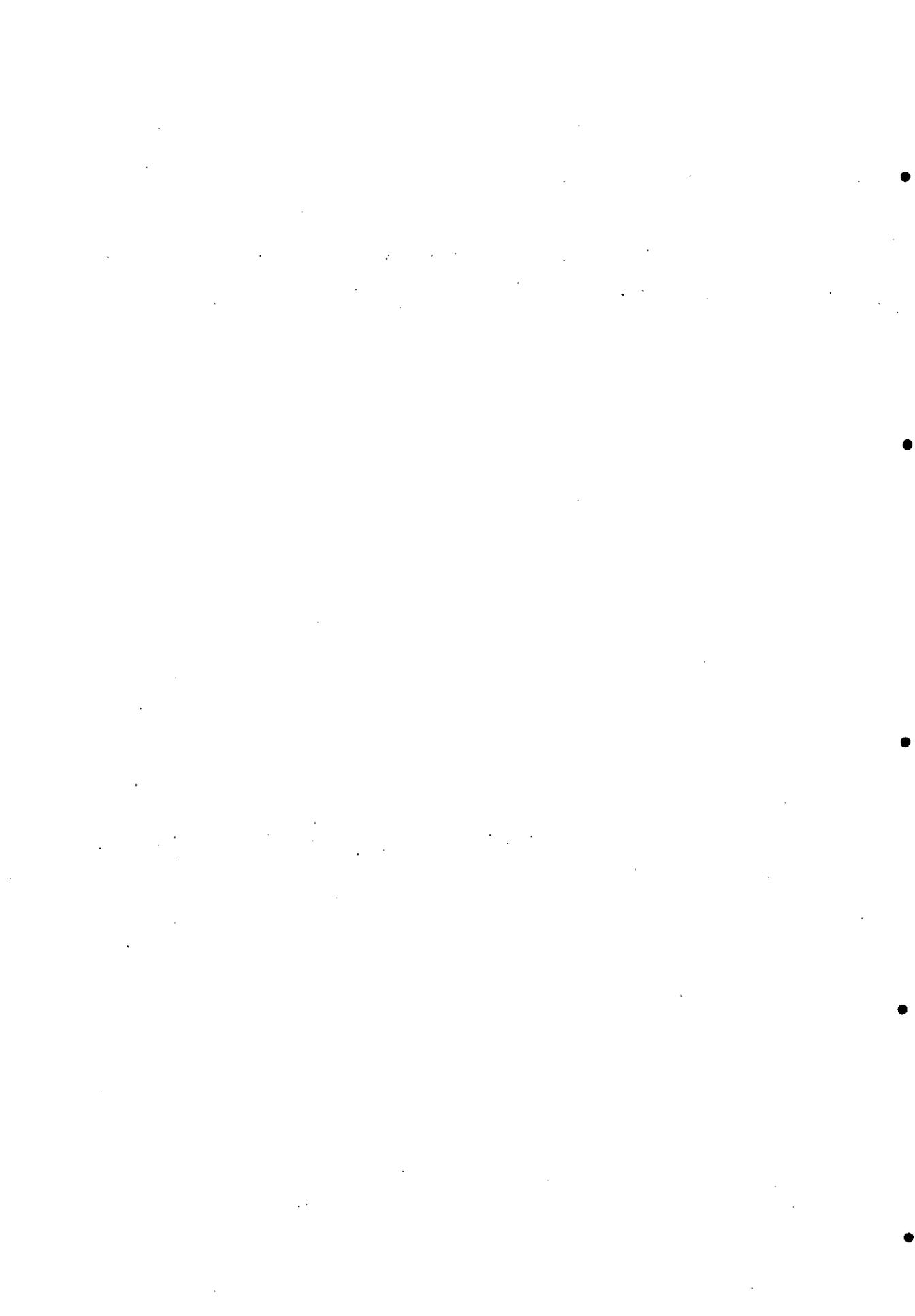
Las especies de *Synechococcus* se han empleado en la obtención de compuestos reguladores del crecimiento vegetal para la germinación de semillas naturales (Wake *et al.*, 1992), la producción de glutamato a partir de CO₂ en reactores biosolares con fibras ópticas de difusión de la luz (Matsunaga *et al.*, 1991), la fotoproducción de hidrógeno a partir de sustratos orgánicos (Luo & Mitsui, 1994; Kumazawa & Mitsui, 1994), la obtención de compuestos inhibidores de glicosidasas (Cannell *et al.*, 1987) y proteasas (Cannell *et al.*, 1988) de aplicación biomédica; y sus pigmentos se han empleado como colorantes fluorescentes en estudios citométricos (Marie *et al.*, 1996). Además tienen interés en biotecnología marina para el aislamiento y caracterización de enzimas (Murata & Higashi, 1993; Wadano *et al.*, 1995) y en la ingeniería

genética (Yu *et al.*, 1993; Nakamoto, 1995; Wood *et al.*, 1995). Sin embargo, dado que la mayor importancia de estas especies radica en su valor como biomasa fototrófica, el principal interés de las investigaciones se ha dirigido a sus pigmentos fotosintéticos, tanto desde el punto de vista estructural como funcional.

Hasta el presente se han estudiado en varias especies de *Synechococcus* los tipos de ficobiliproteínas (Wood *et al.*, 1985), su estructura química (Lagarias *et al.*, 1987; Glazer & Fang, 1973), la concentración del pigmento (Wyman, 1992), su purificación (Chapman *et al.*, 1968; Teale & Dale, 1970), sus propiedades fotosintéticas (Kana & Glibert, 1987) y la composición celular (Kana *et al.*, 1988).

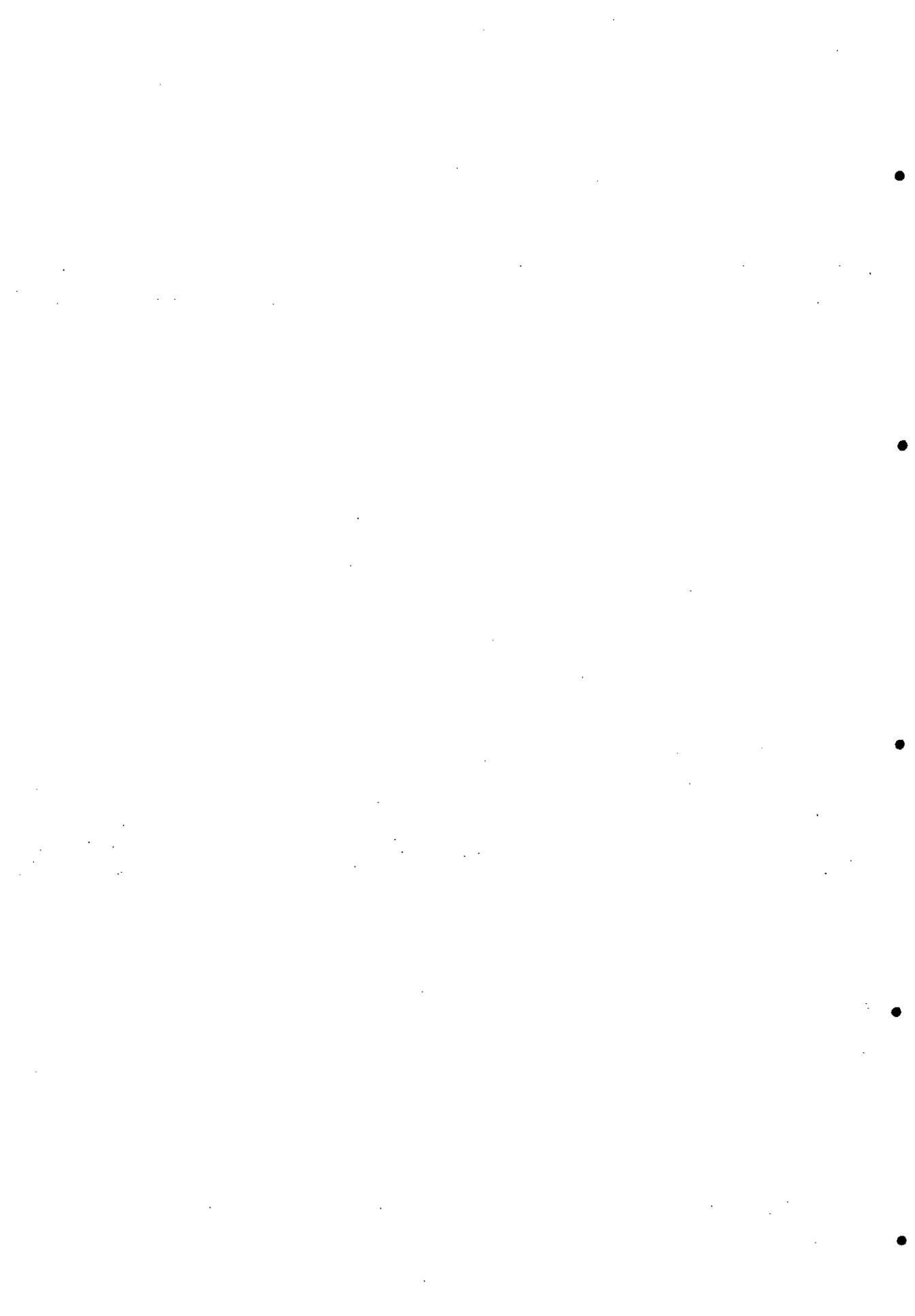
No obstante, es necesario profundizar en técnicas y condiciones de cultivo, así como en metodologías para la purificación, aislamiento y caracterización de las ficobiliproteínas de estas especies, cuya importancia ya se ha señalado.

2.- Objetivo

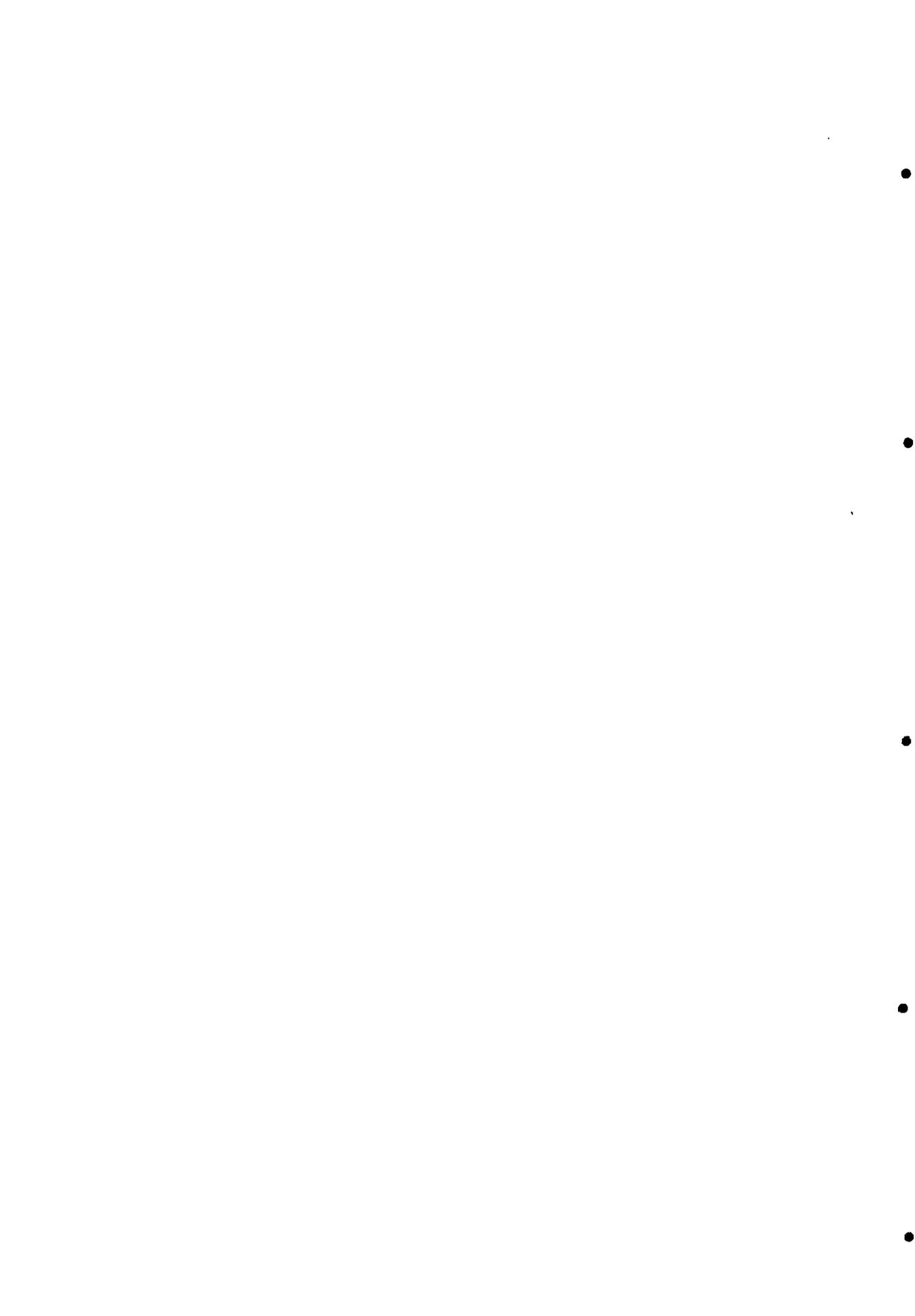


Debido al posible interés de la cianobacteria marina *Synechococcus* sp. IO9201, aislada en las costas de Cuba, para la obtención de ficocianina, se intenta optimizar la producción de biomasa rica en este pigmento, en función de distintas variables como: concentración de nitrógeno en el medio de cultivo, relación nitrógeno:fósforo y calidad espectral de la luz.

Una vez conocidos los parámetros óptimos para la producción de ficocianina, el objetivo último del trabajo es aislar, purificar y caracterizar la ficocianina producida por *Synechococcus* sp. IO9201.



3.- Material y métodos



3.1.- ORIGEN Y DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE UTILIZADA, *Synechococcus* sp. IO9201

La especie utilizada fue aislada de aguas marinas cubanas recogidas en la costa Norte de La Habana y clasificada dentro del género *Synechococcus*, siendo incluida en el cepario de la colección del Instituto de Oceanología de Cuba, con la identificación IO9201. Posteriormente fue trasladada al Laboratorio de Microbiología del Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidad de La Coruña.

El género *Synechococcus* se incluye en el grupo de las cianobacterias en el Orden *Chroococcales* (Waterbury & Rippka, 1989).

Se presenta como células solitarias o en colonias en forma de cadena que dan lugar a pseudofilamentos cortos, generalmente de 2 a 8 células. Las células son esféricas ($2.37 \pm 0.46 \mu\text{m}$ de diámetro), cilíndricas u ovals ($2.34 \pm 0.43 \mu\text{m}$ de largo y $1.72 \pm 0.41 \mu\text{m}$ de ancho) con un contenido celular homogéneo de color verde-azul brillante y no presentan vaina mucilaginosa. Se dividen en un plano más o menos vertical o ligeramente oblicuo al eje longitudinal de la célula, originándose dos células hijas morfológicamente idénticas.

La organización de la pared celular es típica de las bacterias Gram negativas. Los tilacoides forman una serie de capas alrededor de la superficie de la periferia de la célula y su número varía con las condiciones de cultivo, y sobre todo con el nivel de iluminación. Los tilacoides contienen clorofila a, carotenoides y zeaxantina. Unidos a los tilacoides se encuentran los ficobilisomas y que presentan ficocianina, ficoeritrina y aloficocianina.

Existen cuerpos poliédricos próximos a los tilacoides y generalmente visibles e inclusiones lipídicas, esféricas y electrónicamente densas en una posición periférica en la célula, ocupando una parte importante del citoplasma.

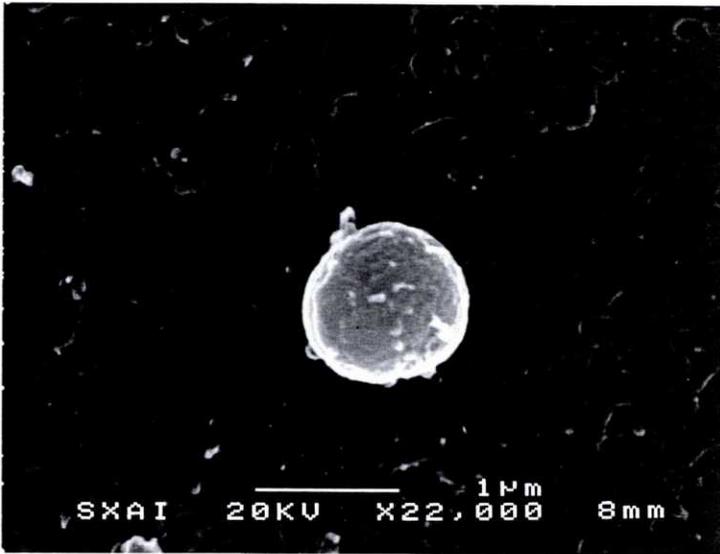


Foto 1. Microfotografía de *Synechococcus* sp. IO9201 con microscopio electrónico de barrido (20 KV 22.000x)

En el citoplasma hay asimismo gránulos de polifosfato. Son generalmente pequeños y no numerosos en células durante la fase logarítmica de crecimiento, pero en otras etapas del crecimiento se destacan por su cantidad (Jensen, 1993). En condiciones de estrés pueden llegar a ocupar una gran parte del volumen celular. Son cuerpos esféricos y su composición es básicamente fosfato, aunque también contienen magnesio, potasio, calcio, hierro, cobre, lípidos y RNA (Jensen, 1993); actúan, no sólo como reserva de fósforo, sino también como fuente de energía para la célula. Pueden constituir reserva de metales esenciales, actuando como mecanismo de detoxificación.

Dentro del género *Synechococcus* se ha propuesto una subdivisión fenotípica (Waterbury & Rippka, 1989) que establece cuatro grupos basados en características morfológicas, fisiológicas y químicas (Waterbury, 1992). Las características generales de nuestra cepa la colocan dentro del "Grupo Marino C", que comprende especies halotolerantes no móviles de hábitat marino costero, cuyo pigmento

accesorio fundamental es la ficocianina por lo que no llevan a cabo adaptación cromática complementaria y además no son capaces de fijar nitrógeno atmosférico.

3.2.- CULTIVO DE *Synechococcus* sp. IO9201

Diversos estudios han identificado los requerimientos nutritivos específicos de algunas microalgas y cianobacterias, particularmente en minerales y vitaminas. Consecuentemente, se han desarrollado numerosos medios de cultivo, descritos en la bibliografía especializada (Vonshak, 1986; Becker, 1994), cuya composición cualitativa suele ser similar. La relación N/P varía entre 5/1 y 20/1 en peso. La mayoría de los medios descritos se preparan en soluciones "stock" concentradas de los nutrientes químicos y después se añaden al agua volúmenes determinados para dar la concentración adecuada en el medio de cultivo.

La composición del medio de cultivo utilizado en los cultivos "stock" es la siguiente (Fábregas *et al.*, 1984):

NaNO ₃	4.0 mM
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.2 mM
Citrato férrico	40.0 µM
ZnCl ₂	2.0 µM
MnCl ₂ ·4H ₂ O	2.0 µM
Na ₂ MoO ₄ ·5H ₂ O	2.0 µM
CoCl ₃	0.2 µM
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.2 µM
Tiamina	70.0 µg.l ⁻¹
Biotina	10.0 µg.l ⁻¹
Vitamina B ₁₂	6.0 µg.l ⁻¹
EDTA	92.8 µM
Tris - HCl (pH 7.4)	1.0 mM
agua de mar (*)	1000 ml

(*) agua de mar natural filtrada por 0.45 µm y esterilizada a 120 °C, 20 min.

Los nutrientes se esterilizan en autoclave a 120 °C durante 20 minutos, se almacenan en oscuridad a 4 °C y se añaden al agua de mar antes de inocularla.

Las condiciones de temperatura, iluminación y salinidad, junto con la concentración de nutrientes, son factores fundamentales en la eficiencia del cultivo. Tras pruebas preliminares, se han adoptado una temperatura de 18 ± 1 °C y una iluminación de 3000 lux ($58.5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) medida a la altura del recipiente, proporcionada por tubos fluorescentes Mazda Fluor C7 TF40, aplicada con ritmo nictimeral 12:12 en una cámara de cultivo.

Los cultivos se realizan en botellas de 1 litro con 900 ml de medio de cultivo. Estos cultivos se doblan periódicamente, de manera que se mantengan en fase exponencial. De estos cultivos se toman los inóculos para las distintas experiencias.

La agitación en los cultivos se realiza mediante burbujeo de aire a un flujo de 2 l min^{-1} , inyectado con un turbosoplador y filtrado a $0.25 \mu\text{m}$ mediante filtros Millipore antes de la entrada en el cultivo. Esta agitación constante impide que las células sedimenten y permite que estén expuestas a la misma intensidad lumínica media, evitando asimismo la formación de gradientes de nutrientes minerales o gaseosos, obteniéndose un crecimiento más uniforme (Raven, 1988)). La aireación proporciona además un aporte de CO_2 (0.03% V:V en el aire) el cual actúa como fuente de carbono y colabora en el tamponamiento del medio de cultivo.

3.3.- DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD CELULAR

El crecimiento de las microalgas se determina midiendo la densidad celular diariamente por conteo de una alícuota del cultivo convenientemente diluida en cámara de Neubauer, empleando para ello un microscopio NIKON Labophot de contraste de fases, a 400 aumentos. El número de células de cada cultivo corresponde a la media de tres conteos. Con los datos de densidad celular se calcula la tasa de crecimiento (μ), expresada en doblajes por día.

En términos generales, el crecimiento de una población microalgal en condiciones estáticas se caracteriza por ajustarse a una función logística o sigmoide (Schanz & Zahler, 1981). La función logística se utiliza en ecología como modelo del crecimiento de una población. Se caracteriza por un crecimiento exponencial, con un crecimiento próximo a cero cuando la población se aproxima a su máximo, lo que se conoce como capacidad de carga del medio (Odum, 1971).

La representación matemática de esta función es:

$$N_t = K / (1 + B \exp(-zt))$$

donde N_t representa la densidad de población en el tiempo t , expresada en células $\times 10^6 \text{ ml}^{-1}$, K es la capacidad de carga del medio o tamaño límite de la población, B es una constante que carece de significado biológico y cuyo valor se calcula a partir de la siguiente ecuación: $B = (K - N_0) / N_0$. El parámetro z está relacionado con la tasa de crecimiento y t es el tiempo expresado en días. Todos los parámetros de la ecuación se calculan mediante una regresión no lineal, utilizando el algoritmo de Marquadt (Saila *et al.*, 1988).

3.4.- DETERMINACIÓN DE PESO SECO Y CENIZAS

Para la determinación del peso seco se sigue el protocolo de Vonshak (1986) modificado. Se recogen volúmenes conocidos de las suspensiones celulares en tubos previamente secados a 60°C durante 6 horas y tarados. Las células se recogen por centrifugación a 2500 g y a 4°C durante 20 minutos; posteriormente el sedimento celular se resuspende en amonio formiato 0.9% (P/V) para eliminar las sales, centrifugando de nuevo. Las muestras se secan a 60°C durante 24 horas y se dejan enfriar a temperatura ambiente en un desecador antes de la pesada.

Para la determinación de las cenizas, en la biomasa liofilizada de *Synechococcus* sp. IO9201, se coloca una cantidad conocida de biomasa seca en pocillos de porcelana previamente tarados, sometándose a incineración en horno Mufla a

550 °C durante 5 horas. Posteriormente se deja enfriar el horno hasta 100 °C, se retiran los pocillos y se dejan enfriar hasta temperatura ambiente en un desecador, procediendo a su pesada. Este procedimiento permite determinar el porcentaje de cenizas en la materia seca.

Todas las determinaciones de peso se realizan por duplicado, utilizando balanzas Bosh y AND con límite de precisión de ± 0.1 mg.

3.5.- DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE LOS PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS

3.5.1.- Extracción y cuantificación de ficobiliproteínas

Debido a que las ficobiliproteínas se producen intracelularmente, es necesario realizar una operación de extracción con una fase acuosa y un tratamiento de ruptura mecánica o enzimática de la pared celular, para su obtención. Por ello, partiendo de un número conocido de células, recogidas por centrifugación, se resuspenden en 4 ml de agua destilada y se ensayan tres métodos de extracción:

- Sonicación prolongada a 4 °C.

Las células resuspendidas en agua destilada se sonicán durante 5 minutos, en un Soniprep 150 a 15 micrones. Posteriormente se centrifugan y el sobrenadante se cuantifica espectrofotométricamente.

- Congelación y descongelación en nitrógeno líquido.

Las células resuspendidas en agua destilada se someten a una atmósfera de nitrógeno líquido, congelando y descongelando sucesivamente durante tres veces. Posteriormente se centrifugan y el sobrenadante se mide espectrofotométricamente.

- Congelación y descongelación reiterada a 4 °C.

Las células resuspendidas en agua destilada se congelan y descongelen sucesivamente durante tres veces a 4 °C, se centrifugan posteriormente y el sobrenadante semide espectrofotométricamente.

Con este último método se ensayan diferentes soluciones de extracción, además del agua destilada. Las distintas soluciones de extracción ensayadas son: tampón fosfato 10 mM, pH 7, cloruro de sodio 0.15 M, tampón TRIS-HCl 0.05 M, pH 7, cloruro de calcio 10 g l⁻¹ y una fase alcalina compuesta por 0.5 g l⁻¹ NaHCO₃ y de CaCO₃ a pH 10.5. Cada una de estas soluciones contiene 0.05% de azida sódica para evitar cualquier posible contaminación.

Los sobrenadantes, obtenidos por centrifugación a 2500 g durante 20 minutos en cada una de las extracciones se leen en un espectrofotómetro Shimadzu UV - 160A a las longitudes de onda 652, 615 y 562 nm, utilizando como blanco la solución de extracción.

La concentración de biliproteínas se calcula utilizando las ecuaciones basadas en los coeficientes de extinción específicos para pigmentos en cianobacterias, propuestas por Siegelman & Kycia (1978):

$$FC \text{ (mg ml}^{-1}\text{)} = (A_{615} - 0.474 (A_{652})) / 5.34$$

$$AFC \text{ (mg ml}^{-1}\text{)} = (A_{652} - 0.208 (A_{615})) / 5.09$$

$$FE \text{ (mg ml}^{-1}\text{)} = (A_{562} - 2.41 (PC) - 0.849 (APC)) / 9.62$$

donde A_{652} , A_{615} y A_{562} representan las absorbancias ($DO = \log I_0/I$) medidas a 652, 615 y 562 nm. Si los valores se multiplican por el volumen de extracto y se dividen por el número total de células presentes en dicho volumen, se obtiene el contenido de ficobiliproteínas en pg célula⁻¹.

La eficiencia en la extracción de la ficocianina y su pureza, medida como la relación A_{620}/A_{280} , se determinan por triplicado en cada una de las condiciones ensayadas.

3.5.2.- Clorofila *a* y carotenoides totales

Para la determinación de la clorofila *a* y los carotenoides totales se recoge un volumen conocido de cultivo microalgal y se centrifuga a 2500 g durante 20 minutos. Se resuspende en 5 ml de agua destilada y se centrifuga nuevamente. Se desecha el sobrenadante y al precipitado se le añade 10 ml de metanol al 90%, agitándose bien y centrifugando posteriormente. En el caso de biomasa liofilizada, se pesan 20 mg y se realiza la extracción con 10 ml de metanol, agitándose y centrifugando a continuación. El sobrenadante obtenido en ambos casos se lee a 665 y 470 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV- 160A.

Las ecuaciones utilizadas en los cálculos de las concentraciones de pigmentos son (Sukeni *et al.*, 1989):

$$\begin{aligned}\text{Clorofila } a \text{ (}\mu\text{g ml}^{-1}\text{)} &= (13.15 \times A_{665} \times 10) / V \\ \text{Carotenoides totales (}\mu\text{g ml}^{-1}\text{)} &= (4.4 \times A_{470} \times 10) / V\end{aligned}$$

donde tanto la clorofila *a* como los carotenoides totales representan las concentraciones en $\mu\text{g ml}^{-1}$ de extracto, A_{665} y A_{470} representan las absorbancias ($DO = \log I_0/I$) medidas a 665 y 470 nm y V es el volumen de muestra recogido. Si los valores se multiplican por el volumen de extracto y se dividen por el número total de células presentes en dicho volumen, se obtiene la concentración de estos pigmentos en pg célula^{-1} .

3.6.- DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNAS

Las proteínas se determinan espectrofotométricamente mediante una modificación del método de Lowry (Herbert *et al.*, 1971). El método se basa en que el reactivo de fenol de Folin y Ciocalteu, que es esencialmente una solución de ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico, es reducido por los fenoles (y por muchas otras sustancias) a azul de molibdeno, que puede ser determinado colorimétricamente.

Las proteínas reducen el reactivo de fenol, por lo que este método se puede utilizar para su determinación.

Un número conocido de células recogidas por centrifugación se solubiliza en 2 ml de NaOH 1N a una temperatura de 95-100°C durante 60 min. Se enfría y se clarifica por centrifugación (2500g) utilizándose el sobrenadante. Se prepara una curva patrón con diferentes concentraciones de seroalbúmina bovina (BSA) y un blanco de NaOH 1N. Para realizar las determinaciones se utilizan los siguientes reactivos:

Reactivo A: 100g de Na_2CO_3 disueltos en 1000 ml de NaOH 0.5N.

Reactivo B: 1g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de agua destilada.

Reactivo C: 2 g de tartrato de potasio disueltos en 100 ml de agua destilada.

Reactivo D: reactivo comercial de fenol Folin-Ciocalteu (Panreac).

Se toma 0.1 ml de cada una de las muestras, de las concentraciones de BSA y del blanco y se le añade 0.3 ml de NaOH. A continuación se les añade 15 ml del reactivo A, 0.75 ml del reactivo B y 0.75 ml del reactivo C a todos los tubos. Las muestras se dejan reaccionar durante 15 minutos antes de añadirle 1.2 ml del reactivo D diluido 10 veces con agua destilada.

Se dejan reposar a temperatura ambiente durante 30 min. antes de leer la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV - 160A, utilizando una cubeta de vidrio de 1 cm, frente al blanco tratado con los mismos reactivos. Con los resultados de absorbancia obtenidos con las diluciones de BSA se realiza una curva patrón, obteniéndose así una recta de regresión lineal a partir de la cual se calculan por interpolación los valores de proteína de las muestras problema. Todas las determinaciones se realizan por triplicado.

3.7.- ANÁLISIS ELEMENTAL (CNH)

Los análisis de la composición elemental (Carbono, Hidrógeno y Nitrógeno, CNH) se realizaron por cuadruplicado sobre alícuotas de biomasa liofilizada de *Synechococcus* sp. IO9201. Se pesan entre 1 y 2 mg de muestra en una cápsula especial de estaño. Los análisis son realizados por los Servicios Generales de Apoyo a la Investigación en un autoanalizador Carlo Erba CHNS-O 1108, acoplado a un detector de conductividad térmica (DCT), un introductor de muestras automático Autosampler AS 200 y con una unidad de procesado EAGER 200.

El método analítico se basa en la oxidación instantánea y completa de la muestra que convierte todas las sustancias orgánicas e inorgánicas en productos de combustión. Los gases resultantes de la combustión pasan a través de un horno de reducción y son barridos al interior de la columna cromatográfica (Porapak PQS) por el gas transportador, en este caso helio, donde son separados para su detección por un detector de conductividad térmica que emite una señal proporcional a la concentración de los componentes individuales de la muestra.

El instrumento se calibra con sulfanilamida, estándar aconsejado para muestras con elevado contenido orgánico, y la concentración de las muestras se calcula mediante un logaritmo de regresión lineal en base al área bajo los picos generados por el detector. Para la realización de estos cálculos el autoanalizador está equipado con un ordenador. No se aceptaron resultados en los que las réplicas presentasen un coeficiente de variación mayor del 5%, aunque generalmente el error asociado a la técnica se encontró en el intervalo de 0.5-2%.

3.7.1.- Contenido de proteínas derivado del contenido de nitrógeno

Para el cálculo del contenido de proteína de la biomasa liofilizada a partir del contenido de N obtenido por análisis elemental (CNH) se utilizó el nuevo factor de conversión 5.8 (Gnaiger & Bitterlich, 1984) en vez del clásico factor de conversión

6.25 (FAO/WHO, 1973) ya que se ha demostrado que el primero es más ajustado para diversas muestras de origen marino incluyendo algas, bacterias, protozoos e invertebrados (Gnaiger & Bitterlich, 1984).

3.8.- DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS

Todos los métodos propuestos para la determinación de carbohidratos totales son colorimétricos y se derivan del Test de Molisch para carbohidratos; implican el calentamiento del material con ácido sulfúrico concentrado y un desarrollante de color que es usualmente una amina aromática o un fenol (Herbert *et al.*, 1971).

El método del fenol sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) continúa siendo el más utilizado y apenas ha sido modificado. Es muy insensible a la interferencia con proteínas y el color producido es muy estable. El fenol es un alcohol muy reactivo con los carbohidratos dando lugar a un complejo coloreado (de amarillo a marrón según la concentración de carbohidratos). Esta reacción coloreada es lineal a la longitud de onda 485 nm y consume una elevada cantidad de energía, la cual es proporcionada por la reacción entre el ácido sulfúrico y el agua.

Un número conocido de células recogidas por centrifugación se hidrolizan en 2 ml de NaOH 1N a una temperatura de 95-100 °C durante 60 min. Las muestras se enfrían y el extracto obtenido por centrifugación se diluye convenientemente y se reparte 1 ml (por triplicado) en tubos de cristal reforzado. Al mismo tiempo se prepara un blanco con 1 ml de NaOH 1N y una serie de patrones de glucosa. A los tubos se les añade 0.5 ml de fenol al 4%, agitándose a continuación. Inmediatamente se adicionan 2.5 ml de ácido sulfúrico concentrado ($P_e = 1.84$), dirigiendo la caída del ácido hacia la superficie del líquido. Se deja enfriar 30 minutos a temperatura ambiente, agitando las muestras dentro de este intervalo y se lee la absorbancia a 485 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A.

Con los valores de los patrones de glucosa se calcula la ecuación correspondiente a la recta de regresión lineal, de donde por interpolación se deducen los valores de las muestras problemas.

Mediante este ensayo se cuantifican las hexosas, disacáridos, oligosacáridos, polisacáridos y derivados metilados que posean un grupo reductor libre o potencialmente libre. Las pentosas y metilpentosas también reaccionan, pero la glucosamina y la galactosamina son inertes (Kochert, 1978).

3.9.- DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE LÍPIDOS

Para su posterior determinación, los lípidos se extraen por el procedimiento de Bligh & Dyer (1959), según Holland & Gabbott (1971). Las células se recogen por centrifugación y se resuspenden en metanol:cloroformo 2:1 V/V. Se sonica durante 60 segundos y tras agitar 30 segundos se protegen los extractos de la luz dejándolos reposar 20 minutos a temperatura ambiente. Tras este tiempo, se centrifugan 5 min a 800g, recogiendo el sobrenadante. A éste se adicionan cloroformo y agua destilada para una relación final de solventes metanol:cloroformo:agua 2:2:1 V/V, se agita hasta obtener una solución homogénea y se centrifuga nuevamente. Con este segundo fraccionamiento se eliminan los contaminantes no lipídicos no eliminados en la primera extracción. Se retira la fase acuosa superior y a la fase orgánica inferior se le añade acetona para ayudar a eliminar las trazas de agua. Los solventes se retiran de las muestras de lípidos por evaporación a 40-50 °C bajo vacío o en atmósfera de N₂.

Los extractos se almacenan a -20 °C en 300 µl de cloroformo conteniendo butilhidroxitolueno (BHT) como antioxidante, en el caso de no ser analizados inmediatamente.

La determinación de lípidos totales se realiza siguiendo el método de estimación gravimétrica. Para esto se utilizan pequeños viales de cristal previamente secados a 60°C durante 6 horas y tarados, dejándose enfriar a temperatura ambiente

en un desecador antes de cada pesada. Las muestras resuspendidas en 300 μ l de cloroformo, se secan a 45 °C y finalmente se pesan de nuevo dichos viales en una balanza de ± 0.1 mg.

Partiendo de 20 mg de biomasa liofilizada de *Synechococcus* sp. IO9201 se realizó la extracción de los lípidos totales, con las mismas proporciones descritas anteriormente, pero utilizando en este caso el solvente ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$) acidificado con unas gotas de HCl (Dubinsky & Aaronson, 1979). Estos extractos lipídicos se fraccionaron en lípidos neutros y polares sobre cartuchos Sep-Pak (Waters, ref. 51900) (Sukenik *et al.*, 1989). Los cartuchos se acoplan a una jeringuilla de cristal con extremo Luer y se equilibran con 10 ml de cloroformo; después de cargar la muestra previamente resuspendida en 300 μ l de cloroformo, se lavan sucesivamente con cloroformo, cloroformo/metanol (85:15 V/V) y metanol (20 ml en cada caso) para eluir los lípidos neutros, galactolípidos y fosfolípidos, respectivamente. Para cuantificar cada una de las fracciones se utilizó también el método de estimación gravimétrica. Todas las determinaciones se realizan por triplicado.

3.10.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el tratamiento estadístico de los datos analíticos se emplea el “software” estadístico SPSS/PC+ versión 5.0 (SPSS Inc).

Los datos de las diferentes experiencias, se comparan mediante un análisis de la varianza de una vía (ANOVA). Cuando se observan diferencias significativas, se analizan estos datos mediante el test de rango múltiple de Duncan, siempre para un nivel de significación de 0.05.

3.11.- PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO DE FICOBILIPROTEÍNAS

3.11.1.- Cromatografía de interacción hidrofóbica

La cromatografía de interacción hidrofóbica (CIH) es una técnica de purificación que se basa en la interacción entre los grupos no polares de la superficie de las biomoléculas accesibles a un determinado solvente y los ligandos hidrofóbicos covalentes fijos a una matriz gelatinosa. Esta interacción se debe a las fuerzas de atracción de Van der Waals entre las proteínas y los ligandos inmovilizados (Marshak *et al.*, 1996).

Las proteínas tienen diferentes tipos y proporciones de aminoácidos hidrofóbicos y por tanto se enlazan con diferente fuerza a los medios de la CIH. Para separar una mezcla de proteínas es necesario hallar la concentración de sal que produce que los grupos más hidrofóbicos se enlacen al medio, mientras que otras proteínas menos hidrofóbicas se mantienen en solución. Alternativamente se puede utilizar una alta concentración de sal para asegurar que todas las proteínas se enlacen; la concentración salina puede disminuirse progresivamente para desplazar las proteínas menos hidrofóbicas mientras que las otras permanecen enlazadas al medio de interacción hidrofóbica.

Resinas de interacción hidrofóbica

Se realizaron pruebas de recuperación de la biliproteína utilizando tres resinas que son eluidas con diferentes soluciones. Se emplearon los tres grupos hidrofóbicos comúnmente utilizados: butil sefarosa (Butyl Sepharose 4-Fast Flow), octil sefarosa (Octyl Sepharose CL-4B) y fenil sefarosa (Phenyl Sepharose 6 Fast Flow) (Pharmacia).

Se colocan en tres tubos de ensayo 0.5 ml de cada tipo de resina y se equilibran con tampón TRIS-HCl 0.05M, pH 7 con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 M. Se les añade a cada una de las resinas 2 ml de extracto de ficocianina con sulfato de amonio 0.5M. Se agitan suavemente los tubos durante 10 minutos y posteriormente se centrifugan. Se utilizaron como soluciones de elución concentraciones decrecientes de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

(0.5, 0.25, 0.125 M) y sin sulfato de amonio (0M) con tampón TRIS-HCl 0.05M, pH 7 y finalmente una solución de etanol al 20% con este último tampón. Cada una de las resinas se lava sucesivamente con diferentes soluciones y después de centrifugar se mide el sobrenadante en un espectrofotómetro (PERKIN-ELMER Lambda 5) a 620 nm.

Una vez seleccionada la resina, la purificación del pigmento se realiza en una columna cromatográfica (Pharmacia XK 26) (2 x 2.6 cm) conectada con una bomba de HPLC (Pump Sistem 325 Kontron Instruments) y empacada con 10 ml de la resina seleccionada. Se utiliza un detector UV/VIS (Severn Analytical SA 6500) a una longitud de onda de 620 nm para obtener los cromatogramas.

Se obtiene el espectro de absorción en el intervalo de 250-700 nm, de las fracciones de ficocianina eluidas después de cada cromatografía utilizando un espectrofotómetro PERKIN-ELMER Lambda 5.

3.11.2.- Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía de intercambio iónico es un método de purificación donde la separación depende de la adsorción reversible de las moléculas del soluto cargado en un grupo de intercambio iónico inmovilizado de carga opuesta. Estos grupos son los denominados intercambiadores iónicos y se utilizan comúnmente en el aislamiento y purificación de proteínas. Por ejemplo, una proteína cargada negativamente (un anión) se unirá a un intercambiador aniónico, el cual contiene grupos con carga positiva. El empleo de una alta concentración de sal para desplazar la proteína provoca una competencia aniónica para el intercambio con la proteína, liberándose ésta en solución (Harris & Angal, 1989).

Crear las condiciones óptimas de este proceso mediante la selección adecuada del pH y la concentración de sal son las bases fundamentales para separar una determinada proteína de una mezcla de proteínas y, por tanto, purificarla.

Las cromatografías de intercambio iónico se realizan en una columna (Pharmacia XK 16) de 2 x 1.6 cm, conteniendo una matriz de 5 ml Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia) e instalada con una bomba de HPLC (Pump Sistem 325 Kontron Instruments) y un detector espectroscópico UV/VIS (Severn Analytical SA 6500) a una longitud de onda de 620 nm.

Se mide el espectro de absorción de las fracciones eluidas de ficocianina después de cada cromatografía en un espectrofotómetro (PERKIN-ELMER Lambda 5) en el intervalo de 250-700 nm y se calcula la pureza específica de la proteína como la relación entre el pico máximo de absorción en la región visible (620 nm) y el de la región UV (280 nm).

Tanto en la cromatografía de interacción hidrofóbica como en la cromatografía de intercambio iónico la regeneración de la columna se efectúa mediante el lavado con NaOH 0.5 M, seguido con agua destilada y tampón 0.05M TRIS-HCl, pH 7. El volumen utilizado para cada una de las fases fue 50 ml a un flujo de 2 ml min⁻¹.

3.12.- CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA FICOCIANINA

3.12.1.- *Estimación del peso molecular de la ficocianina purificada*

La estimación del peso molecular del compuesto purificado se realiza mediante cromatografía de exclusión molecular, técnica que permite la separación de las moléculas en relación con su diámetro. Debido a que las proteínas presentan un amplio intervalo de pesos moleculares, esta técnica cromatográfica se utiliza comúnmente para separar, aislar y purificar proteínas, de modo que si se introducen proteínas estándares de peso molecular conocido, puede determinarse el peso molecular de una proteína de peso desconocido.

El calibrado de la columna se realiza con proteínas estándares de peso molecular conocido: azul dextrano (2000000) (que es el marcador del volumen de

exclusión de la columna, apoferritina (443000), β -amilasa (200000), lactato deshidrogenasa (140000), albúmina (66000), anhidrasa carbónica (29000) y citocromo c (12400); diluídas hasta una concentración de 0.5 mg ml^{-1} con tampón TRIS-HCl 0.05 M , pH 7. Seinyectan en una columna cromatográfica Superdex 200 (Pharmacia) ($28 \times 1 \text{ cm}$) y se emplea como fase móvil un tampón de TRIS-HCl 0.05 M , pH 7 conteniendo 0.1 M de NaCl, con un flujo de 0.5 ml min^{-1} . Se realizan tres réplicas para cada proteína y la muestra a analizar, utilizándose una bomba de HPLC (Pump Sistem 325 Kontron Instruments) y detector UV/VIS (SEVERN ANALYTICAL SA 6500) a una longitud de onda de 280 nm y 1 AUFS .

El equilibrado de la columna se efectúa mediante el lavado con tres volúmenes de columna, empleando tampón TRIS-HCl 0.05 M , pH 7 con 0.1 M de NaCl. Se realiza la regeneración de la columna mediante el lavado con NaOH 0.5 M a un flujo de aproximadamente 20 cm h^{-1} durante 1 a 2 horas en flujo reverso.

Se realiza una regresión lineal transformando previamente los valores del peso molecular en logaritmo en base 10, y teniendo en cuenta el volumen de elución de cada una de las proteínas, se calcula por interpolación el peso molecular de la muestra problema.

3.12.2.- Isoelectroenfoque

El isoelectroenfoque es un método electroforético mediante el cual las proteínas se separan en un gradiente de pH progresivamente creciente desde el ánodo hasta el cátodo, que es estabilizado mediante determinadas sustancias anfotéricas denominadas anfólitos. Bajo estas condiciones una proteína migrará a través de un gradiente de pH modificando su carga de superficie y, por tanto, su velocidad de migración, hasta alcanzar una zona de pH en la cual la carga neta de la proteína sea cero. Este punto se conoce como punto isoeléctrico y en él la migración es nula, permaneciendo la proteína "focalizada". Los anfólitos han de tener una alta capacidad tamponante alrededor de su punto isoeléctrico para que puedan mantener las características del gradiente de pH, incluso en presencia de altas concentraciones

de proteínas. Por otro lado, es necesario que los anfolitos posean también una buena conductividad alrededor de su pI y que la conductividad de todos los anfolitos que generen un determinado gradiente de pH sea lo más uniforme posible para evitar la aparición de zonas de baja conductividad que producirían un aumento de la temperatura en dichas regiones conocidas como puntos calientes (hot-spots).

Para el isoelectroenfoco se utilizan geles comerciales de poliacrilamida, Ampholine PAG plate de Pharmacia-Biotech, con un intervalo de pH de 3.5 - 9.5. Los geles se mantienen a 4 °C hasta su utilización.

Para llevar a cabo el enfoque se emplea una unidad electroforética Multiphor II (Pharmacia Biotech) conectada a una fuente de alimentación con los parámetros fijos a 50 mA y 30 W, recomendados para el empleo de un gel completo. Se mantiene la temperatura del sistema a 10 °C mediante un circuito de refrigeración conectado a dicha unidad.

Los geles, en su soporte plástico se colocan sobre la placa de porcelana del Multiphor II de Pharmacia, depositándose entre el plástico y la placa 0.5 ml de aceite de parafina para facilitar una temperatura homogénea en toda la superficie. Seguidamente se colocan unas bandas de isoelectroenfoco de Pharmacia empapadas en soluciones electrolíticas, NaOH 1M para la banda del cátodo y ácido fosfórico 1M para la banda del ánodo. A continuación se aplican 10 µl de muestra sobre los papeles de aplicación de Pharmacia de 5 x 2 mm de tamaño, colocados encima del gel, y éstos se retiran aproximadamente a la mitad del tiempo de migración total. Por último, se ajusta la altura de los electrodos para que coincidan con las bandas, respetando la polaridad del sistema.

El punto isoelectrico de la ficocianina se determina con la ayuda de marcadores proteicos (Pharmacia Biotech) que migran simultáneamente con la muestra. El patrón de calibración empleado contiene las siguientes proteínas con sus correspondientes valores de pI:

<i>Proteína</i>	<i>pI</i>
tripsinógeno	9.30
lentil lectil básica	8.65
lentil lectil neutra	8.45
lentil lectil ácida	8.15
mioglobina básica	7.35
mioglobina ácida	6.85
anhidrasa carbónica humana B	6.55
anhidrasa carbónica bovina B	5.85
β -lactoglobulina A	5.20
inhibidor de tripsina de soja	4.55
aminoglucosidasa	3.50

Una vez finalizado el isoelectroenfoque se procede al revelado de las bandas mediante la tinción con azul de Coomassie. El primer paso es colocar el gel en 250 ml de la solución de fijación durante 1 hora. Esta solución está compuesta por 29 g de ácido tricloroacético y 8.5 g de ácido sulfosalicílico disueltos con agua destilada hasta un volumen final de 250 ml. Esta solución precipita las proteínas e impide la difusión de los anfolitos fuera del gel. A continuación se lava el gel durante 5 minutos con 250 ml de una solución decolorante, preparada con 500 ml de etanol y 160 ml de ácido acético y llevada a un volumen final de 2 litros con agua destilada.

Se realiza la tinción colocando el gel durante 10 min. en 250 ml de una solución que se obtiene al disolver una tableta de PhastGel Blue R (Pharmacia Biotech) en 400 ml de solución decolorante, calentándose a continuación a 60 °C. A continuación se lava el gel varias veces con la solución decolorante hasta obtener una adecuada resolución de las bandas. Finalmente, se coloca el gel durante 1 hora en una solución de conservante preparada con 25 ml de glicerol disueltos en la solución decolorante hasta obtener un volumen final de 250 ml. El gel se cubre con una hoja de papel de celofán previamente sumergido en la solución conservante y se deja secar a temperatura ambiente.

La determinación del punto isoeléctrico se realiza midiendo la distancia de migración desde el borde catódico del gel a las diferentes bandas correspondientes a los marcadores proteicos y teniendo en cuenta sus pI se realiza un ajuste por el método de los mínimos cuadrados obteniéndose así una recta de regresión lineal a partir de la cual se calcula por interpolación el valor de pI de la muestra problema.

Los resultados corresponden a los valores de tres réplicas para cada proteína y la muestra a analizar.

3.12.3.- Determinación del peso molecular mediante electroforesis en gel de SDS - poliacrilamida.

Se emplea un gel homogéneo (250 x 110 x 0.5 mm) de poliacrilamida (Excel SDS Homogeneous 12.5, Pharmacia Biotech) que se coloca en una unidad electroforética Multiphor II (Pharmacia Biotech) conectada a una fuente de alimentación con 30 W y 50 mA; y a un sistema de refrigeración que mantiene la temperatura a 10 °C durante la electroforesis.

El gel se coloca en la superficie de la unidad electroforética evitando la formación de burbujas al expandir previamente 0.5 ml de aceite de parafina. A continuación se procede a colocar en los bordes del gel los tampones correspondientes al ánodo y al cátodo. Dichos tampones son unas bandas de gel preparadas comercialmente (Pharmacia Biotech), que cubren todo su ancho y están en contacto con los electrodos del sistema.

Se utiliza un patrón de calibración (LMW Calibration Kit, Pharmacia Biotech) que contiene seis proteínas de peso molecular conocido (expresado en daltons), envasadas en viales con 100 µg de cada proteína por vial y éstas son:

<i>Proteínas</i>	<i>Peso molecular</i>
fosforilasa b	94 000
albúmina	67 000
ovalbúmina	43 000
anhidrasa carbónica	30 000
inhibidor de tripsina	20 100
α -lactalbúmina	14 000

Cada vial para su utilización se disuelve en 100 μ l del tampón de muestra que se obtiene al disolver 0.5 ml de SDS, 77 mg de ditiotreitól y 5 mg de azul de bromofenol en 5 ml de un tampón "stock". Este último se prepara con 3 g de TRIS en 40 ml de agua destilada y ajustado el pH con aproximadamente 1.4 ml de ácido acético; llevado todo a un volumen final de 50 ml. El contenido del vial disuelto se calienta lentamente en un baño de agua hasta 100 °C durante 10 min.

La muestra se diluye cuatro veces con el tampón de muestra, que en este caso se prepara con el tampón "stock" concentrado cinco veces. Se calienta en un baño de agua a 100 °C durante 10 minutos. Se realizan pruebas preliminares aplicando al gel diferentes concentraciones del patrón de calibración y de la muestra a fin de conocer la cantidad adecuada para obtener una máxima resolución en los geles después de su tinción. Una vez finalizada la electroforesis se procede al revelado de las bandas, de la misma forma descrita en el IEF.

El cálculo del peso molecular se realiza a través de una recta de calibración con el logaritmo del peso molecular de las proteínas estándares y los Rf. La posición del azul de bromofenol se utiliza como punto de referencia y se mide inmediatamente finalizada la electroforesis, mientras que la posición de las bandas proteicas se miden después de la tinción. Por interpolación en la curva de calibración del Rf del pigmento-proteína se conoce el peso molecular de sus subunidades proteicas.

3.12.4.- ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS

La composición de aminoácidos de la fracción de ficocianina purificada se realiza según el método desarrollado por Barkholt & Jensen (1989). Este método está basado en la conversión de cisteína y cistina usando el ácido 3,3' - ditiopropiónico (DTDPA) en un compuesto estable, la S-2-carboxietiltiocisteína. Finalmente, este compuesto, junto con el resto de los aminoácidos, se analizan por HPLC tras su hidrólisis.

La metodología seguida consiste en añadir una solución al 10 % de DTDPA en tampón borato pH = 10.4 a la fracción de ficocianina purificada y dejar que se produzca la reacción durante 1 hora, al cabo de la cual se realiza la hidrólisis con una mezcla de HCl 6 N y fenol al 0.1 % durante 24 horas a 110 °C. Finalizada la hidrólisis, las muestras se evaporan a vacío a una temperatura de 60 °C. A continuación se resuspenden en tampón borato y se centrifuga a 12000 g durante 10 minutos a 4 °C. Por último, se procede a su análisis por HPLC.

El análisis por HPLC se realiza después de la derivatización en dos etapas. Primero se derivatizan los aminoácidos primarios con el reactivo OPA (o-ftalaldehído); y en la segunda etapa, los aminoácidos secundarios (los cuales no reaccionan con OPA) se derivatizan con el reactivo FMOC (9 - fluorenmetilcloroformato).

La separación de estos aminoácidos se realiza en un cromatógrafo Hewlett Packard 1050 equipado con un muestreador automático Hewlett Packard 1050, un detector de fluorescencia Hewlett Packard 1046A y con una columna de fase reversa C18 ODS Hypersil 5 µm (250 x 4 mm) con un protector de columna LiChrospher 100 RP-18, 5 µm (4 x 4 mm). El protocolo de elución es el siguiente:

eluyente A: 20 mM acetato sódico pH = 7.2 / 0.3 % tetrahidrofurano (THF)
/ 0.018 % trietilamina (TEA)

eluyente B: 100 mM acetato sódico pH = 7.2 / acetonitrilo / metanol
20/40/40

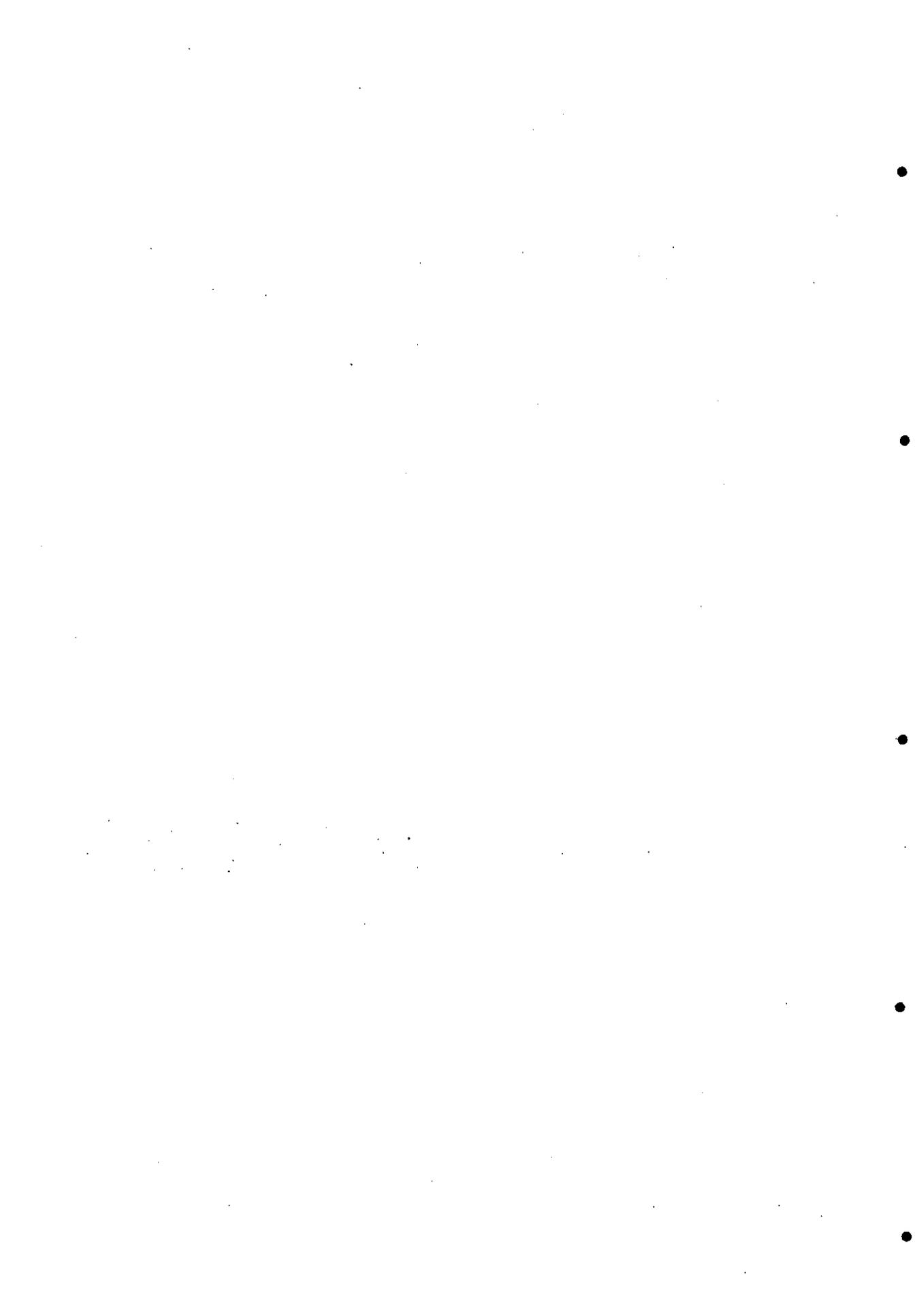
Tras la derivatización de los aminoácidos con los reactivos OPA y FMOC estos fueron eluidos de la columna con las siguientes condiciones:

<i>Tiempo (min)</i>	<i>% B</i>	<i>Flujo (ml min⁻¹)</i>
0	0	1.63
17	60	1.63
18	100	1.63
18.5	100	2.50
28	100	2.50
28.2	100	1.63
30	0	1.63

El reequilibrado de la columna se realizó durante 5 minutos utilizando como fase móvil la correspondiente al eluyente A.

La detección se realizó mediante fluorescencia, en el caso de los aminoácidos primarios (OPA) con una excitación y emisión a 340 y 450 nm, respectivamente, y para los aminoácidos secundarios (FMOC) con una excitación de 266 nm y emisión en 305 nm.

4.- *Experiencias y resultados*



4.1.- EVALUACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE FICOCIANINA DE *Synechococcus* sp. IO9201.

Los diferentes métodos de extracción y cuantificación de ficobiliproteínas mostraron la presencia de ficocianina y aloficocianina en *Synechococcus* sp. IO9201. Esto se confirmó al hacer el espectro de absorción de los extractos (Figura 4.1.1), en el que aparece un único pico de absorción centrado a 620 nm, que se corresponde con la ficocianina (Yamanaka y Glazer, 1980). Este pico está superpuesto al pico menor de la aloficocianina, presente siempre en bajas concentraciones, por lo que no fue considerada en las experiencias posteriores. La total ausencia de ficoeritrina quedó demostrada por la ausencia del pico de absorción que las caracteriza (Rowan, 1989).

Con objeto de optimizar la extracción de la ficocianina de *Synechococcus* sp. IO9201 se ensayaron diferentes métodos de extracción, utilizando agua destilada

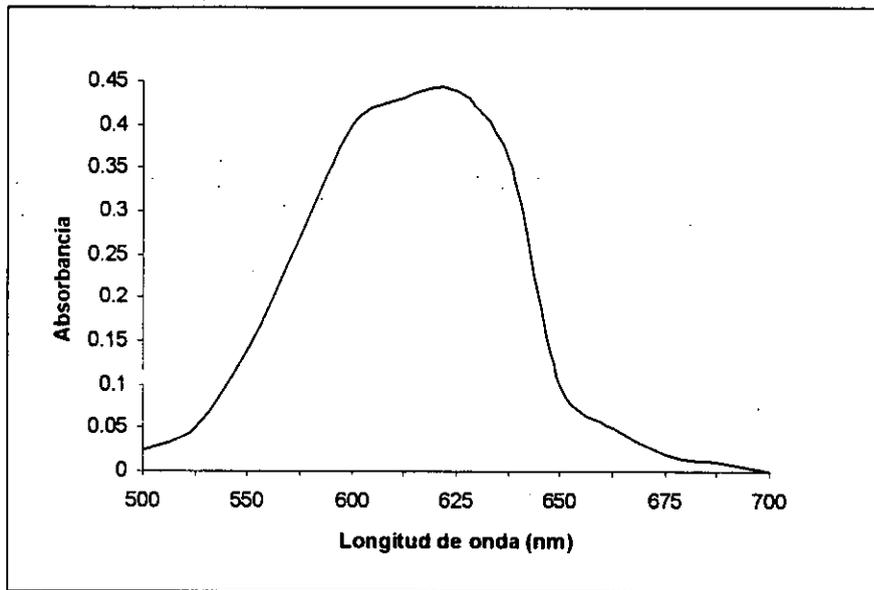


Figura 4.1.1. Espectro de absorción de las ficobiliproteínas extraídas de *Synechococcus* sp. IO9201

como solvente. La eficiencia de los métodos se determinó en función de la concentración de ficocianina obtenida y de su pureza, expresada como la relación entre A_{620}/A_{280} .

De los tres métodos ensayados, con el método de congelación y descongelación a 4 °C se obtuvo la mayor concentración de ficocianina (13.42 $\mu\text{g ml}^{-1}$) y la mayor pureza (0.27). Con los otros métodos se obtienen cantidades significativamente menores de ficocianina y de menor pureza (Tabla 4.1.1).

Tabla 4.1.1. Comparación de diferentes métodos de extracción de ficocianina de *Synechococcus* sp. IO9201, utilizando agua destilada como solvente

Método de extracción	Concentración ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Pureza (A_{620}/A_{280})
Sonicación prolongada a 4 °C	7.44 \pm 0.02	0.10
Congelación y descongelación a 4 °C	13.42 \pm 0.02	0.27
Congelación y descongelación en N líquido	9.41 \pm 0.01	0.18

Una vez elegido el método de congelación y descongelación a 4 °C para la extracción de la ficocianina de las células de *Synechococcus* sp. IO9201, se ensayaron distintas soluciones de extracción, con el fin de obtener mejores rendimientos y mayor pureza que con el agua destilada.

De las soluciones de extracción utilizadas, la extracción en fase alcalina (0.5 g l^{-1} de NaHCO_3 y de CaCO_3 , a pH 10.5) es la que produce la mayor concentración de pigmento (27.11 $\mu\text{g ml}^{-1}$) y la mayor pureza (0.43) (Tabla 4.1.2), y, por tanto, es la que se utilizó en todas las experiencias posteriores. Las restantes soluciones de extracción ensayadas dan todas menor rendimiento y menor pureza que las obtenidas con agua destilada como solvente (Tabla 4.1.2), aunque la extracción con tampón TRIS-HCl 0.05 M, pH 7 se aproxima a ésta, obteniéndose 12.91 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ficocianina y una pureza de 0.25. Con tampón fosfato, cloruro de sodio y cloruro de calcio se obtienen concentraciones entre 9.42 y 9.76 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ficocianina y purezas entre 0.18 y 0.2.

Tabla 4.1.2. Concentración y pureza de la ficocianina extraída de las células de *Synechococcus* sp. IO9201 por el método de congelación y descongelación a 4 °C con diferentes soluciones de extracción

Solución de extracción	Concentración ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Pureza (A_{620}/A_{280})
Agua destilada	13.42 ± 1.46	0.27
Fase alcalina	27.11 ± 3.6	0.43
Tampón TRIS-HCl 0.05 M, pH 7	12.91 ± 1.91	0.25
Cloruro de calcio	9.76 ± 1.16	0.25
Tampón fosfato 10 mM, pH 7	9.47 ± 1.32	0.19
Cloruro de sodio 0.15 M	9.42 ± 0.37	0.18

4.2.- EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO SOBRE EL CRECIMIENTO Y COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE *Synechococcus* sp. IO9201.

Diseño experimental

La modificación del medio de cultivo ha sido un método ampliamente utilizado para incrementar la producción de biomasa microalgal o para variar su composición. A partir de un medio base se ha seguido la estrategia de modificar cuantitativamente parte de los nutrientes suministrados. Así, se han obtenido variaciones importantes en la productividad y composición bioquímica bruta. Uno de los parámetros más utilizados es la concentración de la fuente de nitrógeno, ya que afecta la composición bioquímica de microalgas y cianobacterias. Es por ello que estudiamos como afecta la concentración de nitrógeno a la producción de biomasa, composición bioquímica bruta y producción de ficocianina en la cianobacteria *Synechococcus* sp. IO9201.

Se establece una serie de cultivos con las siguientes concentraciones de nitrógeno: 1, 2, 4 y 8 mM en forma de nitrato sódico, NaNO_3 . Las experiencias se realizan por triplicado. En todos los casos la relación N/P se mantiene constante en una proporción 20:1. El resto de los nutrientes son los que se indican en el apartado de "Materiales y Métodos" así como las condiciones de temperatura, iluminación y salinidad.

Los cultivos se realizan en botellas de 1 litro con 900 ml de medio de cultivo y aireados. La agitación en los cultivos se realiza mediante burbujeo de aire filtrado por $0.25 \mu\text{m}$ a través de filtros Millipore. La densidad inicial de los cultivos fue de $50 \text{ células ml}^{-1}$ de *Synechococcus* sp. IO9201. El desarrollo de los cultivos se sigue hasta que éstos alcanzan la fase estacionaria, midiéndose diariamente la densidad celular y el pH. Se determina asimismo el peso seco celular y la composición en pigmentos (clorofila *a*, carotenoides, ficocianina), proteínas, lípidos y carbohidratos cada 48 horas. La toma de muestras se realiza en el período de luz, a las 3-4 horas

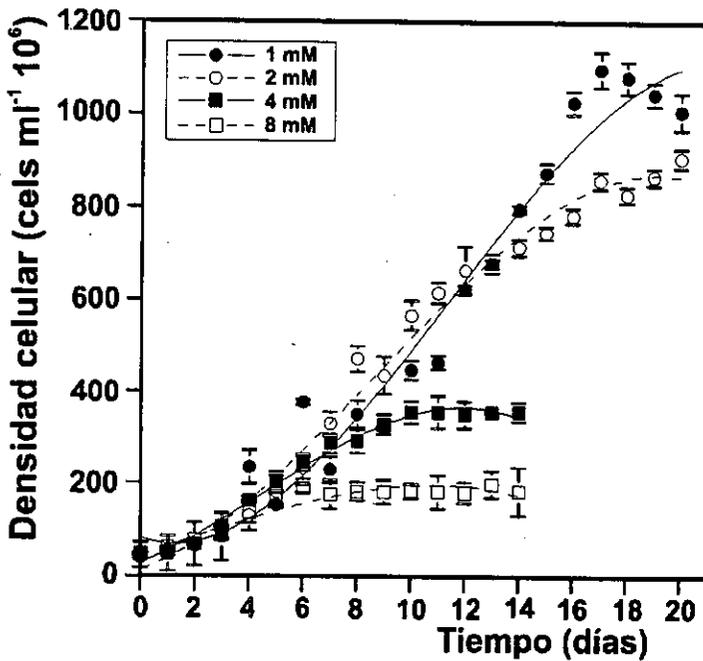


Figura 4.2.1.- Crecimiento de *Synechococcus* sp. IO9201 cultivada con distintas concentraciones de NaNO_3 .

del inicio de la fase de luz. El fotoperíodo de 12:12 horas permite mantener la sincronización en la división celular.

Crecimiento

Las curvas de crecimiento, expresadas en función de la densidad celular respecto al tiempo, para las diferentes concentraciones de nitrato muestran que el crecimiento difiere en función de la concentración de nitrógeno suministrada al medio de cultivo (Figura 4.2.1).

En general, la fase de adaptación fue muy similar en todos los casos, mientras que la duración de la fase exponencial fue mayor en los cultivos con 4 y 8 mM de nitrato (11 días) mientras que en los cultivos con 1 y 2 mM de nitrato ésta duró 4 y 5 días. El valor máximo de densidad celular en la fase estacionaria se obtiene en los

Tabla 4.2.1. Parámetros de la función logística y tasa de crecimiento media (μ_{med}) en cultivos de *Synechococcus* sp. IO9201 con diferentes concentraciones de NaNO_3 .

Concentración de NaNO_3 (mM)	k	z	r^2	μ_{med}
1	188.2	0.61	0.97	0.21
2	362.3	0.51	0.99	0.35
4	874.5	0.34	0.99	0.46
8	1288	0.29	0.99	0.40

cultivos con 8 mM de nitrato, con 1007×10^6 células ml^{-1} , seguido por los cultivos con 4 mM de nitrato, en los que se obtienen 906×10^6 células ml^{-1} . Estas densidades celulares son muy superiores a las obtenidas en los cultivos con 1 y 2 mM de nitrato, donde se obtienen 187.6×10^6 y 354×10^6 células ml^{-1} , respectivamente.

En todos los casos el crecimiento se ajusta a una curva logística, con r^2 siempre mayor que 0.97. Los parámetros de la función logística junto con las tasas de crecimiento medias en la fase exponencial para las diferentes concentraciones de nitrato se representan en la Tabla 4.2.1. Los valores de la capacidad de carga (k) son muy similares a las densidades celulares máximas obtenidas, y son una función de la concentración de nitrato utilizada. La relación es proporcional hasta 8 mM de nitrato, siendo en los cultivos con 2 y 4 mM de nitrato doble y cuádruple, respectivamente, que en los cultivos con 1 mM de nitrato. Sin embargo, en el cultivo con 8 mM de nitrato, aunque se obtiene la máxima capacidad de carga y la máxima densidad celular, no se mantiene esta proporcionalidad.

En cuanto a las tasas medias de crecimiento (μ_{med}) (Tabla 4.2.1), aumentan con la concentración de nitrato hasta 4 mM, disminuyendo a la concentración superior. El máximo valor de μ_{med} fue 0.46 doblajes día^{-1} y se obtuvo en los cultivos con 4 mM de nitrato, seguido de los cultivos con 8 mM de nitrato, con una μ_{med} de 0.40 doblajes día^{-1} . Los cultivos con 1 y 2 mM de nitrato presentan tasas medias de crecimiento mucho menores, con 0.21 y 0.35 doblajes día^{-1} , respectivamente.

El tratamiento estadístico de los datos se realizó utilizando los valores de densidad celular en función de la concentración de nitrato, mediante un ANOVA y el test de Duncan ($p < 0.05$). El análisis estadístico indica que no existen diferencias significativas en la densidad celular entre los cultivos con 4 y 8 mM de nitrato, y que éstos dos son significativamente mayores que los cultivos con 1 y 2 mM de nitrato, entre los que tampoco hay diferencias significativas.

El análisis estadístico y la tendencia general de las curvas de crecimiento permiten establecer dos grupos de cultivos, en función de la concentración de nitrato en el medio:

- Cultivos de bajo crecimiento, debido a una menor disponibilidad de la fuente de nitrógeno durante su desarrollo, como es el caso de las concentraciones de 1 y 2 mM de nitrato.
- Cultivos donde se alcanza un mayor crecimiento, debido a que no existen limitaciones de nitrato, en los cuales se incluyen las concentraciones de 4 y 8 mM de nitrato.

Peso seco

Los valores del peso seco celular al final de la fase logarítmica son muy similares en las células cultivadas con 1, 2 y 4 mM de nitrato, con valores entre 2.24 y 2.42 pg célula⁻¹. Por el contrario, las células cultivadas con 8 mM de nitrato presentan valores significativamente menores del peso seco, con 1.67 pg célula⁻¹ (Figura 4.2.2).

Con respecto al peso seco por volumen de cultivo, en los cultivos con 4 y 8 mM de nitrato se obtiene una producción significativamente mayor de biomasa seca por unidad de volumen de cultivo que en los cultivos con 1 y 2 mM de nitrato (Figura 4.2.2). La producción de biomasa en peso seco al final de la fase logarítmica es de 1.85 y 1.72 mg ml⁻¹ en los cultivos con 4 y 8 mM de nitrato, respectivamente, mientras que en los cultivos con 1 y 2 mM de nitrato se obtienen valores de 0.45 y 0.65 mg ml⁻¹, respectivamente.

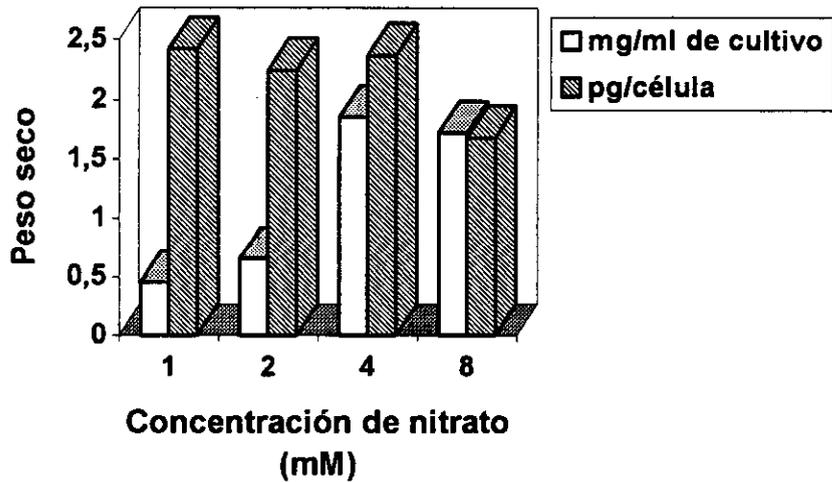


Figura 4.2.2.- Biomasa en peso seco (expresada en mg ml^{-1} y en pg célula^{-1}) de *Synechococcus sp. IO9201* al final de la fase logarítmica cultivada con distintas concentraciones de NaNO_3 .

Pigmentos fotosintéticos

El análisis del contenido celular de pigmentos (expresado en pg célula^{-1}) a lo largo del tiempo de cultivo muestra que los valores de clorofila a (Figura 4.2.3a) y carotenoides totales (Figura 4.2.3b), tras un descenso inicial, tienden a mantenerse relativamente estables en todas las concentraciones de nitrato ensayadas y sin grandes variaciones entre ellas, excepto el contenido en clorofila a en los cultivos con 8 mM de nitrato, que es mayor que en los restantes a partir del décimo día de cultivo.

La evolución del contenido celular de ficocianina es diferente en las distintas concentraciones de nitrato ensayadas (Figura 4.2.3c). En los cultivos con 1 y 2 mM de nitrato el contenido celular de ficocianina desciende durante la fase exponencial, obteniéndose valores de 0.0095 y $0.0096 \text{ pg célula}^{-1}$, respectivamente, en el último día de esta fase de crecimiento, y se mantiene prácticamente constante y en cantidades mínimas en la fase estacionaria (0.007 y $0.005 \text{ pg célula}^{-1}$). Esta misma tendencia se manifiesta en los cultivos con 4 mM de nitrato, pero en este caso el

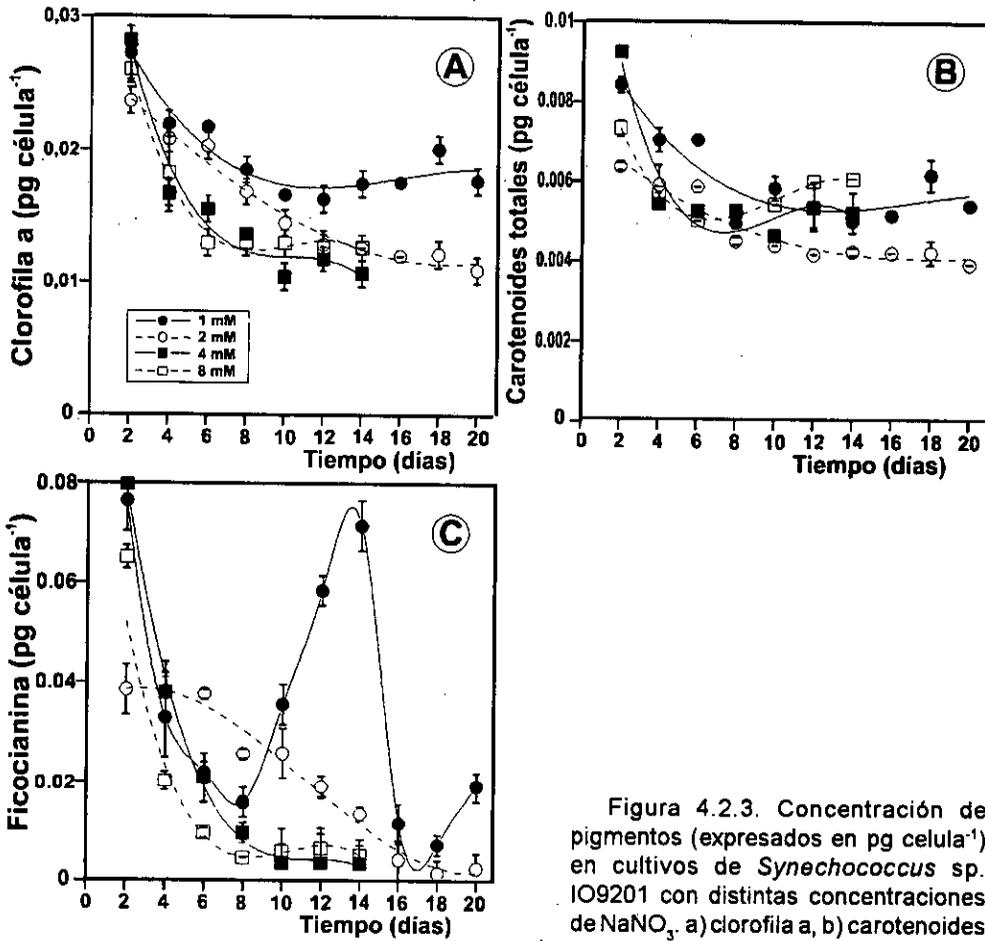


Figura 4.2.3. Concentración de pigmentos (expresados en pg célula^{-1}) en cultivos de *Synechococcus* sp. IO9201 con distintas concentraciones de NaNO_3 . a) clorofila a, b) carotenoides totales y c) ficocianina.

descenso es más lento debido a que estos cultivos tienen una fase exponencial de crecimiento más larga; los valores mínimos ($0.004 \text{ pg célula}^{-1}$) se obtienen a partir del día 18 de cultivo. La evolución del contenido celular de ficocianina fue diferente en los cultivos con 8 mM de nitrato. La concentración celular de ficocianina desciende al inicio de la fase exponencial, hasta el octavo día de cultivo, en el que se obtiene un valor de $0.016 \text{ pg célula}^{-1}$. A continuación, aumenta drásticamente la concentración celular de este pigmento, hasta alcanzar un máximo de $0.07 \text{ pg célula}^{-1}$ el día 14 de cultivo, disminuyendo abruptamente a $0.01 \text{ pg célula}^{-1}$ el día 14 de cultivo.

Si se analizan estadísticamente los datos de concentraciones celulares de pigmentos al final de la fase exponencial en función de las concentraciones de nitrato

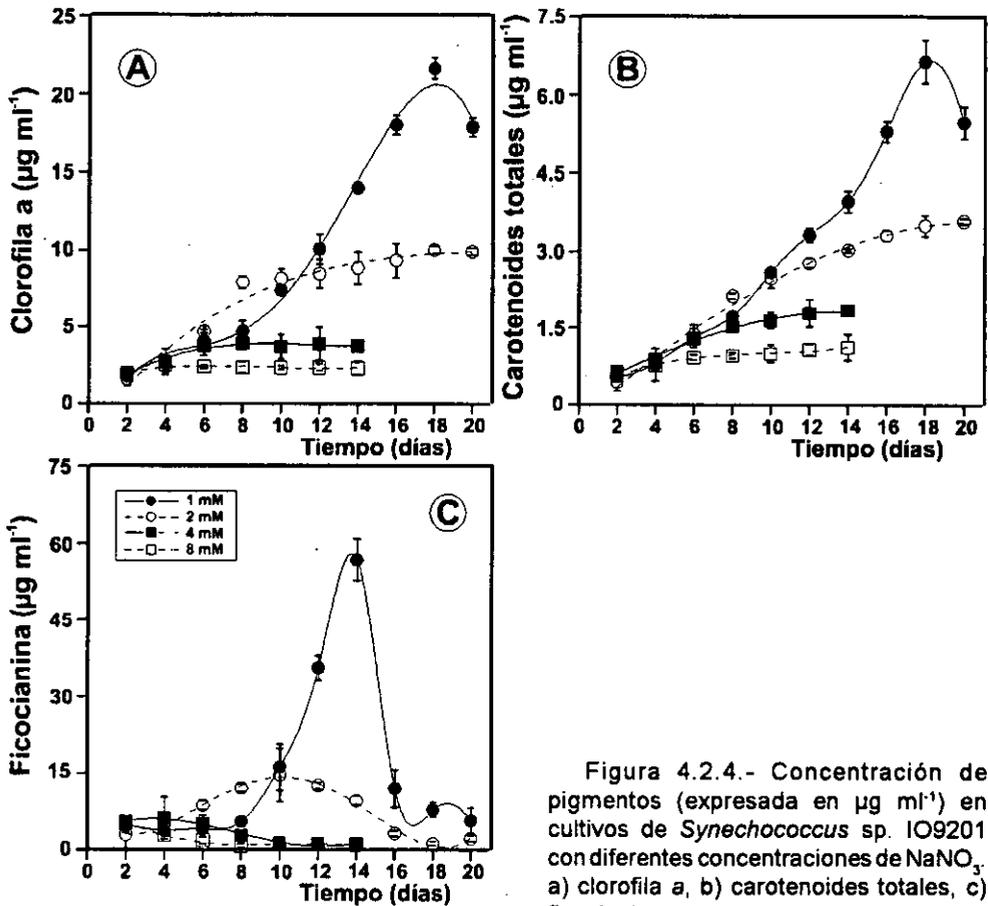


Figura 4.2.4.- Concentración de pigmentos (expresada en $\mu\text{g ml}^{-1}$) en cultivos de *Synechococcus* sp. IO9201 con diferentes concentraciones de NaNO_3 , a) clorofila a, b) carotenoides totales, c) ficocianina.

mediante un ANOVA y test de Duncan, no existen diferencias significativas en las concentraciones de clorofila a y carotenoides totales para ninguna de las concentraciones de nitrato ensayadas. Sin embargo, la concentración de ficocianina por célula en los cultivos con 8 mM de nitrato es significativamente mayor que las concentraciones celulares de este pigmento obtenidas con las restantes concentraciones de nitrato; asimismo, la concentración celular de ficocianina en los cultivos con 4 mM de nitrato es significativamente mayor que la de los cultivos con 1 y 2 mM de nitrato, que no difieren entre sí.

La producción de pigmentos por volumen de cultivo (Figura 4.2.4) varía en función de la concentración de nitrato del medio y a lo largo del tiempo de cultivo.

Al final de la fase exponencial de crecimiento, las mayores producciones de pigmentos por volumen de cultivo se obtienen en los cultivos con 8 mM de nitrato. Los valores de clorofila *a* (Figura 4.2.4 a) y carotenoides totales (Figura 4.2.4 b) aumentan durante el crecimiento, obteniéndose los máximos valores en la fase estacionaria. Los aumentos son mucho mayores en los cultivos con 4 y 8 mM de nitrato que en los de 1 y 2 mM de nitrato. La producción de ficocianina (Figura 4.2.4 c) disminuye con el tiempo de cultivo en los cultivos con 1 y 2 mM de nitrato; en los cultivos con 4 mM se produce un incremento inicial, obteniéndose la máxima producción durante la fase exponencial ($14.60 \mu\text{g ml}^{-1}$), para descender al final de la misma y en la fase estacionaria. En los cultivos con 8 mM de nitrato, la producción de ficocianina presenta un pico el día 14 de cultivo, coincidiendo con el máximo de concentración celular, obteniéndose una máxima producción próxima a $60 \mu\text{g ml}^{-1}$.

El análisis estadístico de los datos de pigmentos por volumen de cultivo al final de la fase logarítmica de crecimiento indicó diferencias significativas entre las concentraciones de nitrato ensayadas. Los datos de producción de pigmentos pueden ordenarse en función del test de Duncan como sigue:

clorofila *a* ($\mu\text{g ml}^{-1}$): 1 mM = 2 mM < 4 mM < 8 mM

carotenoides totales ($\mu\text{g ml}^{-1}$): 1 mM < 2 mM < 4 mM < 8 mM

ficocianina ($\mu\text{g ml}^{-1}$): 1 mM = 2 mM = 4 mM < 8 mM

A partir de las concentraciones de cada pigmento, se calcularon las relaciones entre los mismos, expresándose en función de las medias para cada fase de crecimiento en cada concentración de nitrato (Figura 4.2.5). La relación clorofila *a*/carotenoides totales (Figura 4.2.5a) desciende en la fase estacionaria en todos los cultivos excepto en el de 8 mM de nitrato, en el que se produce un ligero aumento de esta relación en esta fase; los valores de esta relación en la fase logarítmica no se ven afectados por la concentración de nitrato, mientras que en la fase estacionaria aumentan a medida que se incrementa la concentración de nitrógeno del medio.

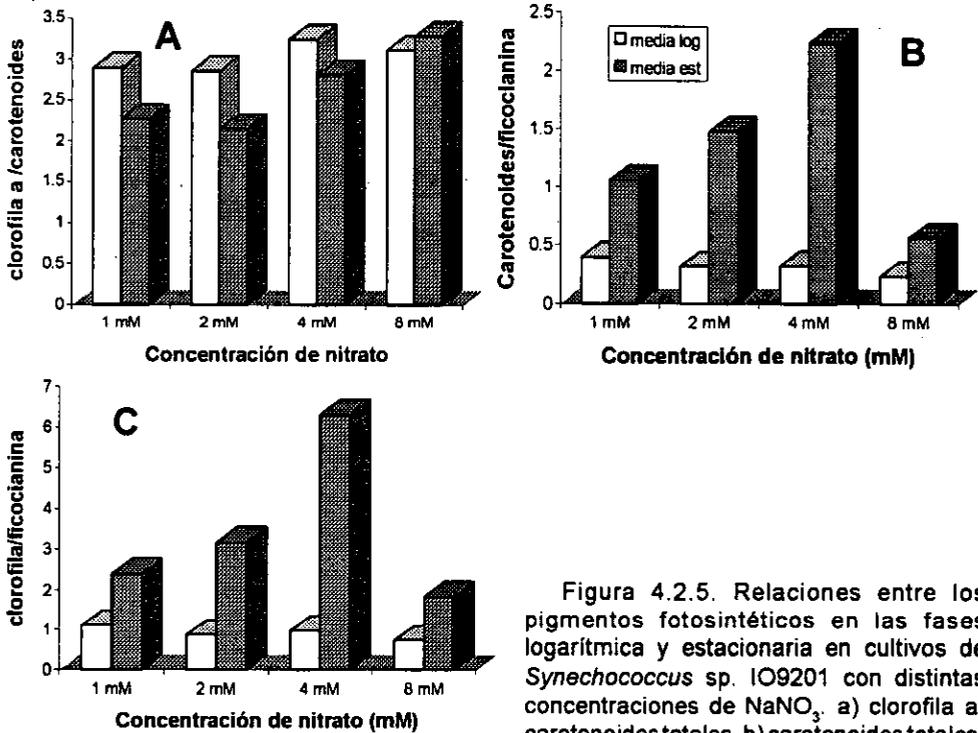


Figura 4.2.5. Relaciones entre los pigmentos fotosintéticos en las fases logarítmica y estacionaria en cultivos de *Synechococcus* sp. IO9201 con distintas concentraciones de NaNO_3 : a) clorofila a / carotenoides totales, b) carotenoides totales / ficocianina y c) clorofila a / ficocianina.

La relación carotenoides totales / ficocianina aumenta en la fase estacionaria respecto a los valores obtenidos en la fase logarítmica en todas las concentraciones de nitrato ensayadas (Figura 4.2.5 b). Los valores de esta relación en la fase logarítmica no se ven afectados por la concentración de nitrato, aunque hay una ligera tendencia a disminuir al aumentar la concentración de nitrógeno. Por el contrario, la relación carotenoides totales / ficocianina en la fase estacionaria aumenta con la concentración de nitrato hasta 4 mM, descendiendo acusadamente con la concentración de 8 mM. La relación clorofila a / ficocianina presenta un patrón similar (Figura 4.2.5c).

Protetnas totales

El contenido celular de proteínas totales, expresado en pg célula^{-1} , a lo largo del cultivo desciende en todas las concentraciones de nitrato ensayadas hasta el

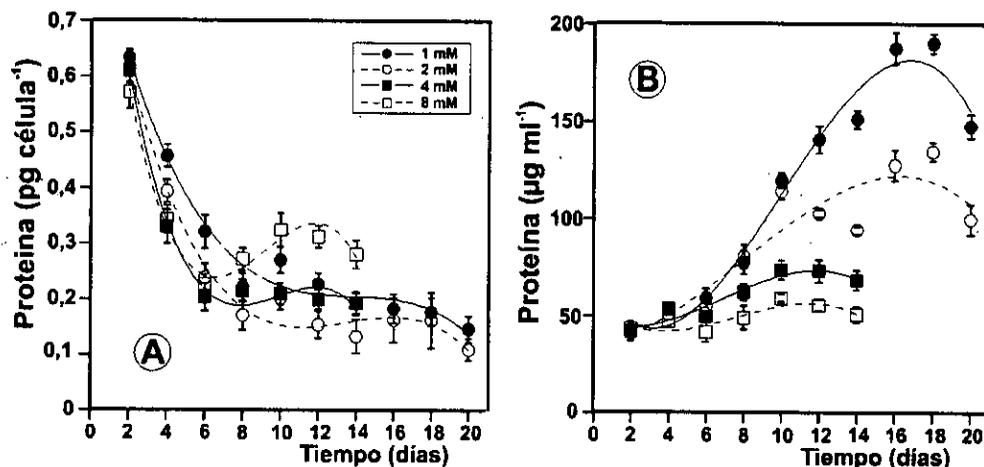


Figura 4.2.6. Contenido en proteínas durante el crecimiento de *Synechococcus* sp. IO9201 cultivada con diferentes concentraciones de NaNO_3 expresado en: a) pg célula^{-1} , b) $\mu\text{g ml}^{-1}$ de cultivo.

octavo día de cultivo, y a partir de este día se mantiene más estable (Figura 4.2.6a). Al final de la fase logarítmica, las concentraciones celulares de proteína en los cultivos con 1 y 2 mM de nitrato fueron de 0.22 y $0.20 \text{ pg célula}^{-1}$, respectivamente, mientras que en los cultivos con 4 y 8 mM de nitrato estos valores fueron de 0.16 y $0.18 \text{ pg célula}^{-1}$, respectivamente.

La producción de proteína por volumen de cultivo aumenta con la concentración de nitrato en el medio (Figura 4.2.6b), obteniéndose las máximas producciones con los cultivos de 8 mM de nitrato, con $190.37 \mu\text{g ml}^{-1}$, seguidas de las obtenidas en los cultivos con 4 mM de nitrato, con $134.63 \mu\text{g ml}^{-1}$. Los cultivos con 1 y 2 mM de nitrato presentan valores de 59.34 y $73.89 \mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente.

Contenido de carbohidratos

El contenido de carbohidratos (expresado en pg célula^{-1}) aumenta durante el crecimiento de *Synechococcus* sp. IO9201, obteniéndose los máximos valores en la fase estacionaria (Figura 4.2.7a). En los cultivos con la menor de las concentra-

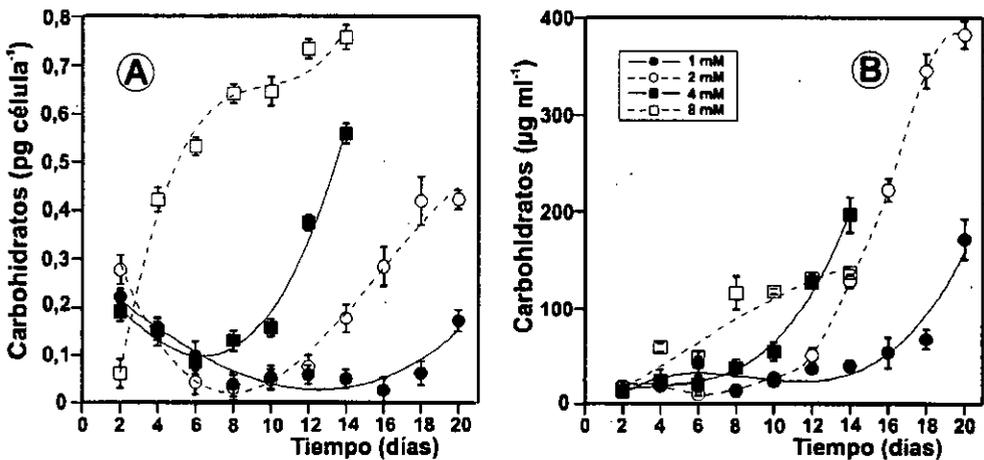


Figura 4.2.7. Contenido en carbohidratos durante el crecimiento de *Synechococcus* sp. IO9201 cultivada con diferentes concentraciones de NaNO₃ expresado en: a) pg célula⁻¹, b) µg ml⁻¹ de cultivo.

ciones de nitrato ensayadas (1 mM) el contenido celular de carbohidratos aumenta desde el inicio del cultivo, mientras que en los cultivos con las restantes concentraciones de nitrato este aumento se produce al final de la fase exponencial de crecimiento. La concentración celular de carbohidratos es afectada por la concentración de nitrato del medio. Los valores máximos se obtienen en los cultivos con 1 mM de nitrato, con 0.76 pg cél⁻¹, seguidos de los cultivos con 2 mM de nitrato, en los que el contenido celular de carbohidratos es de 0.60 pg cél⁻¹.

La producción de carbohidratos por volumen de cultivo (Figura 4.2.7b) es máxima en los cultivos con 4 mM de nitrato (382 µg ml⁻¹) mientras que en los restantes cultivos los valores máximos de producción de carbohidratos están entre 115.92 µg ml⁻¹ y 196.60 µg ml⁻¹.

Lípidos totales

El contenido lipídico celular de *Synechococcus* sp. IO9201 desciende con el desarrollo del cultivo para todas las concentraciones de nitrato utilizadas (Figura 4.2.8a), sin que existan diferencias significativas entre las distintas concentraciones

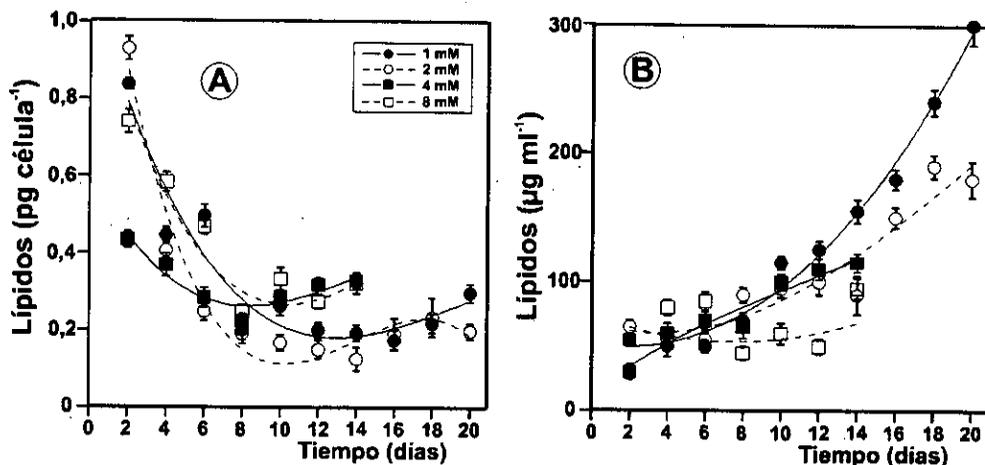


Figura 4.2.8. Contenido de lípidos durante el crecimiento de *Synechococcus* sp. 109201 cultivada con diferentes concentraciones de NaNO_3 expresado en: a) pg célula^{-1} , b) $\mu\text{g ml}^{-1}$ de cultivo.

de nitrato. El contenido de lípidos totales por célula en la fase estacionaria presenta valores entre 0.19 y $0.30 \text{ pg célula}^{-1}$.

La producción de lípidos totales por volumen de cultivo aumenta en la fase estacionaria de crecimiento alcanzando máximos de 180 y $300 \mu\text{g ml}^{-1}$ en las concentraciones de 4 y 8 mM de nitrato, respectivamente (Figura 4.2.8b), mientras que en los cultivos con 1 y 2 mM de nitrato se obtienen producciones máximas de 90 y $120 \mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente.

Relaciones entre las fracciones bioquímicas celulares

A partir de las concentraciones de cada componente, se calcularon las relaciones entre los mismos, expresándose en función de las medias para cada fase de crecimiento en cada concentración de nitrato (Figura 4.2.9). La relación proteína/lípidos varía en función de la fase de crecimiento y de la concentración de nitrato utilizada (Figura 4.2.9 a). Esta relación es mayor en la fase logarítmica que en la estacionaria en todas las concentraciones de nitrato ensayadas, excepto en 1 mM , en donde se invierte totalmente esta tendencia. La relación proteína/lípidos es similar

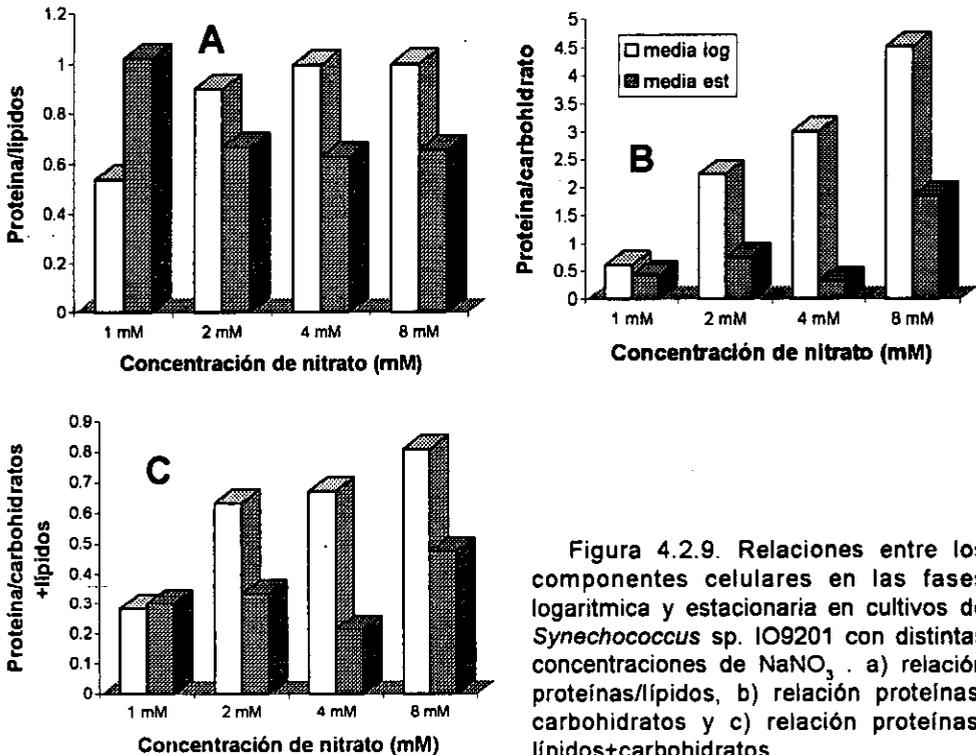


Figura 4.2.9. Relaciones entre los componentes celulares en las fases logarítmica y estacionaria en cultivos de *Synechococcus* sp. IO9201 con distintas concentraciones de NaNO_3 . a) relación proteínas/lípidos, b) relación proteínas/carbohidratos y c) relación proteínas/lípidos+carbohidratos.

en las concentraciones de 2, 4 y 8 mM de nitrato para cada fase, mientras que en los cultivos con 1 mM de nitrato esta relación es menor en la fase logarítmica y mayor en la estacionaria.

La relación proteína/carbohidratos es siempre mayor en la fase logarítmica que en la estacionaria (Figura 4.2.9b). La relación proteína/carbohidratos en la fase logarítmica aumenta con el incremento del nitrógeno en el medio de cultivo, mientras que en la fase estacionaria este aumento sólo es claro en los cultivos con 8 mM de nitrato. Para todas las concentraciones de nitrato ensayadas la relación proteína/lípidos es inferior a la relación de proteína/carbohidratos.

La relación entre la proteína y los productos de reserva (carbohidratos y lípidos) es mayor en la fase logarítmica que en la estacionaria para todos los cultivos excepto para los de 1 mM de nitrato, que presentan valores similares en ambas fases

(Figura 4.2.9c). Esta relación tiende a aumentar con la concentración de nitrato en la fase logarítmica, mientras que en la fase estacionaria presenta valores similares en los cultivos con 1, 2 y 4 mM y aumenta en los cultivos con 8 mM de nitrato.

4.3.- EFECTO DE LA RELACIÓN INICIAL N/P EN EL CRECIMIENTO Y COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE *Synechococcus* sp. IO9201.

Diseño experimental

Además de la concentración de nitrógeno, la relación nitrógeno/fósforo (N/P) es otro de los factores importantes en la composición de los medios de cultivo. Los distintos trabajos que se han publicado hasta el momento muestran un amplio intervalo de valores para esta relación, requiriendo cada especie de microalgas y cianobacterias un valor óptimo particular. Esta relación afecta no sólo a la producción de biomasa, sino también a la concentración relativa de los distintos componentes celulares de las microalgas y cianobacterias. Es por ello que se determinó el efecto de esta relación sobre la producción de biomasa, composición bioquímica bruta y producción de ficocianina por la cianobacteria *Synechococcus* sp. IO9201. A partir de un medio base con suficiencia del resto de los nutrientes, se ha modificado cuantitativamente el fósforo, para obtener de esta forma distintas relaciones de N/P en el medio.

Se ensayaron diferentes relaciones N/P, utilizándose NaH_2PO_4 como fuente de fósforo en concentraciones de 100, 200, 400, 800 y 1600 mM. La fuente de nitrógeno se mantuvo constante a 8 mM de NaNO_3 , para obtener relaciones N/P de 80:1, 40:1, 20:1, 10:1 y 5:1, respectivamente, incluyéndose, además, un cultivo sin fósforo. El resto de los nutrientes añadidos son los que se indican en el apartado de "Materiales y Métodos" así como las condiciones de temperatura, iluminación y salinidad. Las experiencias se realizan por duplicado.

Para estudiar el efecto de la relación N/P, se mantienen constantes el resto de los parámetros de cultivo, pues la variación de más de un parámetro produce interrelaciones en la respuesta de la especie en estudio.

Los cultivos se realizan en botellas de 1 litro con 900 ml de cultivo y aireados. La agitación en los cultivos se realiza mediante burbujeo de aire filtrado mediante filtros Millipore de 0.25 μm . La densidad inicial de los cultivos fue de 50×10^6 células ml^{-1} . El desarrollo de los cultivos se sigue hasta que éstos alcanzan la fase de crecimiento estacionaria, midiéndose diariamente la densidad celular. Cada 48 horas se determina la composición de pigmentos (clorofila *a*, carotenoides totales y ficocianina), el peso seco y el contenido de proteínas, carbohidratos y lípidos totales. La toma de muestras se realiza en el período de luz y a las 3-4 horas del inicio del mismo. El fotoperíodo de 12:12 horas permite mantener una sincronización en la división celular, indispensable para conocer el estado fisiológico de un microorganismo.

Crecimiento

Las curvas de crecimiento *Synechococcus* sp. IO9201, expresadas en función de la densidad celular frente al tiempo, para las diferentes relaciones N/P y

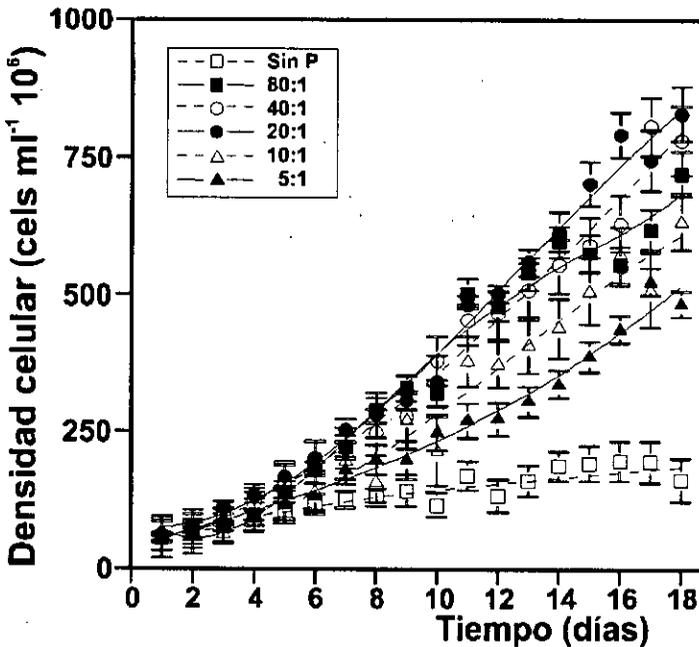


Figura 4.3.1.- Crecimiento de *Synechococcus* sp. IO9201 cultivada con distintas relaciones de N/P.

Tabla 4.3.1. Parámetros de la función logística y tasa media de crecimiento (μ_{med}) en los cultivos de *Synechococcus* sp. IO9201, con diferentes relaciones de N/P.

Relación N/P	k	z	r ²	μ_{med}
Sin P	203.1	0.19	0.88	0.15
80:1	701.3	0.31	0.98	0.28
40:1	781.1	0.22	0.99	0.30
20:1	993.5	0.26	0.99	0.33
10:1	648.1	0.26	0.97	0.18
5:1	401.6	0.24	0.97	0.18

para el cultivo sin fósforo se representan en la figura 4.3.1. El crecimiento difiere en función de la relación N/P del medio de cultivo. Los menores crecimientos se obtienen en los cultivos sin fósforo y en los que contienen las mayores concentraciones de fósforo (relaciones N/P 10:1 y 5:1). Los cultivos con relaciones N/P 80:1, 40:1 y 20:1 presentaron un crecimiento similar, aunque los cultivos con la relación N/P 80:1 entraron antes en fase estacionaria.

La densidad celular máxima en la fase estacionaria se obtuvo en los cultivos con una relación N/P de 20:1, con 830×10^6 células ml^{-1} , seguidos de los cultivos con relaciones N/P 40:1 y 80:1 con valores de 757×10^6 y 721×10^6 células ml^{-1} , respectivamente. La mínima densidad celular se obtuvo en los cultivos sin fósforo, con 197×10^6 células ml^{-1} . Las densidades celulares en los cultivos con relaciones N/P 10:1 y 5:1 fueron 634×10^6 y 523×10^6 células ml^{-1} , respectivamente.

El crecimiento de los cultivos se ajusta en todos los casos a una función logística, cuyos parámetros se presentan en la Tabla 4.3.1, junto con las tasas medias de crecimiento (μ_{med}). La capacidad de carga (k) varía en función de las relaciones N/P, siendo máxima en los cultivos con una relación N/P 20:1, igual que la densidad celular máxima.

La tasa media de crecimiento (μ_{med}) aumenta a medida que desciende la relación N/P en el medio hasta una relación 20:1, disminuyendo para relaciones menores

(Tabla 4.3.1). El valor máximo se obtiene en los cultivos con una relación 20:1 (0.33 doblajes día⁻¹). Los cultivos con mayores concentraciones de fósforo, y, por tanto, con las relaciones N/P menores, presentan tasas medias de crecimiento similares a los cultivos sin fósforo, aunque se obtienen mayores densidades celulares debido a una mayor duración de la fase logarítmica.

El análisis estadístico de los datos de la densidad celular mediante un ANOVA y test de Duncan ($p < 0.05$), indicó que la densidad celular obtenida con la relación 20:1 es significativamente mayor que las obtenidas en las restantes relaciones N/P; sólo las densidades celulares obtenidas en las relaciones 80:1 y 40:1 no presentaron diferencias significativas entre sí, aunque fueron significativamente menores que la densidad celular obtenida en la relación 20:1.

En función de las densidades celulares se pueden ordenar los cultivos como sigue:

$$20:1 > 80:1 = 40:1 > 10:1 > 5:1 > \text{sin P}$$

Peso seco celular

Los valores del peso seco celular al final de la fase logarítmica son muy similares para las células cultivadas en relaciones N/P de 80:1, 40:1, 20:1 y 10:1, con valores entre 1.46 y 1.77 pg célula⁻¹; ligeramente superiores en los cultivos con una relación N/P de 5:1 (2.16 pg célula⁻¹), y mayores en los cultivos sin fósforo (3.84 pg célula⁻¹) (Figura 4.3.2).

Con respecto a los valores del peso seco por volumen de cultivo al final de la fase logarítmica, todos los cultivos con las relaciones N/P ensayadas presentaron una producción similar de biomasa seca (entre 0.8 y 1.03 mg/ml), excepto los cultivos sin fósforo que presentaron un valor ligeramente menor (0.45 mg/ml) (Figura 4.3.2).

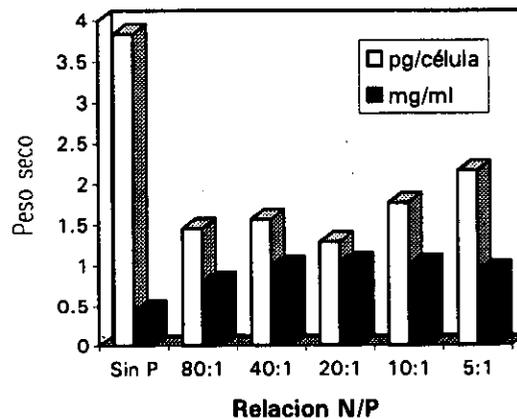
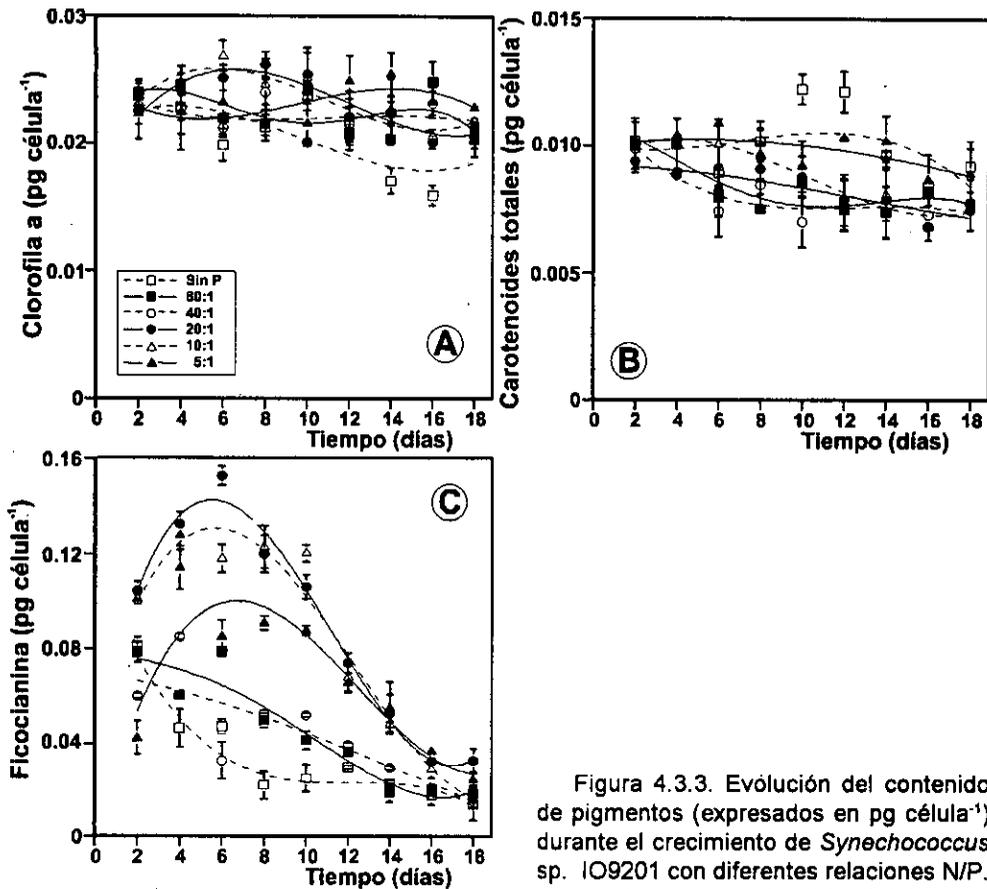


Figura 4.3.2.-Biomasa en peso seco (expresada en mg/ml y en pg/célula) de *Synechococcus* sp. IO9201 al final de la fase logarítmica cultivada con diferentes relaciones N/P.

Pigmentos

Los contenidos celulares de clorofila *a* (Fig. 4.3.3.a) y carotenoides totales (Fig. 4.3.3.b), expresado en pg célula^{-1} , tienden a mantenerse relativamente estables a lo largo del crecimiento para todas las relaciones N/P, con valores entre 0.02 y 0.03 pg célula^{-1} para la clorofila *a* y entre 0.007 y 0.01 pg célula^{-1} para los carotenoides. Los cultivos sin fósforo presentan esta misma tendencia. Sin embargo, las concentraciones celulares de ficocianina presentan los valores máximos en la fase logarítmica de crecimiento y tienden a disminuir con la edad del cultivo. La máxima concentración se obtiene en los cultivos con las relaciones N/P 20:1 y 10:1 (0.15 y 0.11 pg célula^{-1} , respectivamente).

El análisis estadístico de los resultados de la concentración de pigmentos celulares al final de la fase logarítmica de crecimiento indicó que no existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los valores analizados para la clorofila *a*. Sin embargo, los valores de carotenoides en los cultivos sin fósforo son significativamente mayores que en los restantes cultivos; los valores en los cultivos con las relaciones N/P 80:1 y 5:1 no difieren entre sí, pero son significativamente mayores con respecto a los cultivos con las relaciones de 10:1, 20:1 y 40:1, que no difieren entre sí. Con respecto



a la ficocianina, los cultivos con relaciones N/P de 20:1, 10:1 y 5:1 son similares entre sí y significativamente superiores al resto.

clorofila a (pg cél⁻¹): 0=80=40=20=10=5
 carotenoides (pg cél⁻¹): 10=20=40<80=5<0
 ficocianina (pg cél⁻¹): 0=80=40<20=10=5

La producción de pigmentos por volumen de cultivo (Fig. 4.3.4) varía en función de la relación N/P del medio y a lo largo del tiempo de cultivo. Los valores de clorofila a (Fig. 4.3.4 a) y carotenoides totales (Fig. 4.3.4 b) por volumen de cultivo aumentan durante el crecimiento, obteniéndose los máximos valores al final de

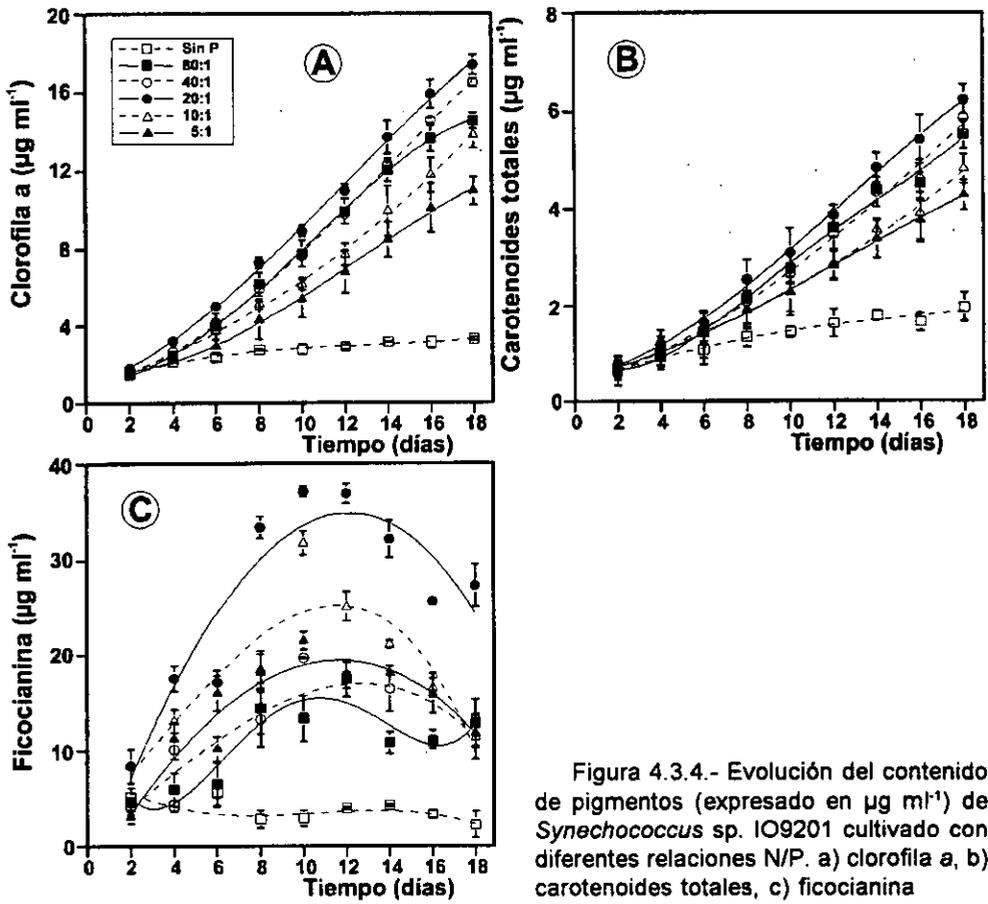


Figura 4.3.4.- Evolución del contenido de pigmentos (expresado en $\mu\text{g ml}^{-1}$) de *Synechococcus* sp. IO9201 cultivado con diferentes relaciones N/P. a) clorofila a, b) carotenoides totales, c) ficocianina

la fase estacionaria. La máxima producción de clorofila a se obtiene en los cultivos con relaciones N/P 20:1 y 40:1, con valores de 17.44 y $16.52 \mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente. Los valores mínimos se obtienen en los cultivos con una relación N/P 5:1, con $10.99 \mu\text{g ml}^{-1}$, mientras que los cultivos sin fósforo tienen un contenido en clorofila a de $3.31 \mu\text{g ml}^{-1}$. El análisis estadístico de estos resultados al final de la fase logarítmica de crecimiento reveló las siguientes diferencias significativas:

$$\text{Clorofila } a (\mu\text{g ml}^{-1}): 0 < 5 < 10 = 80 < 40 = 20$$

La máxima producción de carotenoides totales se obtiene en los cultivos con una relación N/P de 20:1, con $6.24 \mu\text{g ml}^{-1}$, valores menores se obtienen en las relaciones 80:1 y 40:1 (5.52 y $5.86 \mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente). Los cultivos con

relaciones N/P 10:1 y 5:1 presentan valores similares de carotenoides totales (4.27 y 4.82 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente). Los cultivos sin fósforo tienen un contenido en carotenoides totales de 1.47 $\mu\text{g ml}^{-1}$. El análisis estadístico de estos resultados al final de la fase logarítmica de crecimiento reveló las siguientes diferencias significativas:

$$\text{Carotenoides totales } (\mu\text{g ml}^{-1}): 0 < 5 = 10 < 80 = 40 < 20$$

Con respecto a la producción de ficocianina (Figura 4.3.4c) se produce un incremento en el inicio de la fase logarítmica descendiendo posteriormente. La producción máxima se obtiene en los cultivos con una relación N/P 20:1 con un valor máximo en fase logarítmica de 37.09 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Los descensos son menores en las relaciones 80:1, 40:1 y 5:1, en las que los máximos también son menores (17.44, 19.67 y 21.40 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente). En los cultivos sin fósforo se obtuvieron contenidos máximos de ficocianina de 5.60 $\mu\text{g ml}^{-1}$. El análisis estadístico de estos resultados al final de la fase logarítmica de crecimiento reveló las siguientes diferencias significativas:

$$\text{Ficocianina } (\mu\text{g ml}^{-1}): 0 < 80 = 40 < 5 = 10 < 20$$

Relación entre los pigmentos

A partir de las concentraciones de cada pigmento, se calcularon las relaciones entre los mismos, expresándose en función de las media para cada fase de crecimiento en cada relación N/P y en los cultivos sin fósforo. La relación clorofila *a*/carotenoides totales (Figura 4.3.5a) es muy similar en ambas fases de crecimiento en todas las condiciones ensayadas, y tiende a mantenerse estable con todas las relaciones N/P ensayadas, obteniéndose valores menores en los cultivos sin fósforo.

La relación carotenoides totales/ficocianina aumenta en la fase estacionaria respecto a la fase logarítmica en todas las relaciones N/P ensayadas (Figura 4.3.5b). Durante la fase logarítmica esta relación tiende a descender al descender la relación

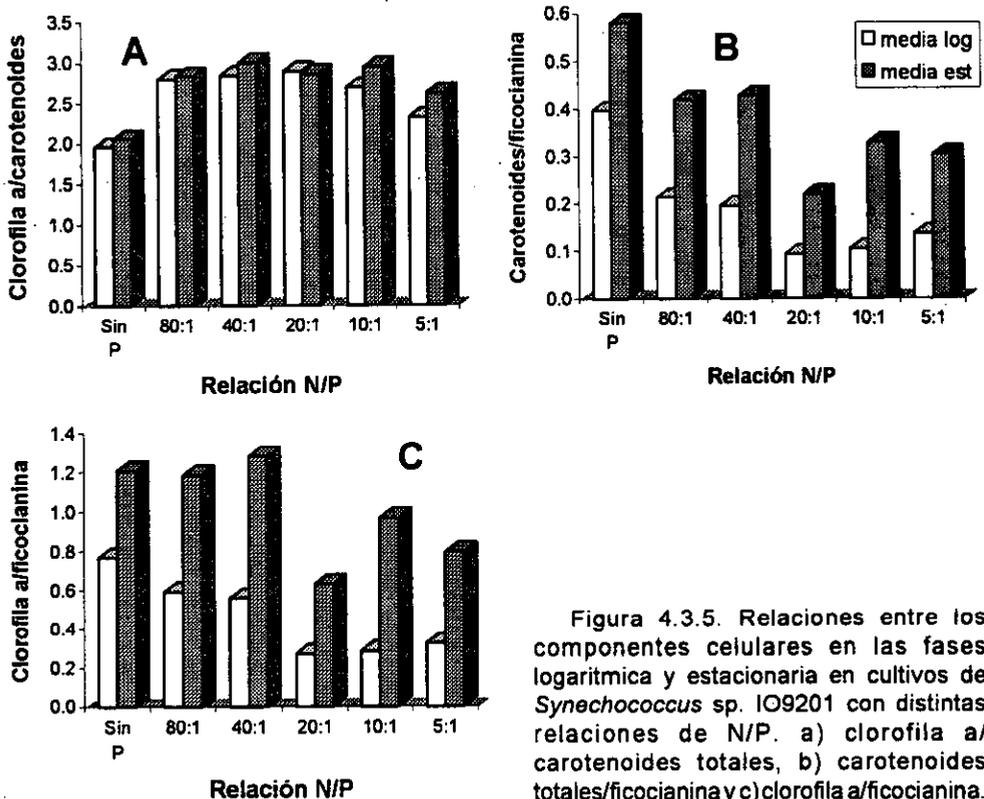


Figura 4.3.5. Relaciones entre los componentes celulares en las fases logarítmica y estacionaria en cultivos de *Synechococcus* sp. IO9201 con distintas relaciones de N/P. a) clorofila a/ carotenoides totales, b) carotenoides totales/ ficocianina y c) clorofila a/ ficocianina.

N/P hasta 20:1. En la fase estacionaria los máximos valores de esta relación se presentan en los cultivos con relaciones N/P 80:1 y 40:1 y el valor mínimo en la relación 20:1. En los cultivos sin fósforo se presentan los máximos valores de esta relación en ambas fases.

La relación clorofila *a*/ ficocianina (Figura 4.3.5c) muestra un comportamiento similar aunque en este caso se obtienen valores mayores en la relación anterior.

Protetnas

El contenido celular de proteínas tiende a descender con el desarrollo de los cultivos, con la excepción de los cultivos con fósforo (Figura 4.3.6a). Las máximas

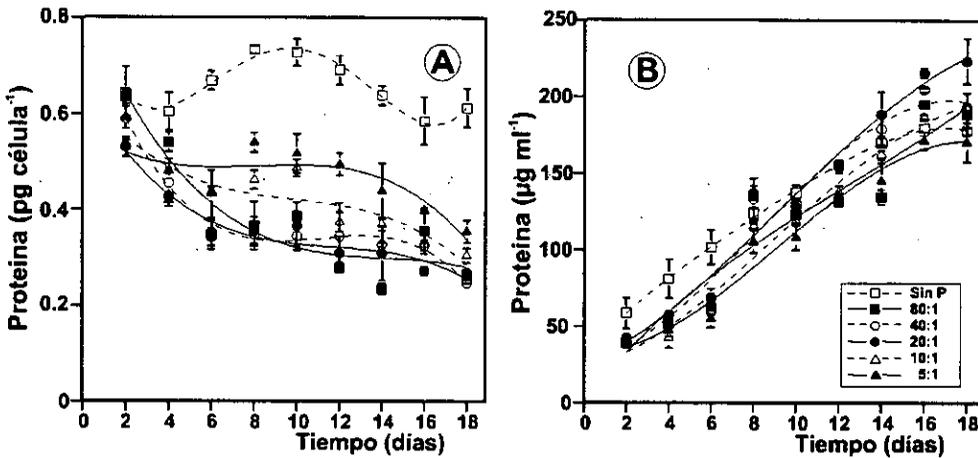


Figura 4.3.6. Contenido en proteínas durante el crecimiento de *Synechococcus* sp. 109201 cultivada con distintas relaciones N/P, expresado en: a) pg célula^{-1} , b) $\mu\text{g ml}^{-1}$ de cultivo.

concentraciones de proteína se producen en los cultivos sin fósforo ($0.73 \text{ pg célula}^{-1}$). Los cultivos con relaciones N/P 80:1, 40:1 y 20:1 presentan valores similares, entre 0.25 y $0.37 \text{ pg célula}^{-1}$, e inferiores a los de los cultivos con relaciones N/P 5:1 y 10:1 (0.30 a $0.54 \text{ pg célula}^{-1}$).

La producción de proteínas por volumen de cultivo (Figura 4.3.6b) aumenta durante el tiempo de cultivo, con valores muy similares para todas las relaciones N/P ensayadas. La máxima producción se obtiene en los cultivos con una relación N/P 20:1 con una producción de $223.73 \mu\text{g ml}^{-1}$. En los restantes cultivos los valores máximos se encuentran entre 170 y $193 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Carbohidratos

El contenido de carbohidratos, expresado en pg célula^{-1} , apenas varía durante el crecimiento ni con las distintas relaciones N/P (Figura 4.3.7a) aunque con tendencia a disminuir, excepto en los cultivos sin fósforo en los que los carbohidratos aumentan con el desarrollo del cultivo presentando el máximo al final de la fase estacionaria ($0.41 \text{ pg célula}^{-1}$).

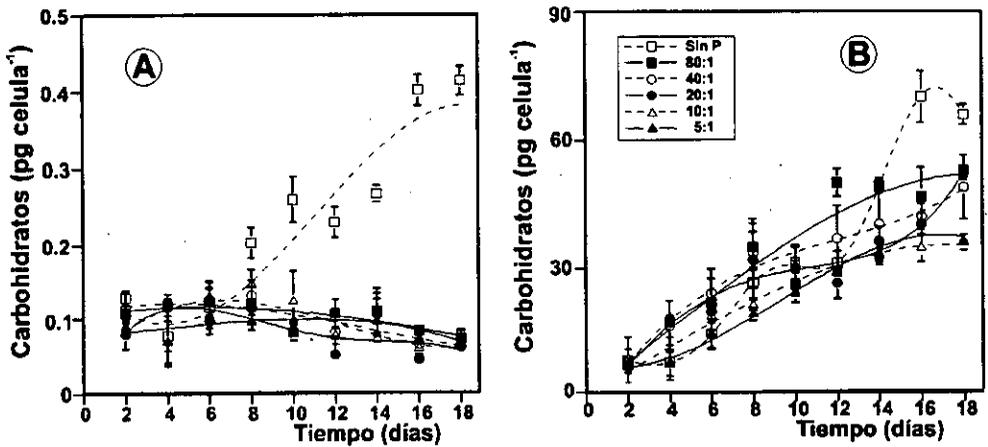


Figura 4.3.7. Contenido de carbohidratos durante el crecimiento de *Synechococcus* sp. IO9201 cultivado con distintas relaciones N/P, expresado en: a) pg célula^{-1} , b) $\mu\text{g ml}^{-1}$ de cultivo.

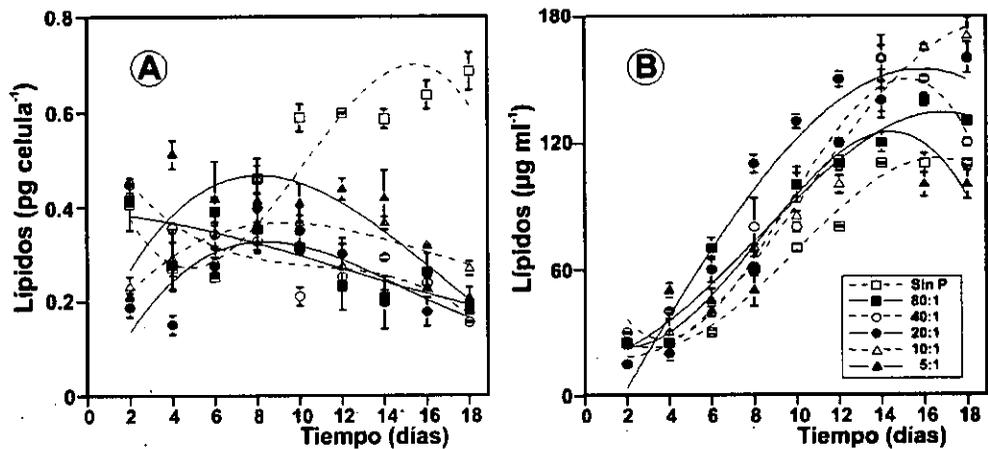


Figura 4.3.8. Contenido de lípidos durante el crecimiento de *Synechococcus* sp. IO9201 cultivado con distintas relaciones N/P, expresado en: a) pg célula^{-1} , b) $\mu\text{g ml}^{-1}$ de cultivo.

La producción de carbohidratos por unidad de volumen de cultivo es máxima en los cultivos sin fósforo, con $86.89 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Figura 4.3.7b), mientras que tiene valores muy similares en los cultivos con las distintas relaciones N/P.

Lípidos

El contenido celular de lípidos tiende a mantenerse prácticamente constante en todas las relaciones de N/P ensayadas, excepto en los cultivos sin fósforo donde se produce un aumento durante el crecimiento exponencial y se alcanzan valores estables y muy superiores (0.46 a 0.69 $\mu\text{g célula}^{-1}$) en la fase estacionaria con respecto a las restantes condiciones (Figura 4.3.8a).

La producción de lípidos por unidad de volumen de cultivo aumenta durante la fase logarítmica en las distintas relaciones N/P ensayadas (Figura 4.3.8b), con valores entre 80 y 150 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Cuando el crecimiento de la población se detiene la concentración de lípidos tiende a alcanzar valores relativamente estables en los cultivos con las diferentes relaciones (Figura 4.3.8b).

Relaciones entre las fracciones bioquímicas celulares

A partir de las concentraciones de cada componente, se calcularon las relaciones entre los mismos, expresándose en función de las medias para cada fase de crecimiento en cada condición N/P (Figura 4.3.9). La relación proteína/carbohidratos es mayor en la fase estacionaria excepto para los cultivos sin fósforo (Figura 4.3.9a). En la fase logarítmica los cultivos sin fósforo presentan un valor de 3.51; en los restantes cultivos la relación tiende a aumentar al disminuir la relación N/P, alcanzando el valor máximo en los cultivos con la relación N/P de 5:1 (4.85). En la fase estacionaria la relación proteína/carbohidratos aumenta al descender la relación N/P hasta 20:1, a partir de la cual los valores se mantienen estables entre 4.94 a 5.15. El valor mínimo se obtiene en los cultivos sin fósforo (1.47).

La relación lípidos/carbohidratos es similar en ambas fases de crecimiento excepto en los cultivos con relaciones N/P 10:1 y 5:1 y los cultivos sin fósforo (Figura 4.3.9b).

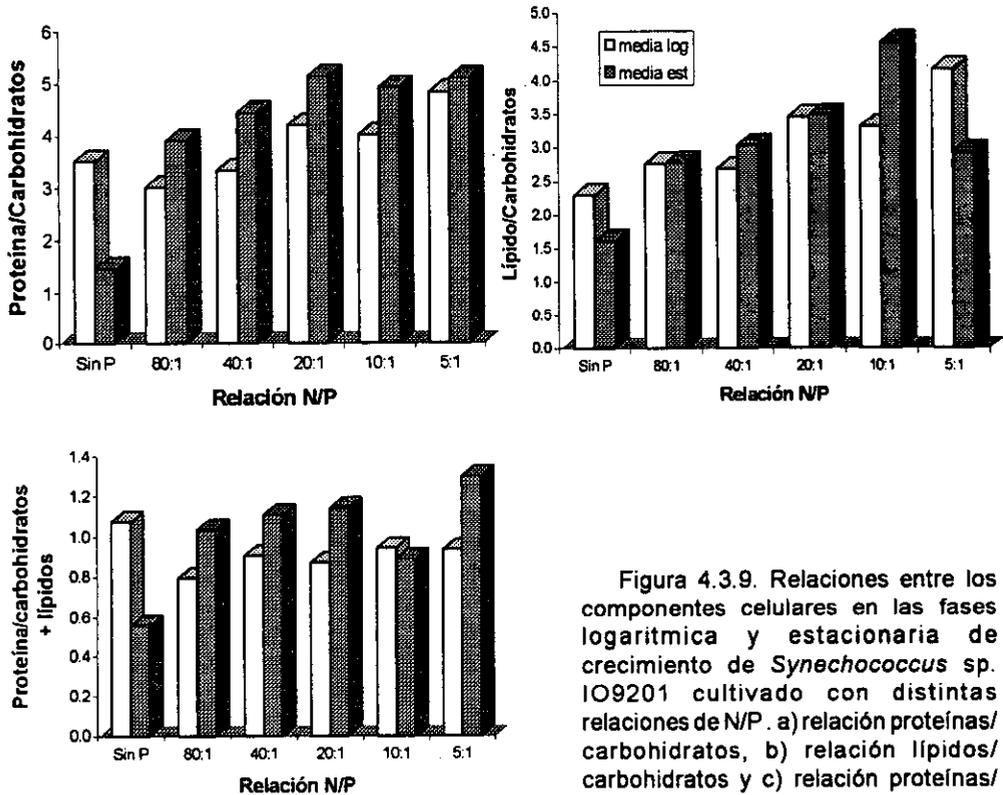


Figura 4.3.9. Relaciones entre los componentes celulares en las fases logarítmica y estacionaria de crecimiento de *Synechococcus* sp. IO9201 cultivado con distintas relaciones de N/P. a) relación proteínas/carbohidratos, b) relación lípidos/carbohidratos y c) relación proteínas/lípidos+carbohidratos.

La relación entre la proteína y los productos de reserva (carbohidratos y lípidos) (Figura 4.3.9c) es mayor en la fase estacionaria que en la logarítmica excepto en los cultivos con una relación N/P 10:1 y en los que no presentan fósforo). En la fase logarítmica todos los cultivos presentan valores similares de esta relación (0.80 a 0.94), a excepción de los cultivos sin fósforo que presentan un valor ligeramente mayor (1.07). En la fase estacionaria los cultivos sin fósforo presentan el menor valor de la relación (0.56) y los cultivos con la relación N/P 5:1, el valor mayor (1.29); el resto de los cultivos presentaron valores muy similares e intermedios, entre 0.90 y 1.1.

4.4.- EFECTO DE LA CALIDAD ESPECTRAL EN EL CRECIMIENTO Y PIGMENTACIÓN DE *Synechococcus* sp. IO9201.

Diseño experimental

Se ensayó el efecto de la calidad espectral de la luz sobre el crecimiento y la composición de pigmentos de *Synechococcus* sp. IO9201. Para ello se realizaron cultivos en condiciones controladas y con luz de diferentes longitudes de ondas (roja, azul y verde) obtenidas con tubos fluorescentes especiales (SILVANIA F18W/RED, BLUE AND GREEN). Para cada calidad espectral el flujo de densidad fotónico (medido con un luxómetro) se mantuvo constante a $58.5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, utilizando el factor de conversión citado por Ginzburg (1987).

La fuente de nitrógeno utilizada fue nitrato sódico, NaNO_3 , en una concentración de 8 mM y como fuente de fósforo, fosfato monosódico NaH_2PO_4 , manteniendo en todos los casos la relación N/P 20:1. Los restantes nutrientes que componen el medio de cultivo corresponden a los que se citan en el apartado de "Cultivo".

Los cultivos se adaptaron a cada una de las calidades espectrales a ensayar durante siete días antes del inicio de cada experimento, realizándose tres réplicas para cada calidad espectral.

Las experiencias se realizaron en botellas de un litro con 900 ml de medio cultivo. Las condiciones de temperatura y salinidad corresponden a las de los cultivos "stock". Los inóculos se toman a partir de un único cultivo "stock" en fase exponencial, adicionando el volumen necesario para obtener una densidad celular inicial de 50×10^6 células ml^{-1} en cada una de las experiencias realizadas.

El desarrollo de los cultivos se sigue hasta que éstos alcanzan la fase de crecimiento estacionaria, midiéndose diariamente la densidad celular y el contenido de pigmentos (clorofila α , carotenoides totales y ficobiliproteínas).

Crecimiento

Las curvas de crecimiento de *Synechococcus* sp. IO9201, expresadas en función de la densidad celular frente al tiempo, con las diferentes calidades de luz muestran diferencias en el crecimiento en función de la longitud de onda de la luz utilizada (Figura 4.4.1). El mejor crecimiento se obtuvo en los cultivos con luz blanca; las células expuestas a la luz roja y verde presentaron un crecimiento similar y superior al obtenido con la luz azul.

Las máximas densidades celulares en la fase estacionaria de crecimiento se obtuvieron en los cultivos con luz blanca (967×10^6 células ml^{-1}). En los cultivos con luz roja y luz verde se obtuvieron valores similares (246.3×10^6 y 248×10^6 células ml^{-1} , respectivamente). La menor densidad celular se obtuvo en los cultivos con luz azul (129×10^6 células ml^{-1}).

El crecimiento se ajusta a una función logística en todos los casos, con r^2 siempre mayor de 0.96. Los parámetros de la función logística, junto con las tasas

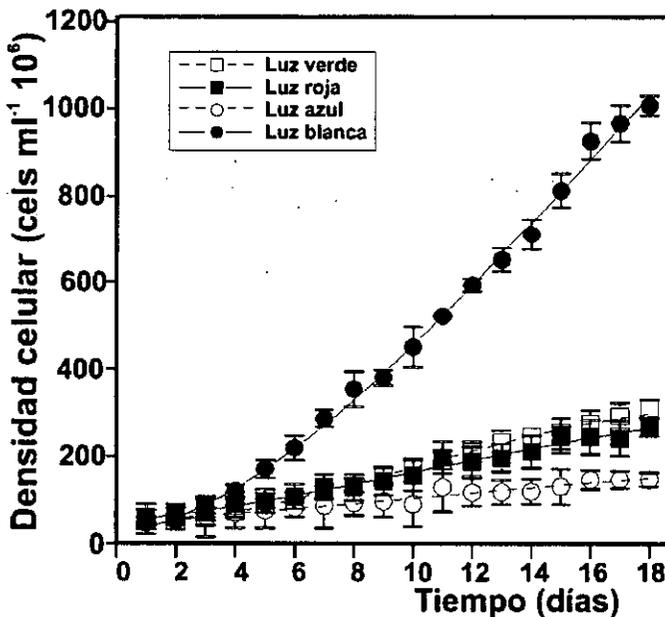


Figura 4.4.1.- Crecimiento de *Synechococcus* sp. IO9201 cultivado con distintas calidades espectrales de luz.

Tabla 4.4.1. Parámetros de la función logística y tasa de crecimiento media (μ_{med}) en los cultivos de *Synechococcus* sp. IO9201 con diferentes longitudes de onda.

Tipo de luz	k	z	r ²	μ_{med}
roja	375.2	0.16	0.99	0.18
azul	222.3	0.11	0.96	0.14
verde	372.6	0.20	0.99	0.21
blanca	1260	0.54	0.99	0.37

de crecimiento medias en la fase exponencial (μ_{med}) para las distintas calidades espectrales se representan en la Tabla 4.4.1. La mayor capacidad de carga (k) se obtiene para los cultivos con luz blanca; los cultivos con luz roja y verde presentan valores similares (375.2 y 372.6, respectivamente), y el menor valor (22.3) se obtiene en los cultivos con luz azul. El valor de k para los cultivos con luz blanca es tres veces mayor que para los de luz roja y verde y cinco veces mayor que para los de luz azul.

La menor tasa de crecimiento media (μ_{med}) se obtuvo para los cultivos expuestos a la luz azul (0.14 doblajes día⁻¹), mientras que los cultivos con luz roja y verde presentan valores similares (0.18 y 0.21 doblajes día⁻¹, respectivamente). La mayor tasa de crecimiento media se obtiene asimismo en los cultivos con luz blanca, con valores de 0.37 doblajes día⁻¹.

El análisis estadístico de los datos de la densidad celular mediante un ANOVA y el test de Duncan ($p < 0.05$) teniendo en cuenta el último día de la fase logarítmica de crecimiento indica que los cultivos con luz verde y roja no presentan diferencias significativas entre sí. Sin embargo, éstos dos difieren significativamente de los cultivos con luz blanca, que presentan valores superiores. Los cultivos con luz azul difieren significativamente de las anteriores calidades de luz, presentando los menores valores de densidad celular.

Peso seco

Los valores del peso seco celular al final de la fase logarítmica fueron muy similares en las células cultivadas con luz verde, roja y azul (1.65, 1.81 y 1.95 mg ml⁻¹, respectivamente), mientras que este valor es menor en las células cultivadas con luz blanca (1.29 mg ml⁻¹) (Figura 4.4.2).

La producción de biomasa por volumen de cultivo, expresada en mg ml⁻¹, al final de la fase logarítmica (Figura 4.4.2) fue mayor en los cultivos con luz blanca (1.01 mg ml⁻¹). Los cultivos con luz verde y roja presentan valores semejantes (0.40 y 0.42 mg ml⁻¹, respectivamente), mientras que los cultivos expuestos a la luz azul alcanzan un valor menor (0.25 mg ml⁻¹).

Pigmentos fotosintéticos

Clorofila a y carotenoides totales

La concentración celular tanto de clorofila *a* como de carotenoides totales, expresada en pg célula⁻¹ (Figura 4.4.3a y 4.4.4a, respectivamente) varía poco en las distintas fases del cultivo para todas las condiciones ensayadas. Los mayores valores

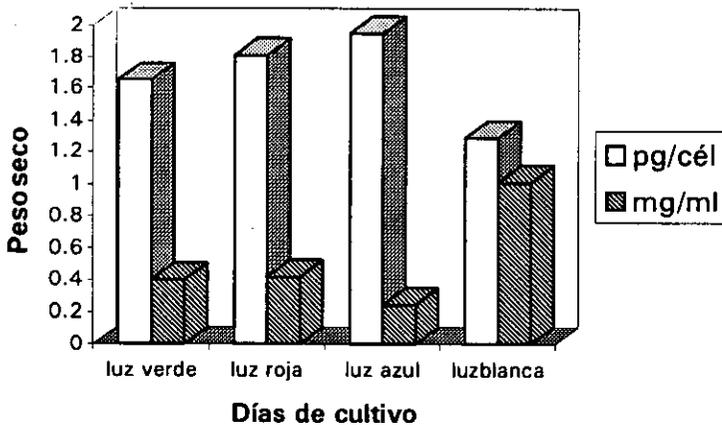


Figura 4.4.2.- Biomasa en peso seco de *Synechococcus* sp. IO9201 cultivado con distintas calidades de luz en el último día de la fase logarítmica.

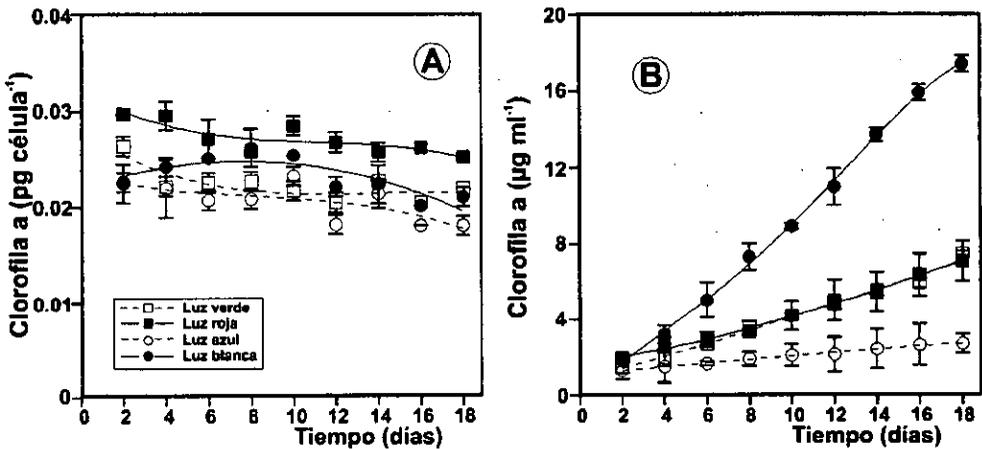


Figura 4.4.3.- Concentración de clorofila a en cultivos de *Synechococcus* sp. IO9201 con diferentes calidades de luz, expresado en: a) pg célula⁻¹ b) µg ml⁻¹.

de clorofila a por célula se obtienen en los cultivos con luz roja, con valores entre 0.025 y 0.03 pg célula⁻¹, durante todo el tiempo de cultivo. En los cultivos expuestos a la luz azul se obtienen valores ligeramente menores de clorofila a durante todo el tiempo de cultivo (entre 0.018 y 0.020 pg célula⁻¹). Con las restantes calidades espectrales se obtienen valores similares de clorofila a. Por el contrario, en el caso de los carotenoides los cultivos expuestos a la luz azul son los que presentaron las mayores concentraciones celulares, con un valor máximo de 0.013 pg célula⁻¹ al final de la fase logarítmica de crecimiento. Las concentraciones de clorofila a son mayores a lo largo del ciclo de crecimiento que los carotenoides totales.

La producción de clorofila a y de carotenoides totales por unidad de volumen aumenta a medida que avanza la edad de los cultivos en todas las longitudes de onda ensayadas y los valores máximos se obtienen al final de la fase estacionaria (Figura 4.4.3b y 4.4.4b, respectivamente). En los cultivos con luz blanca se obtuvieron las concentraciones más elevadas de clorofila a y carotenoides totales al final del crecimiento, con valores de 17.44 y 6.34 µg ml⁻¹, respectivamente. En los cultivos con luz verde y roja se obtienen valores de 7.46 µg ml⁻¹ y 7.08 µg ml⁻¹, respectivamente, para la clorofila a y de 3.03 y 2.54 µg ml⁻¹ para los carotenoides totales,

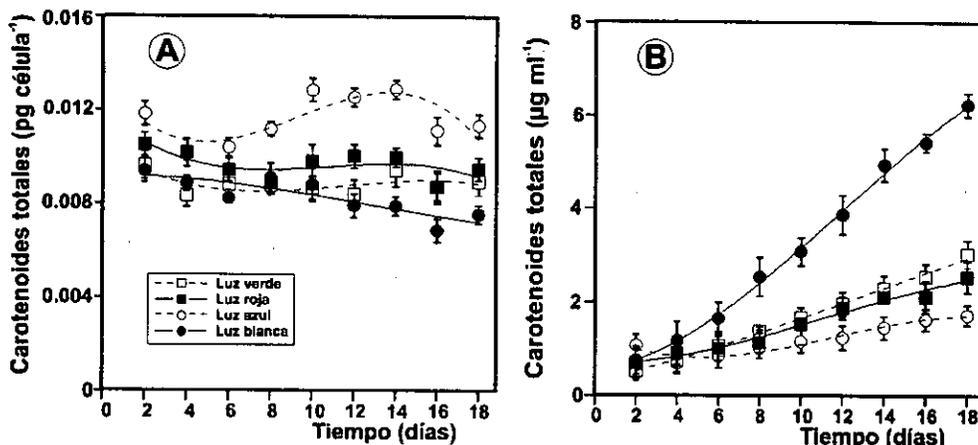


Figura 4.4.4.- Concentración de carotenoides totales en cultivos de *Synechococcus* sp. IO9201 con diferentes calidades de luz, expresado en: a) pg célula⁻¹ b) µg ml⁻¹.

respectivamente. Las menores producciones de estos pigmentos se obtienen en los cultivos con luz azul.

Ficocianina

El contenido celular de ficocianina, expresado en pg célula⁻¹, varía en función de la luz utilizada y del momento del cultivo (Figura 4.4.5 a). En las células expuestas a luz blanca y roja el contenido celular de ficocianina aumenta al inicio de la fase logarítmica, obteniéndose un máximo en los días 6 y 8, respectivamente, y descendiendo a continuación. Los máximos valores de ficocianina en las células de *Synechococcus* sp. IO9201 expuestas a luz blanca y luz roja son 0.15 y 0.07 pg célula⁻¹, respectivamente. En los cultivos con luz azul y verde, los contenidos celulares de ficocianina son mínimos; en las células expuestas a luz verde el contenido de ficocianina desciende con el tiempo de cultivo, mientras en los cultivos con luz azul se mantiene constante.

La producción de ficocianina, expresada en µg ml⁻¹ con respecto al tiempo de cultivo se representa en la figura 4.4.5b. Las células expuestas a la luz blanca presentan valores mayores con respecto al resto de las calidades de luz, alcanzando

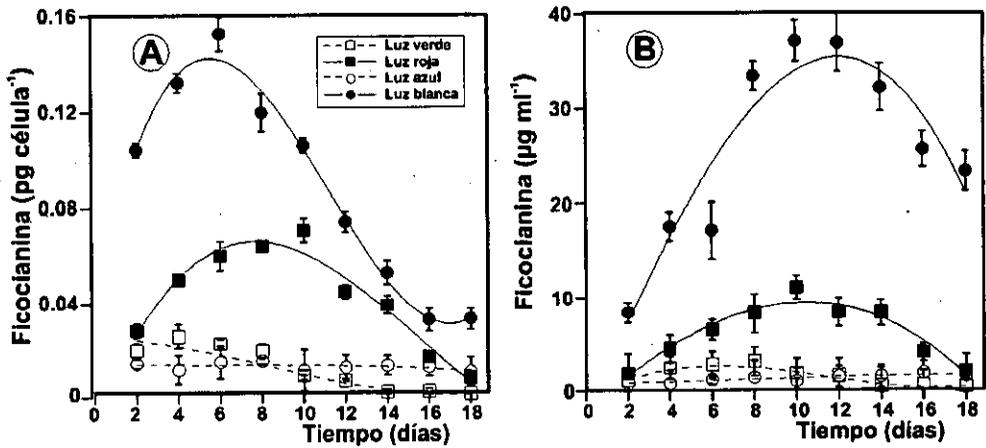


Figura 4.4.5.- Concentración de ficocianina en cultivos de *Synechococcus* sp. IO9201 con diferentes calidades de luz, expresado en: a) pg célula⁻¹ b) µg ml⁻¹.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en el contenido de pigmentos por volumen de cultivo reveló diferencias significativas entre las calidades de luz ensayadas:

clorofila a (µg ml⁻¹): blanca > verde = roja < azul

carotenoides totales (µg ml⁻¹): blanca > verde = roja < azul

ficocianina (µg ml⁻¹): blanca > roja > verde = azul

Si comparamos los resultados obtenidos en la cantidad de pigmentos por célula al final de la fase logarítmica de crecimiento mediante el análisis estadístico aplicado anteriormente, se muestran diferencias significativas entre las distintas calidades de luz ensayadas:

Clorofila a (pg célula⁻¹): roja > blanca = verde > azul

Carotenoides (pg célula⁻¹): verde = roja = blanca < azul

Ficocianina (pg célula⁻¹): blanca > roja > azul = verde

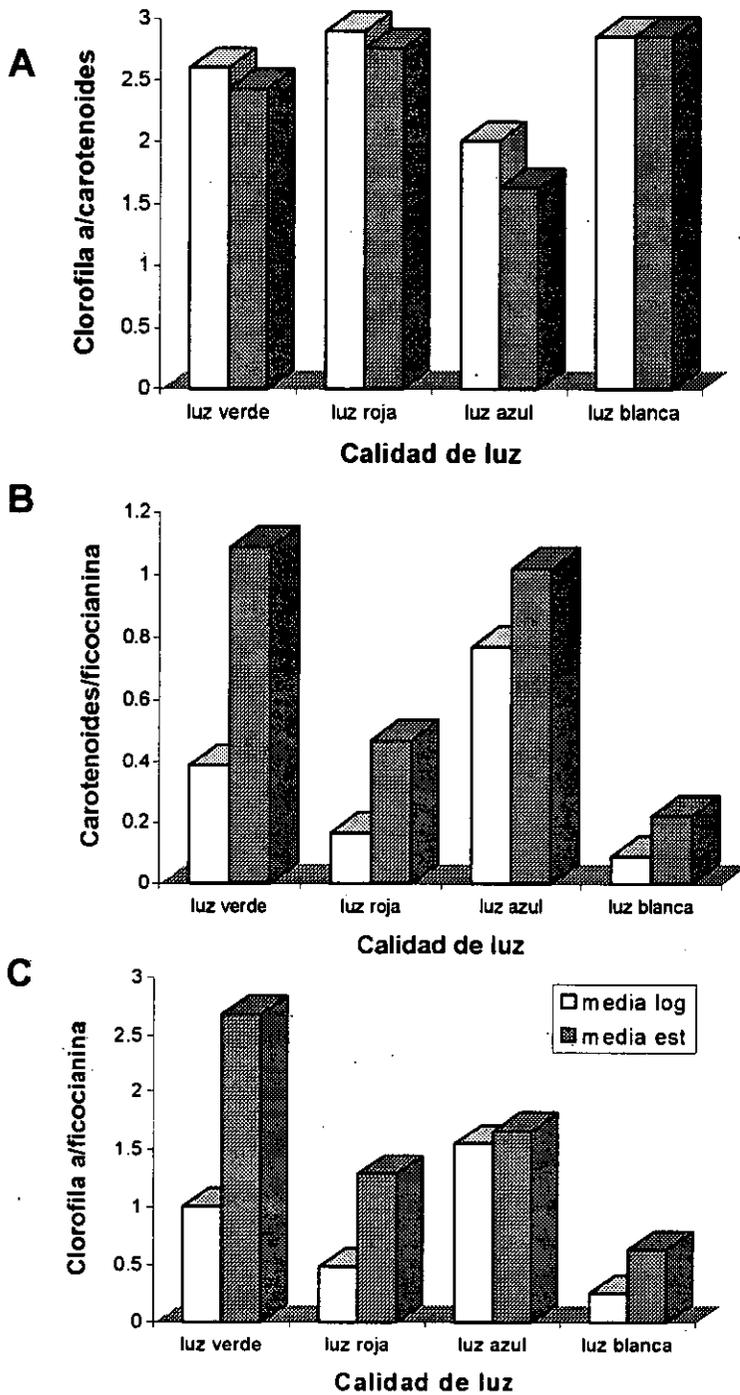


Figura 4.4.6. Relaciones entre los componentes celulares en las fases logarítmica y estacionaria de crecimiento de *Synechococcus* sp. IO9201 cultivado con calidades de luz. a) clorofila a/carotenoides totales, b) carotenoides totales/ficocianina y c) clorofila a/ficocianina.

Relación entre los pigmentos

A partir de las concentraciones de cada pigmento, se calcularon las relaciones entre los mismos, expresándose en función de las medias para cada fase de crecimiento en cada calidad de luz ensayada. La relación clorofila a/carotenoides presenta valores muy similares para los cultivos con luz verde, roja y blanca tanto en la fase logarítmica como en la estacionaria. De igual forma, los cultivos expuestos a la luz azul presentaron valores menores en ambas fases (Figura 4.4.6a).

La relación carotenoides/ficocianina aumenta en la fase estacionaria respecto a los valores obtenidos en la fase logarítmica en todas las calidades de luz ensayadas (Figura 4.4.6b). Los valores de esta relación en la fase logarítmica se ven afectados por la calidad de la luz, los cultivos expuestos a la luz azul presentan los valores mayores y los cultivos con luz blanca los menores. La relación carotenoides totales/ficocianina en la fase estacionaria presenta el máximo en los cultivos con luz verde; valores relativamente similares se presentan en los cultivos con luz roja y azul, y menores en la luz blanca. La relación clorofila a/ficocianina presenta un patrón similar (Figura 4.4.6c).

4.5.- COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE LA BIOMASA LIOFILIZADA DE *Synechococcus* sp. IO9201.

Diseño experimental

Se realizaron cultivos de *Synechococcus* sp. IO9201 en matraces de 6 litros. La fuente de nitrógeno utilizada fue nitrato sódico a una concentración de 8 mM de nitrógeno y una relación de N/P de 20:1, que son las condiciones de máxima producción de ficocianina. Los restantes nutrientes así como las condiciones de cultivo corresponden a las descritas en el apartado de "Cultivo". Cuando los cultivos se encuentran en fase logarítmica se retira la biomasa por centrifugación, se congela y liofiliza. Se caracteriza la biomasa determinando carbono total, nitrógeno total, hidrógeno total, cenizas, carbohidratos, lípidos totales y fraccionamiento de sus componentes; ficocianina, clorofila *a* y carotenoides totales.

Resultados

La tabla 4.5.1 muestra la composición bioquímica, expresada en porcentaje de peso seco, de la biomasa liofilizada de *Synechococcus* sp. IO9201. El componente principal de esta biomasa es la proteína, que supone más del 50% del peso seco. Los principales productos de reserva son los lípidos, que constituyen el 18% de la biomasa seca, mientras que los carbohidratos constituyen sólo el 3.69%. El fraccionamiento de los lípidos muestra que la mayor proporción corresponde a los galactolípidos, seguidos de los fosfolípidos y los lípidos neutros, éstos dos últimos con valores próximos entre sí.

En cuanto a los pigmentos, los carotenoides totales suponen un mínimo porcentaje de la biomasa seca (0.05%), mientras que las clorofilas representan el 0.39% de la biomasa seca. El pigmento mayoritario fue la ficocianina, que supone un 4.40% de la biomasa seca en estas condiciones de cultivo.

Tabla 4.5.1. Composición bioquímica de células liofilizadas de *Synechococcus* sp. IO9201.

Componentes	% de peso seco *
C	37.26 ± 0.160
N	8.66 ± 1.045
H	6.53 ± 0.091
Proteínas (derivado del contenido de N)	50.23 ± 0.2
Carbohidratos	3.69 ± 4.0
Lípidos totales	18.00 ± 0.0
Lípidos neutros	3.60 ± 0.0
Galactolípidos	6.33 ± 0.0
Fosfolípidos	4.17 ± 0.0
Ficocianina	4.40 ± 0.0
Clorofila a	0.39 ± 2.2
Carotenoides totales	0.05 ± 0.3
Cenizas	17.94 ± 0.1

* Corresponde a los valores medios ± desviaciones estándares.

4.6.- PROCESO DE PURIFICACIÓN DE LA FICOCIANINA

Evaluación de resinas de cromatografía de interacción hidrofóbica

La cromatografía de interacción hidrofóbica se utilizó para la purificación de la ficocianina de *Synechococcus* sp. IO9201, aunque previamente se realizó un experimento con el fin de escoger la resina más adecuada para el trabajo específico con el pigmento-proteína. Se ensayaron los tres grupos hidrofóbicos comúnmente utilizados: butil sefarosa, octil sefarosa y fenil sefarosa (Butyl Sepharose 4-Fast Flow, Octyl Sepharose CL-4B y Phenyl Sepharose 6 Fast Flow, Pharmacia), para seleccionar el que permita no sólo una mejor separación sino también una mayor recuperación del pigmento-proteína.

Para la selección de la resina se utilizó un extracto crudo de ficocianina de *Synechococcus* sp. IO9201 extraído por congelación y descongelación a 4°C utilizando fase alcalina como solución de extracción, por ser el método y la solución de extracción más efectivos (Tablas 4.1.1 y 4.1.2). Este extracto se diluyó con tampón TRIS-HCl 0.05 M a pH7, comenzando las experiencias con una densidad óptica a 620 nm de 0.73.

Se colocaron en tres tubos de ensayo 0.5 ml de cada tipo de resina, éstas se equilibraron con tampón TRIS-HCl 0.05M, pH 7 con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 M; y se centrifugaron a 700 g durante 2 minutos, eliminando el sobrenadante. A cada una de las resinas se le añadieron 2 ml del extracto de ficobiliproteínas con sulfato de amonio 0.5 M, agitándose suavemente durante 10 minutos. En esta primera fase se logró la adsorción del pigmento en las resinas cuya eficiencia se deseaba determinar.

Para evaluar la recuperación del pigmento, a cada uno de los tubos se añadieron concentraciones decrecientes de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.5, 0.25, 0.125 y 0 M) preparado en solución tamponada de TRIS-HCl 0.05 M, pH 7. Cada uno de los

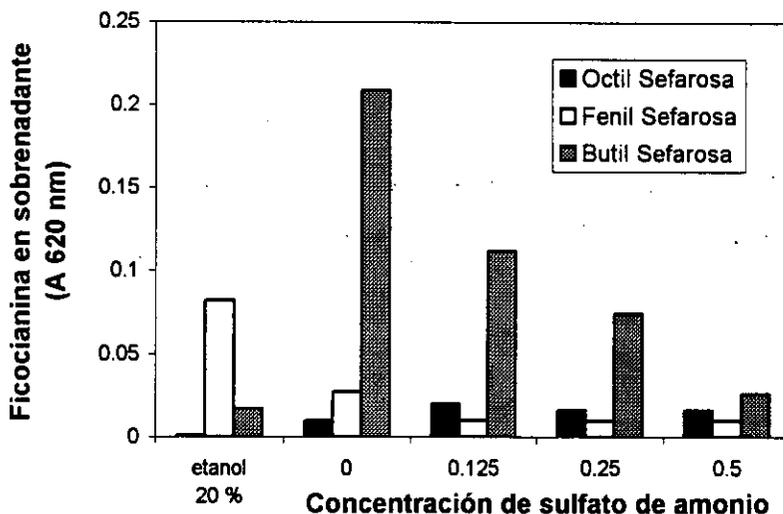


Figura 4.6.1. Absorción de ficocianina obtenida de *Synechococcus* sp. IO9201 por diferentes resinas de cromatografía interacción hidrofóbica en concentraciones decrecientes de sulfato de amonio.

tubos se mezcló lentamente durante 10 minutos y se centrifugó a 700g durante 2 minutos. La misma operación se repitió finalmente con etanol al 20% en tampón 0.05 M TRIS-HCl, pH 7 con el fin de alcanzar mayor recuperación del pigmento-proteína. Los sobrenadantes obtenidos en cada una de las resinas con las distintas soluciones se miden espectrofotométricamente.

Los valores de absorción a 620 nm de la ficocianina de *Synechococcus* sp. IO9201 eluída con distintas concentraciones de sulfato de amonio en cada una de las resinas ensayadas se representan en la figura 4.6.1. Con una concentración 0.5 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ la mayor recuperación se obtiene con la butil sefarosa (3.56 %), aumentando la recuperación con esta resina en las concentraciones decrecientes sulfato amónico, 0.25 M (10.1 %), 0.125 M (15.34 %) y 0 M (28.5%), dando un valor total de recuperación del 60 %, mientras que en las otras dos resinas ensayadas la recuperación fue inferior al 20 %.

Los datos obtenidos con la fenil y octil sefarosa indican que su utilización no es adecuada para la purificación de esta biliproteína, puesto que la proteína queda muy fuertemente enlazada a la resina y su recuperación es muy escasa, alcanzándose

sólo un 19 y 8.9% de recuperación, respectivamente. Con la fenil sefarosa la mayor recuperación se obtuvo con la fase de etanol al 20%, y con la octil sefarosa con la solución 0.125 M de sulfato de amonio en tampón TRIS-HCl 0.05 M, pH 7.

Cromatografía de interacción hidrofóbica

Una vez seleccionada la resina más adecuada para la recuperación del pigmento-proteína, se procede a su purificación mediante la cromatografía de interacción hidrofóbica. Se utiliza un extracto crudo de ficocianina extraído de *Synechococcus* sp. IO9201 por congelación y descongelación a 4°C utilizando fase alcalina como solución de extracción. Este extracto se diluyó con tampón TRIS-HCl 0.05 M a pH 7, hasta obtener una densidad óptica a 620 nm de 0.73.

Para la purificación, el extracto del pigmento-proteína se cromatógrafió en una columna de butil sefarosa con las condiciones citadas en Material y Métodos. La recuperación del pigmento-proteína se realizó reduciendo la fuerza iónica de la fase móvil en los sistemas por gradiente o mediante sistemas isocrático. Se ensayaron cinco condiciones experimentales con respecto a las condiciones de elución, a fin de determinar la más eficiente para la purificación y recuperación de la ficocianina:

- sistema de gradiente partiendo de 0.5 M hasta 0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Las soluciones se realizan en tampón TRIS-HCl 0.05M, pH 7.
- sistema de gradiente de 0.5 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en tampón TRIS-HCl 0.05M, pH 7 a 0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en tampón TRIS - HCl 0.05 M, pH 7; esta última solución contiene 50% de etanol.
- sistema isocrático utilizando como fase móvil tampón 0.05 M TRIS-HCl, pH 7, con 25% de etanol.
- sistema isocrático desplazando el pigmento con una solución de 10% de etanol en tampón 0.05 M de TRIS-HCl, pH 7.

- sistema isocrático en solución amortiguadora de 0.05 M TRIS-HCl, pH 7 como fase móvil.

En cada caso, se aplicaron a la columna 20 ml de extracto crudo de ficocianina con 0.5 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y se lavan a continuación con el tampón inicial. Se caracterizaron todas fracciones eluidas a través de sus espectros de absorción medidos en un espectrofotómetro (PERKIN-ELMER Lambda 5) en el intervalo de 280 a 700 nm.

La pureza específica de la proteína se calculó después de cada cromatografía como la relación entre el pico máximo de absorción en la región visible (620 nm) y el de la región UV (280 nm).

La regeneración de la columna se efectuó después de cada cromatografía mediante el lavado con NaOH 0.5 M, seguido con agua destilada y tampón 0.05M TRIS-HCl, pH 7, acondicionando la columna finalmente con tampón en las mismas condiciones que el extracto de ficocianina. El volumen utilizado para cada una de las fases fue 50 ml, a un flujo de 2 ml min^{-1} .

Los resultados obtenidos en las cinco cromatografías realizadas en la columna de butil sefarosa, con diferentes sistemas de elución y fase móvil, se resumen en la tabla 4.6.1. Los valores de pureza de la proteína, estimada a partir de la relación de $A_{620}/A_{280} \text{ nm}$, fueron bastante similares, aunque el valor mayor (3.8) se obtuvo cuando se utilizó en la elución del pigmento-proteína el sistema de gradiente de 0.5 M a 0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en tampón TRIS-HCl 0.05 M, pH 7. Sin embargo, el porcentaje de recuperación en este caso fue bajo (43.1%) respecto a las restantes condiciones de elución (60.7-72.4%), aún cuando éstas tuvieron menores valores de pureza; esto indica que una parte considerable de la muestra cargada quedó enlazada a la matriz, por lo que no resulta el sistema más adecuado para este tipo de biliproteína.

El porcentaje de recuperación en los sistemas isocráticos fue entre 61.2 y 72.2%. El sistema isocrático cuya fase móvil fue tampón TRIS-HCl 0.05 M, pH 7

Tabla 4.6.1. Sistemas de elución, fase móvil y datos obtenidos en los distintos ensayos de purificación de la ficocianina de *Synechococcus* sp. IO9201 mediante cromatografía de interacción hidrofóbica en una columna de butil sefarosa, en diferentes condiciones experimentales.

Sistema de elución	Fase móvil	Relación (A_{620}/A_{280})	Recuperación de FC (%)
gradiente	0.5-0 M de $(NH_4)_2SO_4$ en tampón TRIS-HCl 0.05 M pH7	3.8	43.1
gradiente	0.5 M de $(NH_4)_2SO_4$ a 0 M de $(NH_4)_2SO_4$ con 50% de etanol	2.9	60.7
isocrático	tampón TRIS-HCl 0.05 M pH7 con 25 % de etanol	2.8	61.2
isocrático	tampón TRIS-HCl 0.05 M pH7	3.1	64.5
isocrático	tampón TRIS-HCl 0.05 M con 10% de etanol.	3.1	72.2

con un 10% de etanol fue el escogido finalmente para realizar la elución de la proteína en este paso del proceso de purificación, ya que presentó el mayor porcentaje de recuperación (72.2%).

Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía de intercambio iónico se seleccionó como segunda alternativa de purificación del pigmento-proteína. Se utilizó una columna de Q-sefarosa con las condiciones previamente descritas en Material y Métodos. El extracto aplicado a la columna fue la fracción eluida en la cromatografía de interacción hidrofóbica mediante un sistema isocrático con tampón TRIS-HCl 0.05 M, pH 7 con 10% de etanol, previamente dializado en dicho tampón.

La elución de las muestras aplicadas a la columna se realizó mediante un sistema de gradiente, aumentando la fuerza iónica de la fase móvil, o con sistemas

Tabla 4.6.2. Sistemas de elución, fase móvil y datos obtenidos en los distintos ensayos de purificación de la ficocianina de *Synechococcus* sp. IO9201 mediante cromatografía de intercambio iónico en una columna de Q-sefarosa en diferentes condiciones experimentales.

Sistema de elución	Fase móvil	Relación (A_{620}/A_{280})	Recuperación de FC (%)
Gradiente	0-0.4 M NaCl en tampón TRIS-HCl 0.05M, pH 7	4.1	34.7
Isocrático	0.2 M NaCl en tampón TRIS-HCl 0.05 M pH7	4.2	45.8
Isocrático	Carga de extracto de FC en tampón acetato 50 mM, pH5. Elución con 0.2 M NaCl en tampón 0.05 M TRIS-HCl, pH 7	4.5	46.2

isocráticos. Para la evaluación de la eficiencia de purificación utilizando la cromatografía de intercambio iónico en Q-sefarosa se ensayaron tres condiciones de elución diferentes:

- sistema de gradiente de 0 a 0.4 M de NaCl, las soluciones se realizaron en tampón TRIS-HCl 0.05 M, pH 7.
- sistema isocrático con tampón TRIS-HCl 0.05 M, pH 7 con 0.2 M NaCl como fase móvil.
- sistema isocrático donde se equilibró la columna con tampón acetato 50 mM, pH 5 y se aplicó la muestra previamente dializada en dicho tampón; a continuación se lavó la columna, primero con tampón acetato, pH 5 y después con tampón TRIS-HCl 0.05 M, pH 7; la muestra se eluyó en tampón TRIS-HCl 0.05 M, pH 7 con 0.2 M NaCl como fase móvil.

Tanto en la cromatografía de interacción hidrofóbica como en la cromatografía de intercambio iónico el flujo utilizado fue de 2 ml min^{-1} y las soluciones tamponadas contenían 0.05% de azida sódica para evitar cualquier posible contaminación. La regeneración de la columna se realizó con el mismo procedimiento que en la

cromatografía de interacción hidrofóbica.

Los resultados obtenidos en las cinco cromatografías realizadas en la columna de Q-sefarosa, con diferentes sistemas de elución y fase móvil, se presentan en la tabla 4.6.2.

La pureza de la ficocianina, estimada a partir de la relación A_{620}/A_{280} , en el sistema de gradiente de 0 a 0.4 M NaCl en tampón TRIS-HCl 0.05 M a pH 7, fue de 4.1, ligeramente inferior a la obtenida en los otros dos sistemas isocráticos; el porcentaje de recuperación también fue menor (34.7%) con respecto a las restantes condiciones ensayadas. Los resultados de este sistema de gradiente mostraron que aproximadamente a una concentración de 0.2 M de cloruro sódico comenzaba la elución de la biliproteína de Q-sefarosa, por lo que fue la concentración utilizada para los sistemas isocráticos ensayados posteriormente.

En los dos sistemas isocráticos la elución de la ficocianina se realizó con 0.2 M de NaCl en tampón TRIS-HCl 0.05 M, pH 7, pero la carga del extracto se efectuó en condiciones diferentes. En el primer sistema el extracto estaba en el mismo tampón de elución. Sin embargo, en el segundo sistema se cargó el extracto en tampón acetato 50 mM, pH 5 y se eluyó el pigmento-proteína en tampón TRIS-HCl 0.05 M, pH 7 con 0.2 M de NaCl. En este último sistema se obtuvo la mayor pureza (4.5) y el mayor porcentaje de recuperación de la ficocianina (46.2%).

Purificación del extracto de ficobiliproteínas mediante cromatografía de interacción hidrofóbica y cromatografía de intercambio iónico

Tras los resultados de las experiencias de purificación realizadas con la cromatografía de interacción hidrofóbica y cromatografía de intercambio iónico se procedió a la purificación de 100 ml del extracto crudo de biliproteína de *Synechococcus* sp. IO9201 diluido con tampón TRIS-HCl 0.05M a pH 7, hasta obtener una absorbancia de 1.1 medida espectrofotométricamente a 620 nm.

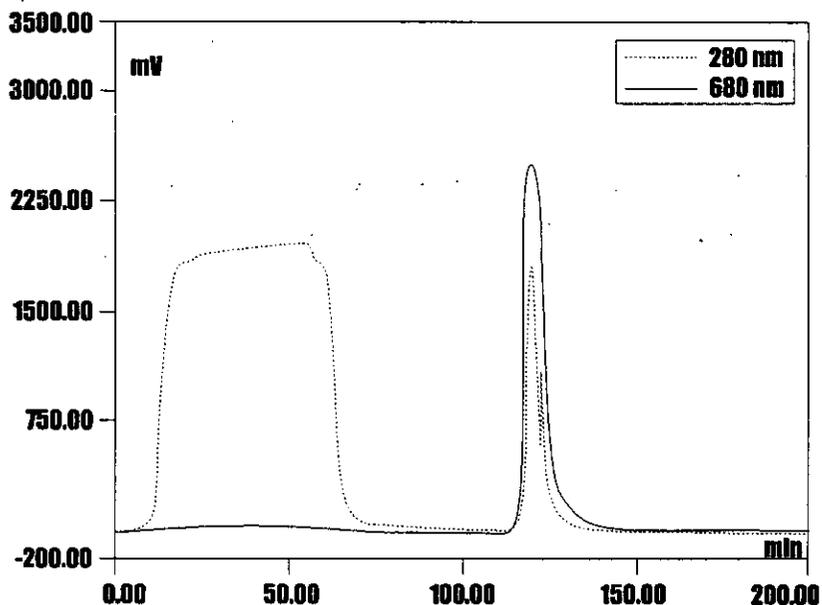


Figura 4.6.2.- Cromatograma obtenido en la cromatografía de interacción hidrofóbica con la resina butil sefarosa de la fracción de ficocianina de *Synechococcus* sp. IO9201.

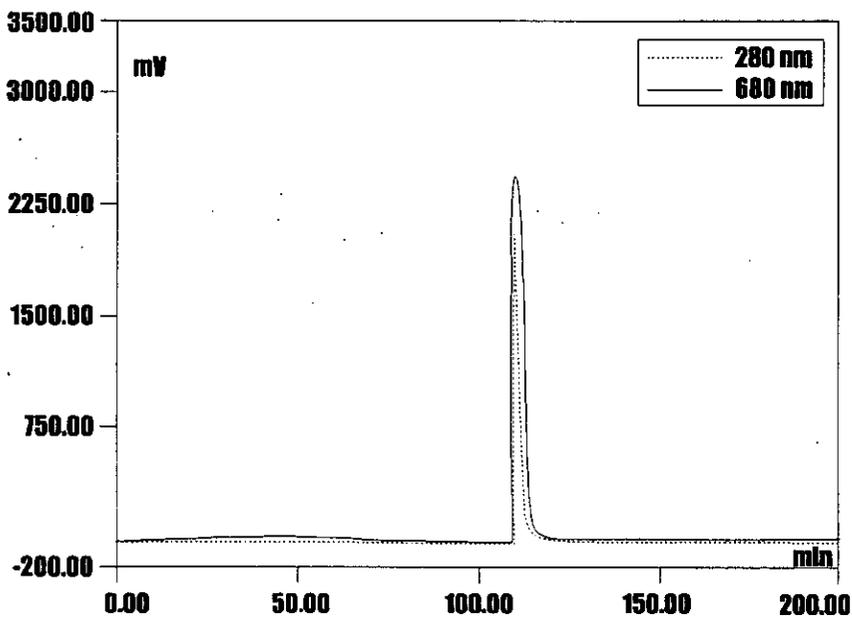


Figura 4.6.3.- Cromatograma obtenido en la cromatografía de columna de intercambio iónico con Q-sefarosa de la fracción de ficocianina de *Synechococcus* sp. IO9201.

La cromatografía de interacción hidrofóbica se realizó en una columna (Pharmacia XK 26) de 20 ml de butil sefarosa equilibrada en tampón TRIS-HCl 0.05M a pH 7 con 0.5 M de sulfato de amonio. Se aplicaron los 100 ml de extracto crudo y, a continuación, se lavó la columna en las mismas condiciones que durante el equilibrado y se eluyó la muestra en tampón TRIS-HCl 0.05M a pH 7 con 10 % de etanol.

La fracción eluída se dializó adecuadamente en tampón acetato 50 mM, pH 5 y se procedió a la segunda etapa de purificación mediante cromatografía de intercambio iónico con la fracción dializada.

La cromatografía de intercambio iónico se realizó en una columna con Q-sefarosa (2 X 16), equilibrada con tampón acetato 50 mM, pH 5. Se aplicó la muestra y se lavó la columna con el mismo tampón de equilibrio. A continuación, se cambió la fase móvil a tampón TRIS-HCl 0.05M a pH 7, realizando finalmente el desplazamiento de la muestra con el tampón TRIS-HCl 0.05M a pH 7 con 0.2 M de NaCl.

Las fracciones eluídas se caracterizaron mediante sus espectros de absorción según se indicó en Material y Métodos.

El cromatograma obtenido en la cromatografía de interacción hidrofóbica, registrando simultáneamente la absorbancia a 280 y 620 nm, se representa en la figura 4.6.2. El amplio pico a 280 nm indica la presencia de proteínas contaminantes en el extracto utilizado, fracción que es necesario eliminar con el objetivo de obtener una mayor pureza de la proteína de interés; esta corresponde al único pico detectado a 620 nm, con un volumen de elución de 28 ml. Como resultado de esta cromatografía se consiguió una importante reducción de contaminantes, obteniéndose tras este paso un factor de purificación de 3.1, habiendo partido de un extracto inicial con una pureza de 0.3; la recuperación obtenida fue de 83.4 %.

El cromatograma obtenido de la cromatografía de intercambio iónico, registrando simultáneamente la absorbancia a 280 y 620 nm, se representa en la figura

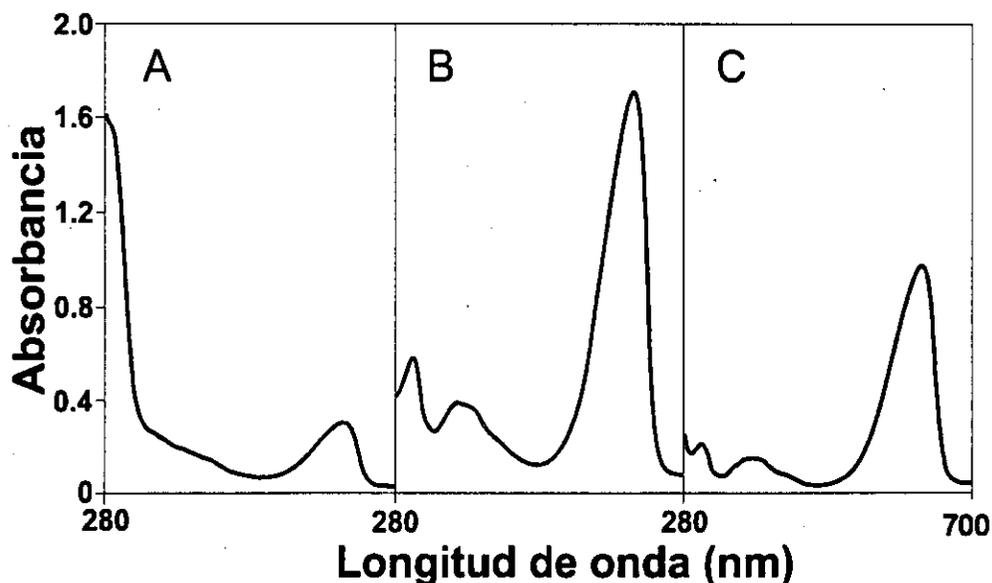


Figura 4.6.4. Espectro de absorción de biliproteínas de *Synechococcus* sp. IO9201 (A) extracto bruto; (B) y (C) fracción de ficocianina eluída después de la cromatografía de interacción hidrofóbica y cromatografía de intercambio iónico.

4.6.3. En este caso se obtuvo un único pico caso, tanto a 280 como a 620 nm, correspondiente a la ficocianina. Esta cromatografía permitió reducir considerablemente la cantidad total de proteínas contaminantes, elevando la pureza de la ficocianina, medida como la relación de A_{620}/A_{280} , a 4.85, obteniéndose un porcentaje de recuperación de 76.56% con respecto al extracto inicial.

En la tabla 4.6.3 se resumen los pasos seguidos en el proceso de purificación y el factor de purificación y el rendimiento obtenido en cada uno de ellos. Se consiguió reducir la cantidad total de proteínas contaminantes, lo que nos ha permitido obtener

Tabla 4.6.3. Resumen del proceso de purificación

Etapa del proceso de purificación	Factor de purificación (Relación A_{620}/A_{280})	Rendimiento (%)
Extracto crudo	0.3	100
CIH sobre butil sefarosa	3.1	83.4
CII sobre Q-sefarosa	4.85	76.56

un alto factor de purificación.

La caracterización espectrofotométrica tanto del extracto crudo del pigmento-proteína como de las fracciones eluidas en cada paso de purificación mostraron claramente la ausencia de aloficocianina y de ficoeritrina y corroboraron los resultados obtenidos durante la purificación (Figura 4.6.4).

4.7.- ESTIMACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE LA FRACCIÓN DE FICOCIANINA PURIFICADA

La estimación del peso molecular de la fracción de ficocianina purificada se realizó utilizando cromatografía de exclusión molecular en una columna de Superdex 200, en condiciones no desnaturizantes, tal como se indica en el apartado de Material y Métodos.

El peso molecular obtenido para la ficocianina pura fue de $102\,960 \pm 670$ daltons. En la figura 4.7.1 se representa la recta de calibrado de la columna obtenida con los patrones proteicos de peso molecular conocido y el punto de elución, indicado con una flecha, correspondiente a la ficocianina.

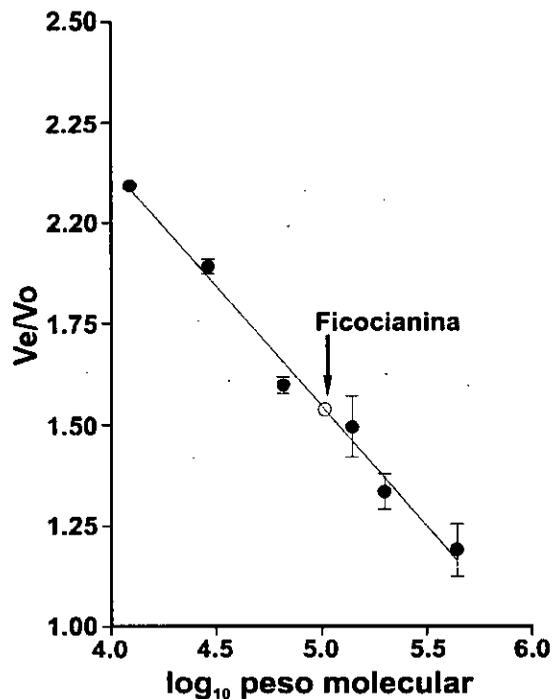


Figura 4.7.1.- Gráfico de calibración para la determinación del peso molecular de la ficocianina obtenida de *Synechococcus* sp. IO9201 mediante cromatografía de exclusión molecular.

4.8.- DETERMINACIÓN DEL PUNTO ISOELÉCTRICO

En la determinación del punto isoelectrico se utilizaron geles comerciales de poliacrilamida, con un intervalo de pH de 3.5 a 9.5, según las condiciones indicadas en «Material y Métodos».

La fracción de ficocianina purificada se localizó en una única banda (Figura 4.8.1) cuyo punto isoelectrico fue de 4.6. En la figura 4.8.2 se representa la recta de calibrado obtenida con los patrones proteicos de peso molecular y el punto de migración de la ficocianina, indicado con una flecha.

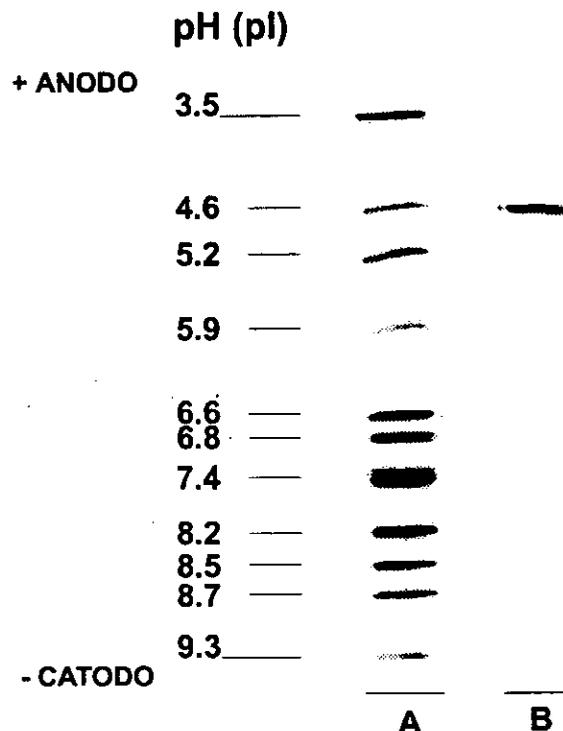


Figura 4.8.1.- Isoelectroenfoque en gel de poliacrilamida con un rango de pH de 3.5 a 9.5 de ficocianina obtenida de *Synechococcus* sp. IO9201. Se señala el patrón de las proteínas estándares (A) y la ficocianina (B).

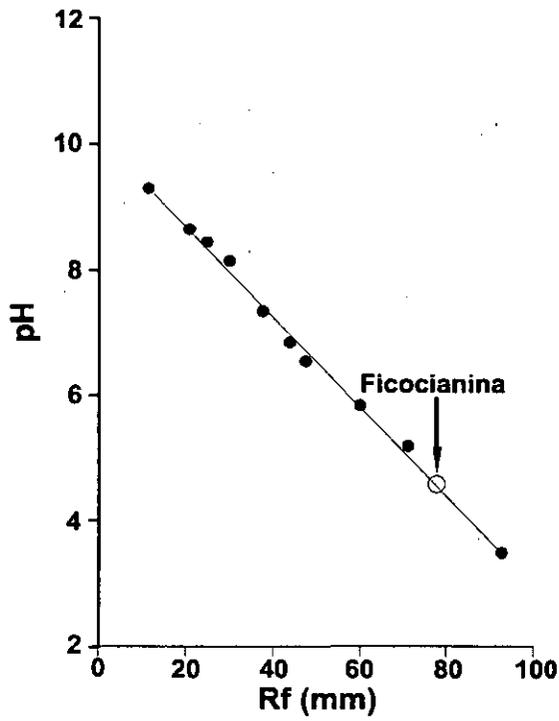


Figura 4.8.2.- Cálculo del punto isoelectrico de la ficocianina de *Synechococcus* sp. IO9201.

4.9.- DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GEL DE SDS-POLIACRILAMIDA

Con el objetivo de determinar las subunidades de la biliproteína, se realizó una electroforesis en gel de SDS - poliacrilamida con la fracción de ficocianina purificada. Se observó la presencia de tres bandas (A, B y C) cuyos pesos moleculares se calcularon a partir de la interpolación de sus Rf en una recta de calibrado teniendo en cuenta patrones proteicos de peso molecular conocido (Fig 4.9.1). Los valores obtenidos para cada banda fueron: $40\ 880 \pm 1\ 280$; $21\ 360 \pm 980$ y $18\ 980 \pm 870$ respectivamente.

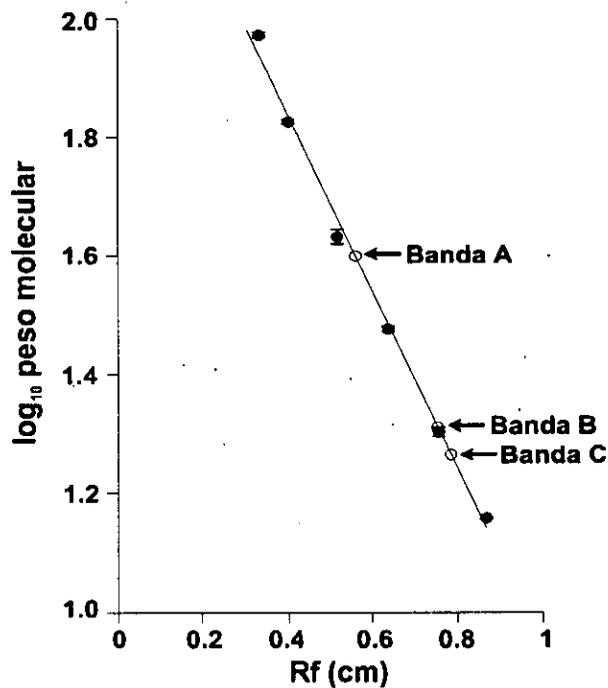


Figura 4.9.1. Gráfica de calibración para la determinación del peso molecular de la ficocianina obtenida de *Synechococcus* sp. IO9201 mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida.

4.10.- ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS DE LA FRACCIÓN DE FICOCIANINA PURIFICADA

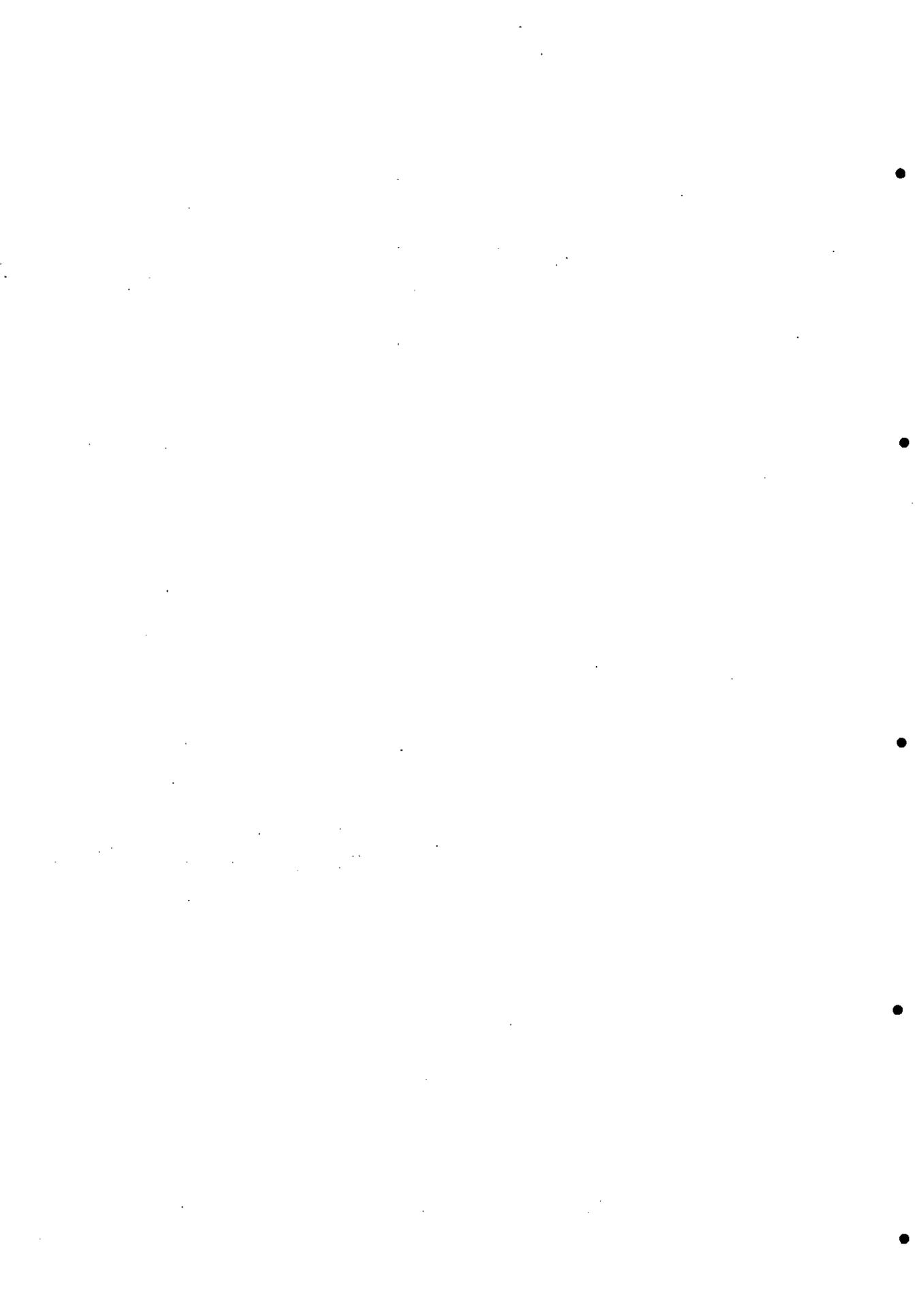
En la Tabla 4.10.1 se muestran los aminoácidos presentes en la fracción de ficocianina purificada y su proporción tomando el valor de la histidina como la unidad. Destacan los altos valores de alanina y de cisteína en comparación con el resto de los aminoácidos.

Tabla 4.10.1. Composición de aminoácidos de la fracción purificada de ficocianina de *Synechococcus* sp. IO9201.

Aminoácidos	<i>Synechococcus</i> sp. IO9201
Lisina	23,50
Histidina	1,00
Arginina	16,99
Acido Aspártico	27,85
Treonina	18,30
Serina	21,93
Acido Glutámico	24,76
Prolina	13,42
Glicina	32,02
Alanina	530,62
Cisteína	49,66
Valina	18,13
Metionina	9,66
Isoleucina	12,07
Leucina	31,07
Tirosina	15,62
Fenilalanina	9,64
Triptófano	ND

ND: no determinado

5.- *Discusión*



Entre los requisitos más importantes para la obtención de ficobiliproteínas a partir de cianobacterias está, en primer lugar, la selección de una cepa que posea altas concentraciones de estos pigmentos-proteína, lograr su óptima extracción, disponer de adecuadas condiciones de cultivo y, dependiendo del destino final del producto, optimizar un eficiente proceso de purificación.

Las especies del género *Synechococcus* se consideran las cianobacterias más ubicuas del picoplancton nerítico y oceánico. En ambientes costeros predominan las formas pigmentadas verde-azules, abundantes en ficocianina, mientras que en el ambiente pelágico predominan las formas rojas abundantes en ficoeritrina. Por tanto, las cepas de *Synechococcus* pueden separarse en dos grupos en base a la composición de sus cromóforos (Glover, 1985).

Las condiciones ecológicas en que se recogió la especie *Synechococcus* sp. IO9201, aislada de la zona litoral somera, sugieren que podría ser una cepa rica en ficocianina; esto se comprobó con medidas espectrofotométricas del extracto de ficobiliproteínas, con resultados muy similares a los obtenidos por Yamanaka & Glazer (1980) para una especie de *Synechococcus* (Figura 5.1). A partir de estos resultados, se orientó la investigación hacia la evaluación del potencial aprovechamiento de ésta especie para la producción de ficocianina. El primer paso fue la extracción y cuantificación de éste pigmento.

Algunas especies de *Synechococcus* carecen de ficoeritrinas y contienen sólo ficocianina y aloficocianina como principales pigmentos accesorios, cuyos máximos de absorción se encuentran en 620 y 650 nm, respectivamente. La constante aparición de un pico máximo de absorción a 620 nm en los extractos crudos o purificados de *Synechococcus* sp. IO9201 demuestra la presencia de ficocianina (Figura 4.1.1), que puede clasificarse como C-FC del tipo I (Rowan, 1989). Sin embargo, en ningún caso se observó el pico correspondiente a la aloficocianina (650 nm). Distintas revisiones han señalado la presencia de aloficocianina y ficocianina en

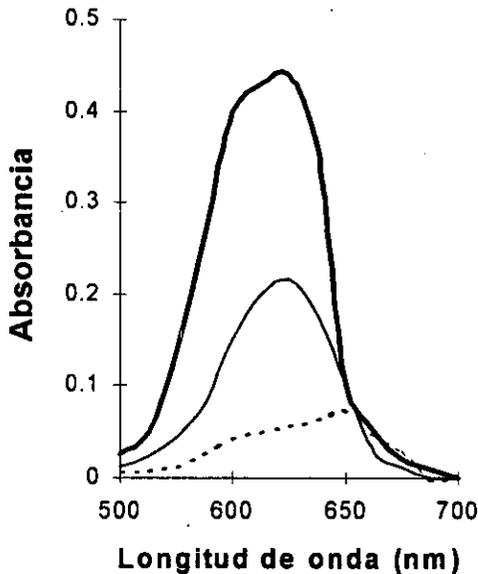


Figura 5.1. Comparación del espectro de absorción del extracto crudo de ficocianina de dos especies de *Synechococcus*. (—) presente estudio, (—) ficocianina y (.....) aloficocianina (Yamanaka & Glazer, 1980)

los ficobilisomas de cianobacterias (Gantt, 1981; Glazer, 1981; Glazer, 1984; Glazer, 1985; MacColl & Guard-Friar, 1987), pero en algunos trabajos no se detectan uno u otro pigmento en los extractos (Hirose *et al.*, 1969; Honsell *et al.*, 1984) debido a sus bajas concentraciones, lo que sugiere que los pigmentos pueden detectarse mejor aislando previamente los ficobilisomas.

Para la extracción de los pigmentos es necesario, en primer lugar, la ruptura de la pared celular, lo cual puede lograrse a través de métodos mecánicos y/o enzimáticos, liberándose de este modo las ficobiliproteínas en solución (Rowan, 1989).

Las cianobacterias pueden concentrarse por filtración y/o centrifugación. La pared celular puede destruirse mecánicamente utilizando un homogenizador (Stewart & Farmer, 1984), aunque la recuperación no suele ser completa, especialmente en

las pequeñas cianobacterias cocoides, que suelen ser resistentes a esta ruptura mecánica (Geider & Osborne, 1992). No obstante, el empleo de una prensa de French, precedido en ocasiones por homogenización, se ha utilizado en el caso de las cianobacterias con resultados satisfactorios (Glazer & Bryant, 1975; Bryant *et al.*, 1976; Nies & Wehrmeyer, 1980; Bryant, 1982); pero ambos métodos son muy laboriosos, requieren de un gran aporte de energía y, por tanto, son de difícil aplicación industrial.

La ruptura de la pared celular para la liberación de las ficobiliproteínas también se puede realizar por sonicación prolongada (Siegelman & Kycia, 1978) o mediante ciclos de congelación y descongelación reiterados, métodos que se utilizan fundamentalmente en los cultivos de microalgas y cianobacterias en condiciones de laboratorio (Alberte *et al.*, 1984).

Por otra parte, el tratamiento con lisozima constituye una alternativa de ruptura enzimática de la pared celular (Stewart & Farmer, 1984) que se ha utilizado con cepas de *Synechococcus* sp. (NKBG042902-YG1116), en las que ha provocado salida de la ficocianina (Matsunaga y Takeyama, 1995).

El método de congelación y descongelación a 4°C es un método económico cuyos resultados están avalados en la literatura y que, además, proporcionó el mayor rendimiento y la mayor pureza comparado con otros también comúnmente utilizados (Tabla 4.1.1). Los ensayos con sonicación no fueron satisfactorios debido a la resistencia de la pared celular de *Synechococcus* IO9201, y la utilización de lisozimas se descartó no sólo porque requiere reactivos que encarecen la extracción sino también para mantener las propiedades espectrales y la estabilidad de las biliproteínas en los extractos crudos.

Las ficobiliproteínas se extraen en tampones fosfato o acetato a pH desde 5.5 a 8 (Bryant *et al.*, 1976; Bryant *et al.*, 1978; Nies & Wehrmeyer, 1980; Fuglistaller *et al.*, 1981). Recientemente se han utilizado soluciones con diferentes sales

inorgánicas en lugar de los tampones fosfatos comúnmente empleados en los procesos de extracción (Herrera *et al.*, 1989).

Al comparar los resultados de extracción de ficobiliproteínas en *Synechococcus* sp. IO9201 con los obtenidos con *Spirulina maxima* (Herrera *et al.*, 1989) se observan resultados similares con las soluciones de cloruro de sodio y de calcio, aunque existen diferencias con el resto de las soluciones ensayadas. Esto se explica porque los resultados de extracción con estas y otras sales inorgánicas normalmente utilizadas en el proceso de extracción de los pigmentos pueden variar en función de su concentración y su pH, además del estado de la biomasa a utilizar.

El estado de la biomasa depende de las condiciones de cultivo de la especie, puesto que el contenido del ficobilisoma de una célula y las cantidades relativas de los componentes captadores de la luz dependen de la calidad e intensidad de la luz, la edad del cultivo y su estado nutricional (Yamanaka & Glazer, 1980), dada la estrecha relación que existe entre el contenido de pigmentos-proteínas y la concentración de nitrógeno.

El nitrógeno es uno de los constituyentes principales de la biomasa fototrófica y con frecuencia es el primer factor limitante del crecimiento microalgal en ambientes acuáticos (Eppley & Peterson, 1979; Wurtsbaugh *et al.*, 1984). Por ello, la utilización de distintas fuentes o concentraciones de este elemento tiene gran interés en el cultivo de microalgas y cianobacterias.

El nitrógeno se encuentra disponible en los medios acuáticos naturales en varias formas (Syrett, 1981) pero el nitrato (NO_3^-), el amonio (NH_4^+) y la urea son las fuentes dominantes, con variaciones espacio-temporales en su importancia relativa (Kaufman *et al.*, 1983; Price *et al.*, 1985; Kristiansen & Lund, 1989). Estas son las fuentes de nitrógeno para las cianobacterias, aunque algunas especies pueden fijar el nitrógeno atmosférico.

En condiciones de cultivo, el nitrógeno es cuantitativamente el elemento más importante en la nutrición de las microalgas y cianobacterias, y un factor esencial en

la preparación del medio de cultivo es la fuente de nitrógeno. Las cianobacterias son capaces de utilizar nitrato, nitrito y amonio como única fuente de nitrógeno para el crecimiento (Fogg *et al.*, 1973), así como otras fuentes de nitrógeno orgánico como la urea (Collier & Palenik, 1996) y varios aminoácidos (Wallen & Allan, 1987); sin embargo, si hay varias fuentes a la vez, puede ocurrir un efecto de antagonismo químico tal como ocurre con el nitrato y el nitrito (Madueño *et al.*, 1987) o el nitrato en presencia del amonio (Romero *et al.*, 1987) en *Anacystis nidulans* o la inhibición del nitrato en presencia de algunos aminoácidos (Romero *et al.*, 1985).

Cuando el objetivo es la producción de ficocianina, la utilización del nitrato parece ser la mejor alternativa. De hecho, es la fuente de nitrógeno generalmente utilizada en los cultivos de *Synechococcus* spp. con distintos fines experimentales (Omata, 1995; Kana *et al.*, 1992); además, es la fuente de nitrógeno del medio BG11, ampliamente utilizado en los cultivos de *Synechococcus* (Stanier *et al.*, 1971; Levi & Preiss, 1976) y de varios medios de cultivo propuestos para cianobacterias (Becker, 1994).

En cultivos masivos la productividad de la biomasa aumenta en relación con la concentración de nitrógeno hasta un máximo donde la producción puede verse limitada por varios factores, entre ellos la luz (Fábregas *et al.*, 1985), aunque esta limitación se ha solucionado recientemente en cultivos de *Synechococcus* spp. en reactores biosolares con fibras ópticas difusoras de luz (Matsunaga *et al.*, 1991).

Los resultados obtenidos en los cultivos de *Synechococcus* sp. con distintas concentraciones de nitrógeno demostraron que concentraciones entre 1 y 2 mM de nitrato son insuficientes para obtener un buen crecimiento de esta cianobacteria (Figura 4.2.1); concentraciones de este orden se consideraron un medio limitante de nitrógeno para las cianobacterias *Oscillatoria agardhii* y *O. redekei* (Foy, 1993). *O. rubescens* y *Spirulina platensis* no crecen con una concentración de nitrato de 0.03 mM (Becker, 1994).

El mayor crecimiento de *Synechococcus* sp. IO9201 se obtuvo con 8 mM de nitrato (Figura 4.2.1), aunque la tasa de crecimiento media en esta concentración fue ligeramente menor ($\mu_{med}=0.405$ doblajes día⁻¹) que la obtenida con 4 mM de nitrato ($\mu_{med}=0.462$ doblajes día⁻¹) (Tabla 4.2.1). Además, en los cultivos con 8 mM de nitrato se obtuvo la mayor concentración de ficocianina (Figuras 4.2.3 y 4.4.4), cuya producción era el objetivo principal. Medios con concentraciones de nitrato de 10 mM se han considerado suficientes para el cultivo de cianobacterias (Foy, 1993).

La concentración de los pigmentos fotosintéticos se relaciona con la concentración de nitrógeno. De hecho, la retirada de nitrógeno del medio de cultivo generalmente causa clorosis (Allen & Smith, 1969) debido a una drástica reducción de las ficobiliproteínas. Este fenómeno es bastante rápido, degradándose de un 80 a un 95 % de las ficobiliproteínas durante las primeras 24 horas de limitación (Allen & Hutchison, 1980; Boussiba & Richmond, 1980). La pérdida de la pigmentación específica de las ficobiliproteínas es debida a una proteinasa que es activada durante las etapas iniciales de la limitación (Wood & Haselkorn, 1980). En los cultivos de *Synechococcus* sp. IO9201 con 1 y 2 mM de nitrato se produjo clorosis durante la fase estacionaria, con pérdidas claras de la pigmentación celular. Así, en los cultivos con 1 y 2 mM de nitrato se obtuvieron valores muy bajos de ficocianina (Figuras 4.2.3 y 4.2.4c), aunque estos son superiores a los obtenidos en cultivos con *Synechococcus* spp. en condiciones limitantes de nitrógeno (concentraciones menores de 1 mM) (Kana *et al.*, 1992). Con el resto de las concentraciones (4 y 8 mM de nitrato) este fenómeno no se manifestó debido a las mayores concentraciones de nitrato inicial en el medio.

Estos resultados, asimismo, confirman que *Synechococcus* sp. IO9201 no tiene capacidad para fijar el nitrógeno atmosférico, de lo contrario podría continuar su crecimiento sin necesidad de la presencia de nitrógeno combinado en el medio de cultivo. Con los datos de que se dispone actualmente, ninguna especie del género *Synechococcus* perteneciente al picoplankton es capaz de fijar el nitrógeno atmosférico (Stanier *et al.*, 1971, Glover, 1985) y la única referencia de una especie de este género fijadora de nitrógeno corresponde a una cepa denominada BG0011 de vida

epífita (Phlips *et al.*, 1989), que es capaz de prolongar su crecimiento hasta 80 días en un medio sin nitrógeno combinado.

Una respuesta común de las microalgas y cianobacterias a la escasez de nitrógeno es la pérdida selectiva de las proteínas asociadas con el aparato fotosintético (Hipkin & Syrett, 1977; Perry *et al.*, 1981; Coleman *et al.*, 1988). Un gran número de estudios han demostrado que la movilización del nitrógeno de los componentes fotosintéticos permite continuar la síntesis de proteínas esenciales para el mantenimiento celular y el crecimiento durante los periodos de deficiencia de nitrógeno (Perry *et al.*, 1981) y las ficobiliproteínas, además de constituir un pigmento fotosintético accesorio, tienen el papel funcional de compuestos de reserva de nitrógeno (Carr, 1988).

Además de éstos pigmentos como reserva de nitrógeno, en las cianobacterias pueden existir gránulos de cianoficina, que consisten en un copolímero de aspartato y arginina, y que realizan la misma función. Sin embargo, estudios realizados con varias especies de *Synechococcus*, tanto de origen marino como de agua dulce, indican que la cianoficina está completamente ausente en este género, por lo que la función de reserva de nitrógeno se le atribuye específicamente a las ficobiliproteínas (Newman *et al.*, 1987; Carr, 1988).

En *Anacystis nidulans* se ha demostrado que la síntesis de la ficocianina es reprimida selectivamente en un medio deficiente en nitrógeno (Lau *et al.*, 1977). Además de la reducción en su tasa de producción, las cianobacterias son capaces de degradar las ficobiliproteínas presentes en la célula cuando el organismo se halla en un estrés de nitrógeno (Lau *et al.*, 1977; Yamanaka & Glazer, 1980) y en éstas condiciones son las responsables de una parte significativa del contenido de nitrógeno celular (Kana & Glibert, 1987). La degradación de las ficobiliproteínas es, por tanto, el mecanismo de movilización del nitrógeno para aquellos procesos que mantienen el crecimiento celular o el metabolismo durante el tiempo en que el suplemento exógeno de nitrógeno se agota (Lewitus & Caron, 1990).

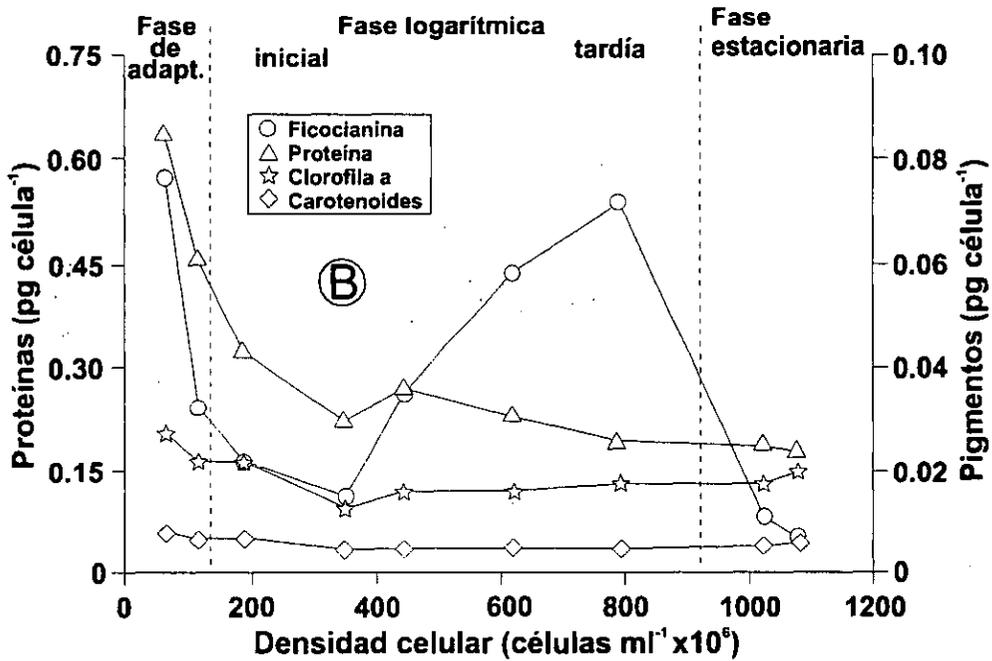
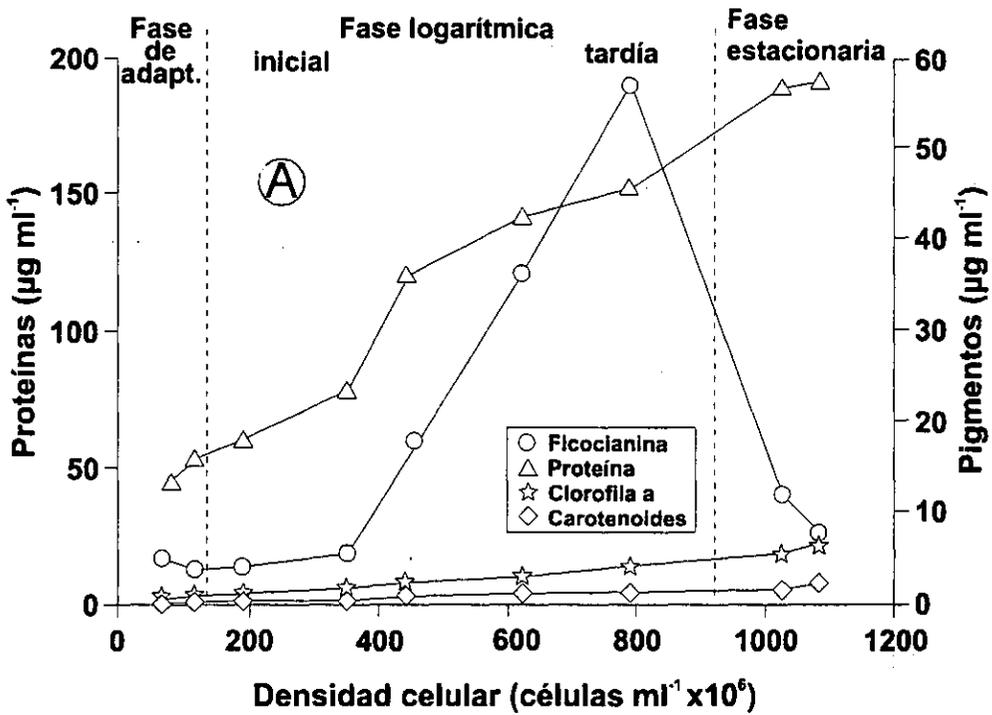


Figura 5.2.- Variación del contenido de pigmentos fotosintéticos y proteínas totales en relación con el crecimiento celular en distintas fases del cultivo de *Synechococcus* sp. IO9201 en cultivos con 8mM de nitrato en el medio. a) variación en la producción b) variación en el contenido celular.

Los cambios en el contenido de proteínas celulares apoyan la posibilidad de que en *Synechococcus* sp. IO9201 la ficocianina se movilice para otros usos celulares en los cultivos carentes de nitrógeno (Figura 5.2). Las proteínas celulares apenas varían en las fases exponencial tardía y estacionaria temprana de crecimiento; sin embargo, la concentración de ficocianina decreció significativamente en las células durante la fase exponencial tardía de crecimiento, lo cual fue más evidente en los cultivos con 8 mM de nitrato. Esto indica que la movilización del nitrógeno de la ficocianina permitió a las células mantener el contenido proteico durante este período, produciéndose de este modo un retraso en la disminución del contenido de proteína celular total, que ocurrió en la fase estacionaria tardía, como se observa tanto en la producción por volumen de cultivo como a nivel celular (Figura 5.2). La movilización de la ficocianina como una fuente de nitrógeno endógena parece ser una respuesta adaptativa de esta cianobacteria a las etapas tempranas de la deficiencia de nitrógeno.

En la mayoría de las especies de cianobacterias el descenso en el contenido de las ficobiliproteínas en respuesta al estrés de nitrógeno ocurre antes de la pérdida del contenido de clorofila *a* y la disminución de la tasa de crecimiento (Allen & Hutchison, 1980; Boussiba & Richmond, 1980; Bayer & Schenk, 1986; Schenk *et al.*, 1987).

Como ya se ha señalado, existe una relación, a nivel celular, entre la concentración de nitrógeno inicial en el medio y el contenido de ficobiliproteínas. Sin embargo, los carotenoides y la clorofila *a* presentan poca variación a lo largo del cultivo para las concentraciones de nitrato ensayadas (Figuras 4.2.3a, b y 4.2.4a, b). Estos resultados coinciden con los obtenidos en *Synechococcus* PCC 6301, en la que el estrés de nitrógeno provoca un descenso de las ficobiliproteínas y menores cambios en las clorofilas y los carotenoides totales (Biswal *et al.*, 1994).

En general, las cianobacterias reaccionan a la limitación de nitrógeno disminuyendo su tasa de producción de ficobiliproteínas (Grossman *et al.*, 1986). La tasa de crecimiento y producción de clorofila *a* se mantienen constantes mientras que el

contenido de ficobiliproteínas disminuye durante las primeras etapas de limitación de nitrógeno en cultivos de *Cyanophora paradoxa* (Schenk *et al.*, 1987), *Spirulina platensis* (Boussiba & Richmond, 1980), *Anacystis nidulans* (Bayer & Schenk, 1986) y *Agmenellum quadruplicatum* (Stevens *et al.*, 1981). La captación de luz asociada con las ficobiliproteínas requiere cantidades sustanciales de nitrógeno (Raven, 1984), no obstante, la fotosíntesis puede funcionar en ausencia de ficobiliproteínas (Lemasson *et al.*, 1973; Arnon *et al.*, 1974).

Los cultivos con 8 mM de nitrato alcanzaron la fase estacionaria sólo después que el contenido de ficocianina celular disminuyó considerablemente (de 0.07 a 0.007 pg célula⁻¹). En relación a la clorofila *a*, la ficocianina disminuyó bruscamente durante este período, con lo que la relación clorofila *a*/ficocianina aumentó una vez alcanzada ésta fase (Figura 4.2.5), lo que indica una pérdida preferencial de la ficocianina en relación a la clorofila *a* antes del cese del crecimiento. Debe destacarse que la disminución en el contenido de ficocianina comenzó durante la fase exponencial de crecimiento. Las adaptaciones fisiológicas a la reducción del nitrógeno en los cultivos estáticos microalgales ocurren durante la fase exponencial de crecimiento (Prézelin, 1982).

Con respecto al comportamiento de las sustancias de reserva, en todas las concentraciones de nitrato ensayadas la cantidad celular de glúcidos aumenta cuando los cultivos comienzan la fase estacionaria de crecimiento, donde la disponibilidad de nitrógeno es escasa. Las mayores concentraciones de glúcidos se obtuvieron en los cultivos con menores concentraciones de nitrógeno, lo cual demuestra que la síntesis de este producto de reserva se produce cuando disminuye la disponibilidad de nitrógeno en el medio (Figura 4.2.7). Esta misma tendencia se observa en el caso de los lípidos aunque con menores variaciones (Figura 4.2.8). Se ha señalado que la deficiencia de N ó P, necesarios para la biosíntesis de proteínas y ácidos nucleicos, conduce a una desviación del carbono fotoasimilado hacia la biosíntesis de productos de reserva, carbohidratos y/o lípidos (Myers, 1980).

Varios estudios han destacado los efectos de la concentración de nitrógeno en las concentraciones de lípidos. El agotamiento de nitrógeno incrementa el contenido total de lípidos y ácidos grasos en algunas especies de diatomeas y algas verdes (Shifrin & Chisholm, 1981; Ben-Amotz *et al.*, 1985). Sin embargo, no se encontraron cambios significativos en la composición lipídica de cianobacterias, incluida *Spirulina platensis*, con los cambios de la concentración de nitrógeno del medio (Piorreck *et al.*, 1984; Tedesco & Duerr, 1989). Estudios con *Anacystis nidulans*, *Microcystis aeruginosa* y *Oscillatoria rubescens* indican el mismo comportamiento (Alvarez Cobelas, 1989).

Se ha sugerido que la relación proteínas/carbohidratos (PRO/CHO) puede ser un indicador de la limitación de nutrientes considerando relaciones menores que 0.8 de deficiencia «extrema», de 0.8 a 1.2 deficiencia «moderada» y valores mayores de 1.2 «no deficiencia» (Healey, 1975). Estas relaciones se han utilizado como indicadores del estado de nutrientes en cianobacterias planctónicas (Foy, 1993).

Si se aplican estos valores a los resultados obtenidos del efecto de la concentración de nitrógeno sobre el crecimiento y composición bioquímica de *Synechococcus* sp. IO9201, se observa que a medida que aumenta la concentración de nitrógeno en el medio los cultivos se mantienen más días en la escala de no deficiencia; así, en los cultivos con 8 mM de nitrato sólo en el día 18 se produce moderada deficiencia, mientras que los de 1 mM a partir del cuarto día se encuentran en estado de moderada deficiencia y en el sexto día en extrema deficiencia (Figura 5.3). Esto confirma la utilización de la concentración de 8 mM de nitrógeno para un mejor crecimiento y obtención de ficocianina.

De los nutrientes principales requeridos para el crecimiento algal no sólo es importante el nitrógeno, como se ha señalado anteriormente, sino que el fósforo también es esencial, particularmente por su papel en procesos celulares claves como la biosíntesis de los ácidos nucleicos, síntesis de membranas y transferencia de energía (La Roche *et al.*, 1993; Becker, 1994) ya que tiene un papel predominante en la energética celular como ATP y forma parte de muchos componentes estructu-

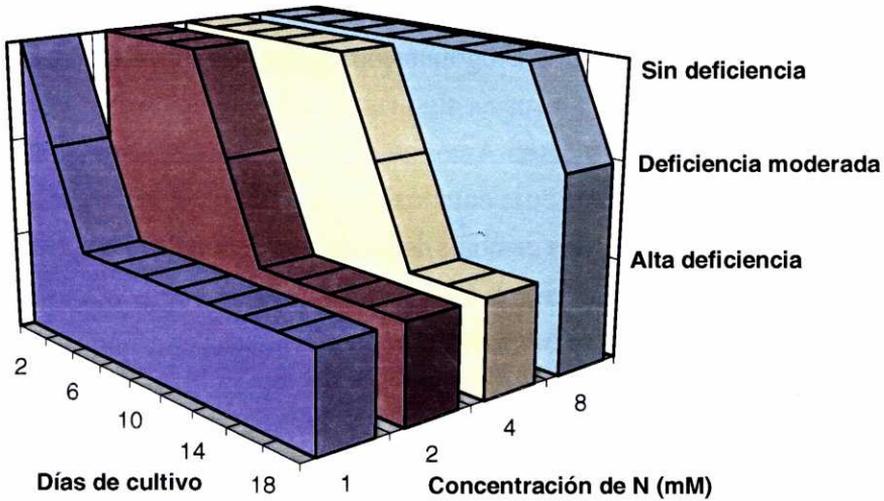


Figura 6.3. Variación de la relación PROT/CHO como índice de la cantidad de nutrientes en el medio para diferentes concentraciones iniciales de N. Alta deficiencia (< 0.8), Moderada deficiencia (0.8 - 1.2), Sin deficiencia (> 1.2)

rales y bioquímicamente funcionales que requiere la célula (Ahlgren, 1988) e incluso en el funcionamiento del aparato fotosintético de microalgas y cianobacterias (Funteu *et al.*, 1997).

Pero más importante que el nitrógeno y el fósforo por separado es la relación entre ambos (Noüe & Pauw, 1988), sobre todo en cultivos discontinuos o con tiempos de retención largos (Alvarez Cobelas & Gallardo, 1989). En este sentido, un concepto importante es la relación óptima de nutrientes, aunque se ha señalado que si estos elementos están en exceso con respecto a los requerimientos del alga o cianobacteria su relación es irrelevante (Grobellar y House, 1995).

Cada especie, según su velocidad de crecimiento, precisa de un valor propio de esta relación (Rhee & Gotham, 1980). Una relación 16:1 de N/P se considera óptima (Alvarez Cobelas & Gallardo, 1989; Grobellar & House, 1995); mientras que una relación de 24:1 se considera como un medio con exceso de nutrientes (La Roche *et al.*, 1993). En las experiencias realizadas con *Synechococcus* sp. IO9201

los mejores resultados se obtuvieron con una relación N/P 20:1 (Figura 4.3.1). La concentración de ficocianina en las células y, por tanto, su producción fué afectada por la relación N/P, obteniéndose máximos durante la fase logarítmica de crecimiento en la relación 20:1. Sin embargo, no se observó ningún efecto de la variación en dichas relaciones sobre el contenido clorofila *a* y carotenoides, excepto para aquellos cultivos que no contenían fósforo inicial (Figuras 4.3.3 y 4.3.4).

La clorosis, además de manifestarse en respuesta a la escasez de nitrógeno como se indicó anteriormente, se observa también en respuesta a la limitación de varios elementos esenciales como el fósforo y el azufre (Kolber *et al.*, 1988; Herzig & Falkowski, 1989; Collier & Grossman, 1992; La Roche *et al.*, 1993). En los cultivos de *Synechococcus* sp. IO9201 con distintas relaciones N/P este fenómeno se observó claramente en los cultivos carentes de fósforo inicial y a partir del décimo día de cultivo (Figura 4.3.3). Los cultivos con las menores concentraciones de fósforo (relaciones N/P 80:1, 40:1) también presentan un descenso del contenido en ficocianina a partir de este día. Esto coincide con otros resultados que señalan que la clorosis en las cianobacterias es menos pronunciada bajo la limitación de fósforo que bajo la limitación de nitrógeno y de azufre (Collier y Grossman, 1992), fenómeno que también se describió en los cultivos de la clorofita *Dunaliella tertiolecta*, pero no así en los de la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* (La Roche *et al.*, 1993).

Con respecto a la composición bioquímica en proteínas, carbohidratos y lípidos de *Synechococcus* sp. IO9201 con diferentes relaciones N/P hay pocas variaciones a nivel celular para cada relación N/P ensayada, excepto en los cultivos carentes de fósforo inicial, donde se produce un aumento de las sustancias de reserva a partir del sexto día de cultivo (Figuras 4.3.7 y 4.3.8). Estos datos coinciden con los obtenidos por otros autores que observan que durante el crecimiento de microalgas y cianobacterias los cultivos deficientes en fósforo tienden a acumular grandes cantidades de lípidos (Terry *et al.*, 1985; Becker, 1994), mientras que el contenido de proteínas, clorofila y ácidos nucleicos disminuye (Becker, 1994).

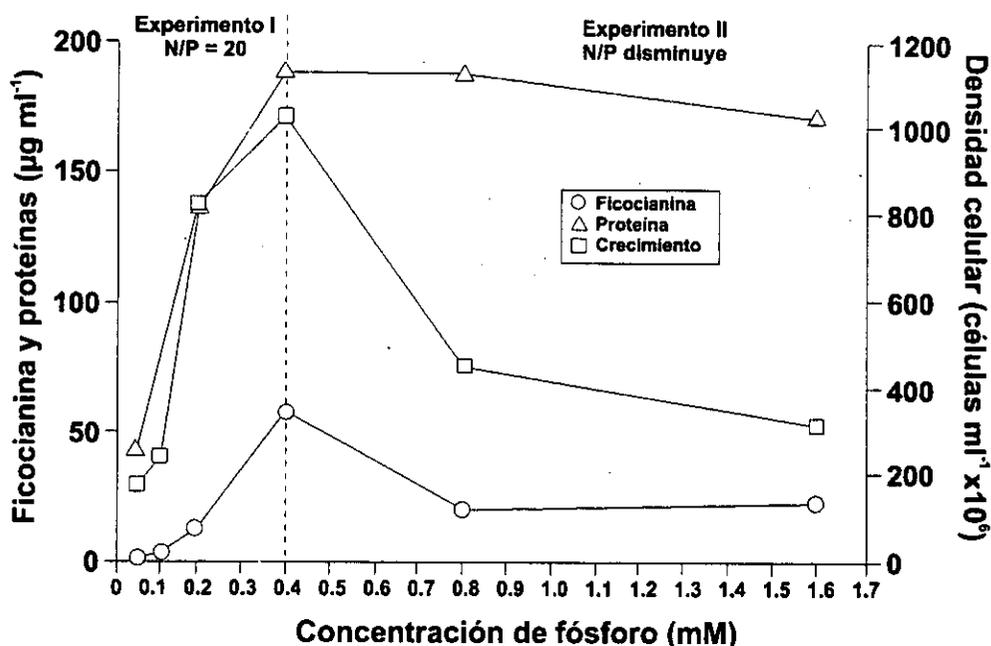


Figura 5.4.- Variación del contenido de ficocianina y proteínas totales (expresado en $\mu\text{g ml}^{-1}$) y de la densidad celular (células $\times 10^6 \text{ ml}^{-1}$) en función de la concentración de fósforo en los cultivos de *Synechococcus* sp. IO9201, teniendo en cuenta el último día de la fase logarítmica.

El análisis conjunto de los resultados de los experimentos de concentración de nitrato y relaciones N/P, referidos al último día de la fase logarítmica (Figura 5.4), permitió determinar la variación en la densidad celular y en la producción de ficocianina y proteínas en relación con la concentración de fósforo en el medio. Tanto la densidad celular como la producción de ficocianina y proteínas aumentan con el incremento de la concentración de nitrógeno y fósforo hasta 8 mM y 0.4 mM, de nitrato y fosfato, respectivamente. A partir de aquí, el incremento de la concentración de fósforo, manteniendo constante el nitrógeno a 8 mM de nitrato, provocó un descenso del crecimiento y de la producción de ficocianina, mientras que se mantienen constantes las producciones de proteína. Este punto de inflexión, por tanto, indica la relación óptima de nutrientes (N/P= 20) para el cultivo de *Synechococcus* sp. IO9201.

El efecto de los nutrientes no debe separarse de otro factor fundamental: la luz. La luz es la fuerza conductora de la fotosíntesis y, como tal, su cantidad, composición

espectral y sus fluctuaciones dentro del cultivo controlan las tasas de producción de biomasa y pueden causar variaciones en la respuesta fotosintética, las tasas de crecimiento y el metabolismo celular de las microalgas y cianobacterias (Sánchez-Saavedra & Voltolina, 1996).

Las actividades relacionadas con la luz son fuertemente dependientes de las longitudes de onda, ya que se basan en las reacciones fotoquímicas de los pigmentos, cada uno de los cuales absorbe en regiones determinadas del espectro visible.

El espectro de la clorofila α tiene una fuerte banda de absorción en el rojo (620 a 700 nm, con un máximo en 660 nm) y otra mucho más fuerte en la región del azul (400 a 450 nm con un máximo en 455 nm), junto con otras pequeñas bandas adicionales. Sin embargo, presenta una baja absorción aunque no nula en la región del verde.

Los carotenoides constituyen otra clase de pigmentos fotosintéticos que absorben hacia longitudes de onda más cortas del espectro visible y sus colores característicos son amarillo, naranja o rojo. Absorben aproximadamente entre 420 y 480 nm, con máximos en 425, 450 y 480 nm, según la especie.

Por su parte, las biliproteínas son los llamados pigmentos accesorios y pueden considerarse tres tipos fundamentales atendiendo a sus espectros de absorción: las ficoeritrinas, con máximos de absorción a 490 - 570 nm, que se corresponde con la banda azul del espectro visible; las ficocianinas que absorben entre 612 - 645 nm con máximos en 620, que se corresponde con la región roja del espectro, por eso sus colores próximos al azul; y las aloficocianinas que, en general, están presentes en menores concentraciones y constituyen el pigmento central del ficobilisoma, y su espectro de absorción varía entre 550 y 670 nm con máximos en 650 nm.

Las cianobacterias, al tener varios tipos de pigmentos, poseen un amplio intervalo de absorción efectiva en diferentes longitudes de onda del espectro visible (Kirk, 1994), que va prácticamente desde 400 hasta 700 nm, con tres picos que se corresponden con los máximos ligeramente solapados de la clorofila α , carotenoides

y ficoeritrina, el de ficocianina y aloficocianina y otro de clorofila α . Estas características tienen un gran valor adaptativo para explotar ambientes con diferente grado de iluminación (Figura 5.5).

La especie *Synechococcus* sp. IO9201 pertenece al grupo carente de ficoeritrina y, por tanto, posee una estructura y composición relativamente más simple, con elevadas concentraciones de ficocianina y mucho menores de aloficocianina, además de clorofila α y carotenoides en menores proporciones.

La ausencia de ficoeritrina hace que la banda espectral correspondiente al azul no quede cubierta (450 - 550 nm). Ello explica su escaso crecimiento con luz azul, al estar ausente el pigmento antena clave para la absorción en ésta longitud de onda.

La presencia de clorofila α , que tiene su capacidad de absorción en la banda del azul, podría asumir el papel total de la fotosíntesis en ausencia de los pigmentos accesorios, ya que se sabe que, en ausencia de nitrógeno, la clorofila α , el único pigmento que se mantiene después de la degradación de las biliproteínas, asume el papel de receptor primario de la luz para el funcionamiento de los fotosistemas (Cohen-Bazire & Bryant, 1982). Esta podría ser la causa de que el cultivo de *Synechococcus* sp. IO9201 mantenga su crecimiento con luz azul (Figura 4.4.1), aunque este crecimiento es muy bajo porque el papel de los pigmentos accesorios es fundamental para que el proceso de la fotosíntesis sea eficiente; con la ausencia de ficoeritrina y la incapacidad de la ficocianina de absorber en el azul, el proceso de transferencia de energía es mucho menos eficiente que con otras longitudes de onda.

Los ficobilisomas pueden ser excitados a través de cualquiera de sus pigmentos componentes, dando como resultado que la energía se transfiera hasta la aloficocianina y de ésta al fotosistema II (PSII) (Gantt, 1981).

Dentro del ficobilisoma, la ficoeritrina y la ficocianina son los pigmentos fundamentales captadores de luz. Es tal su importancia que muchas cianobacterias realizan lo que se ha denominado adaptación cromática complementaria, donde ajustan su contenido de pigmentos accesorios a condiciones espectrales específicas.

La síntesis de ficoeritrina es estimulada con luz verde-azul y la de ficocianina en luz roja, y este control cromático permite a la célula captar la energía luminosa disponible con máxima eficiencia (Tandeau de Marsac & Houmard, 1988). Las cepas ricas en ficocianina dominan en aguas eutróficas o distróficas donde predomina la luz roja, mientras que las ricas en ficoeritrinas abundan en aguas azules o verdes oligotróficas, marinas o de agua dulce (Hauschild *et al.*, 1991).

Sólo las cianobacterias que sintetizan ficoeritrina pueden llevar a cabo la adaptación cromática complementaria (Tandeau de Marsac & Houmard, 1988) y por ésta razón *Synechococcus* sp. IO9201, que sólo sintetiza ficocianina, no es capaz de adaptarse a la luz azul y presenta con ésta longitud de onda los peores resultados en cuanto a crecimiento.

La concentración de pigmentos por célula en los cultivos con luz azul fue también menor que la obtenida con otras calidades de luz (Figuras 4.4.3, 4.4.4 y 4.4.5), excepto los carotenoides, posiblemente debido a su mayor absorción en ésta región del espectro o a su menor eficiencia fotosintética respecto a la clorofila *a* (Kirk, 1994).

Los cultivos con luz verde y luz roja presentaron, sin embargo, crecimiento muy similar y mayor que el de la luz azul. Con luz roja y verde las células crecen utilizando aquellas partes del espectro donde la absorción de la clorofila *a* y la ficocianina se solapan. En el caso de la luz verde, esto ocurre aproximadamente en el intervalo entre 500 - 550 nm, lejos de los máximos de absorción de los pigmentos que contiene la célula, por ello no sólo el crecimiento es bajo sino también la concentración celular de los pigmentos fotosintéticos.

Los resultados de crecimiento con luz roja fueron muy similares a los de la luz verde, aún cuando en ésta banda del espectro la ficocianina tiene su óptimo de absorción y, de hecho, se ha señalado que, aunque cada cepa responde de manera única a las calidades espectrales, las que presentan ficocianina crecen mejor con luz roja que las que contienen ficoeritrinas (Hauschild *et al.*, 1991).

Como la clorofila *a* tiene su pico de absorción menor en la región del rojo, es posible que en ésta longitud de onda la eficiencia fotosintética sea relativamente menor y, portanto, el crecimiento. Sin embargo, la concentración de ficocianina se incrementó notablemente con luz roja (Figura 4.4.5). *Anacystis nidulans* y *Synechococcus* 6301 creciendo en luz roja incrementan también su relación ficocianina/clorofila *a* (Kirk, 1994).

Existe cierta diversidad de resultados cuando se cultivan cepas de *Synechococcus* con distintas calidades espectrales. En tres cepas de esta especie

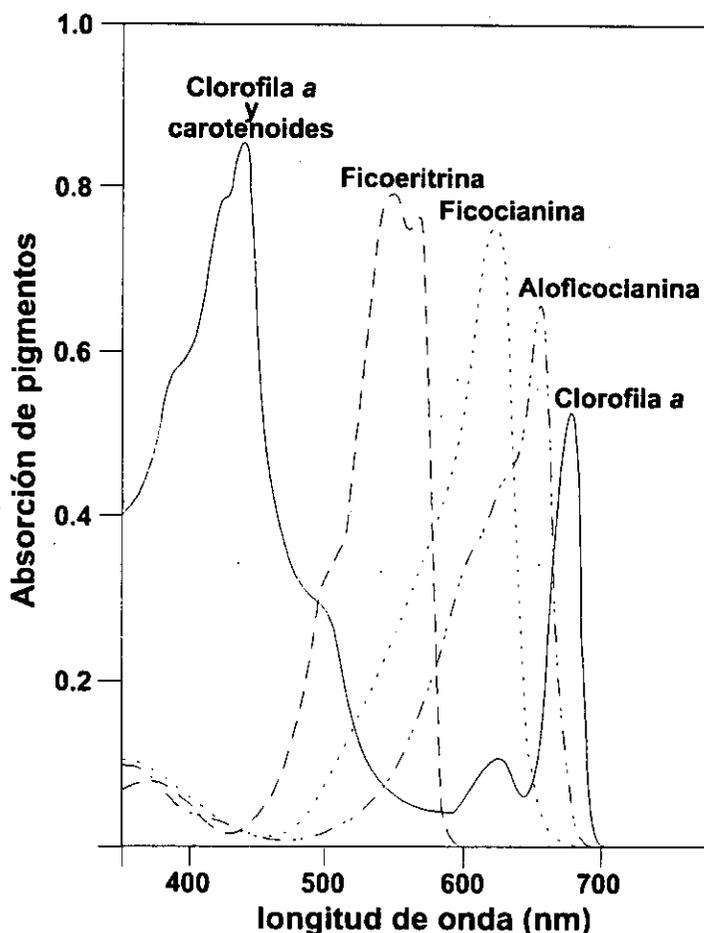


Figura 6.5 Espectro de absorción de los pigmentos fotosintéticamente activos en las cianobacterias (modificada de Gantt, 1990)

Tabla 5.2. Composición bioquímica de *Synechococcus* sp. IO9201 y *Spirulina maxima*, expresada en porcentaje de peso seco.

Componentes celulares	<i>Synechococcus</i> sp. IO9201	<i>Spirulina maxima</i>¹
Proteína	50.23	52.02
Lípidos totales	18.00	3.27
Ficocianina	4.40	7.71
Clorofila a	0.39	0.67
Carotenoides totales	0.05	0.57

¹ Herrera *et al.*, 1989

productoras de ficocinina se encontró que en una de ellas la tasa de crecimiento no varía significativamente con luz blanca, verde y roja; en otra, hay diferencias significativas entre todas ellas, mientras que en la tercera el crecimiento en luz blanca y roja es el mismo y difiere del de la luz verde (Hauschild *et al.*, y colaboradores (1991).

Synechococcus sp. IO9201 creció mejor con luz blanca (Figura 4.4.1) ya que esta ofrece una mayor amplitud de longitudes de onda para la absorción de todos sus pigmentos. Con esta luz se obtienen también las mayores concentraciones de ficocianina, mucho mayores que las obtenidos con otras calidades de luz.

Optimizadas las condiciones para la producción de biomasa de *Synechococcus* sp. IO9201, se comparó su composición bioquímica con la de otras especies de cianobacterias, como *Spirulina maxima*, de reconocido interés nutricional (Herrera *et al.*, 1989) (Tabla 5.2). El contenido en proteína en *Synechococcus* sp. IO9201 es muy similar al de *S. maxima*, y además no se encuentra ninguna referencia de toxicidad para las especies de éste género ni aparecen incluídas como productoras de cianotoxinas (Carmichael, 1992). Aunque los valores de ficocianina son menores que los de *S. maxima* (Herrera *et al.*, 1989), son lo suficientemente altos para considerar esta especie de interés en la producción de este pigmento.

En cuanto a la purificación de las ficobiliproteínas, recientemente se han propuesto varios métodos que se utilizan en función del objetivo final de su producción. Ficocianina pura con una relación A_{620}/A_{280} de 4 se utiliza en pequeñas cantidades como marcador bioquímico en inmunoensayos, microscopía y citometría (Cianothec Corporation, 1988) debido a sus propiedades fluorescentes. La Dainippon Ink & Chemicals, Inc. comercializa ficocianina como colorante con una relación de pureza de 0.52. Herrera y colaboradores (1989) señalan un grado de pureza de 0.72 para la utilización de ficocianina con este mismo objetivo.

Entre los métodos tradicionales utilizados para la purificación de las biliproteínas se encuentra la precipitación repetida con sulfato de amonio en concentraciones variables combinada con la cromatografía de intercambio iónico en diferentes resinas y la filtración en gel con Sephadex (Rowan, 1989). Se ha utilizado, además, la adsorción en carbono activado y la ultrafiltración para la obtención de la ficocianina de *Spirulina* (Herrera *et al.*, 1989)

Para la purificación de la ficocianina de *Synechococcus* sp. IO9201 se utilizó, como primer paso, la cromatografía de interacción hidrofóbica con resina de butil sefarosa, ya que fue con la que se obtuvo la mayor recuperación del pigmento. Tras determinar las condiciones óptimas de purificación en la cromatografía de interacción hidrofóbica se obtuvo una ficocianina con una pureza de 3.1 (Tabla 4.6.1), superior a la pureza estimada como óptima para grado de colorante y muy cercana a la requerida para grado de reactivo (Herrera *et al.*, 1989). El segundo paso de purificación mediante cromatografía de intercambio iónico dió un valor de pureza 4.85 (Tabla 4.6.3), superior a la pureza requerida para la ficocianina con grado reactivo (Herrera *et al.*, 1989), que es, de hecho, la pureza utilizada por Sigma Co. con fines comerciales.

Las variaciones de la fuerza iónica de los eluyentes constituyen un método para separar la ficocianina de la aloficocianina, pues ésta última sólo eluye en tampones con una alta fuerza iónica, en los que es estable (Rowan, 1989). Debido a esto, en el proceso de purificación no se detectó la presencia de aloficocianina ya que las

concentraciones del tampón empleado son bajas respecto a las necesarias para la elución de la aloficocianina (250 mM de tampón fosfato con 100 mM NaCl), aunque la aloficocianina siempre está presente aunque sea en muy bajas concentraciones.

La estructura básica de todas las ficobiliproteínas es un monómero $\alpha\beta$, compuesto por dos cadenas polipeptídicas desiguales que, en general, difieren ligeramente en sus pesos moleculares; las subunidades α son menores que las β y ambas se encuentran en un intervalo entre 12000 y 23000 daltons (Gantt, 1981; Cohen-Bazire & Bryant, 1982)

Los diferentes estados de agregación en los extractos de ficobiliproteínas dependen de la fuerza iónica, la concentración, la fuente de biliproteína y el pH (Glazer & Stryer, 1984). A un pH entre 6.5 y 8.0, la C-FC existe en solución predominantemente en forma de trímero $(\alpha\beta)_3$, con un peso molecular total de aproximadamente 110 000 daltons (Cohen-Bazire & Bryant, 1982), que resulta muy similar al obtenido en la C-FC de *Synechococcus* sp. IO9201: 102 955 daltons (Figura 4.7.1).

La electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida de la C-FC de *Synechococcus* sp. IO9201 reveló la presencia de tres bandas, con pesos moleculares de 19 000, 21 000 y 41 000 D (Figura 4.91). Basados en la estructura monomérica $\alpha\beta$, citada para la C-FC, y en los intervalos de pesos moleculares para cada una de las subunidades, las dos primeras bandas corresponden a las subunidades α y β , respectivamente, mientras que la tercera banda, con un peso molecular mucho mayor, no se corresponde con los intervalos descritos para éstas subunidades.

Analizando la composición polipeptídica de los ficobilisomas de varias especies de cianobacterias en gel de poliacrilamida se encontraron bandas correspondientes a polipéptidos de unión (no coloreados) que arbitrariamente se dividieron en dos grupos en función de su peso molecular: grupo I entre 70 000 y 120 000 D y grupo II entre 25 000 y 70 000 D (Tandeau de Marsac & Cohen-Bazire, 1977). Estos polipéptidos son verdaderos componentes del ficobilisoma según se demostró

en experiencias basadas en el fenómeno de adaptación cromática; existen en conjunción con la C-FC, migran con ella cuando se separan los componentes de un extracto de ficobiliproteínas; además, sus características espectrales, de sedimentación y de fluorescencia son las mismas, lo que demuestra su fuerte integridad funcional (Gantt, 1981).

En función de estos resultados, la tercera banda de la electroforesis de la C-FC de *Synechococcus* sp. IO9201 es un polipéptido de unión (no coloreado) del grupo II, por su peso molecular de 41 000 D. Se ha demostrado la presencia de estos péptidos en los ficobilisomas de *Synechococcus* sp. 6301 (Yamanaka *et al.*, 1978), de donde se aislaron y purificaron, determinándose la secuencia de aminoácidos y sus pesos moleculares, estando estos últimos entre 27 000 y 75 000 D. Por otra parte, en estudios sobre la estructura y composición de los ficobilisomas de *Synechococcus* sp. 6301 se han observado dos unidades en el núcleo, en vez de tres, y sólo C-FC en las varillas radiales y no C-FE. En cuanto a los componentes del ficobilisoma, analizados por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, se demostró que la estructura de las varillas consistía en las subunidades α y β y, además, se detectó la presencia de tres polipéptidos no coloreados (Glazer, 1983; Glazer, 1984; Glazer, 1985).

Separar las biliproteínas puras de los polipéptidos incoloros es difícil y se han citado casos en que éstos pigmentos retienen parte de éstos polipéptidos de enlace (Glazer, 1984). Se ha extraído C-FC de *Mastigocladus laminosus* sin la presencia de éstos polipéptidos mediante filtración en gel en 50% de ácido fórmico (Fuglistaller *et al.*, 1986). Realizando la extracción de las biliproteínas tanto en tampón fosfato 0.75 M a pH 7 como en tampón acetato de sodio 20 mM a pH 5.5 los polipéptidos de unión se mantienen específicamente asociados a las ficobiliproteínas e incluso modifican ligeramente sus propiedades espectrales (Tandeau de Marsac & Houmard, 1988).

Los polipéptidos del grupo II se encuentran en las varillas radiales del ficobilisoma y facilitan su enlace al núcleo o controlan y estabilizan las interacciones

entre las moléculas de ficocianina. Además, pueden ser necesarios para la formación de las estructuras periféricas (Cohen-Bazire & Bryant, 1982).

Aunque todas las ficobiliproteínas son proteínas ácidas con puntos isoelectricos en el intervalo de pH entre 4 y 5.5, todos los polipéptidos incoloros de los ficobilisomas de *Synechococcus* 6301 son básicos, lo cual sugiere que las interacciones entre los polipéptidos básicos y las biliproteínas ácidas podrían estabilizar significativamente el ensamblaje del ficobilisoma (Cohen-Bazire & Bryant, 1982).

El punto isoelectrico detectado para la C-FC de *Synechococcus* sp. IO9201 fue de 4.6 (Figuras 4.8.1 y 4.8.2), y coincide con el intervalo descrito anteriormente, lo que demuestra el carácter ácido de nuestra biliproteína.

El peso molecular de la C-FC de *Synechococcus* sp. IO9201, 102 000 D, es mayor que la simple suma del peso molecular de sus tres bandas; un resultado similar se obtuvo con la ficoeritrina de *Cryptomonas maculata*, lo que se interpretó como que alguna de las subunidades α ó β aparecía repetida en la secuencia (Mörschel & Wehrmeyer, 1977). De hecho, se ha señalado que la C-FC puede estar compuesta por n subunidades α y β , con n entre 1 y 6 (Rowan, 1989).

Se ha propuesto para las C-FC de las cianobacterias un peso molecular total de 120 000, con una estructura constituida por una unidad α y dos β (Gantt, 1981; Rowan, 1989). En el caso de la C-FC de *Synechococcus* sp. IO9201, teniendo en cuenta los pesos moleculares de las subunidades y el peso molecular total, se obtiene una buena aproximación si se considera una unidad α y dos β . Si se suman los pesos moleculares en función del modelo propuesto, considerando una subunidad α (18 975), dos subunidades β (42 716) más el aporte de los polipéptidos de unión (40 875), el resultado final se ajusta al valor de 102 000 del peso molecular de la proteína total.

Se ha establecido una nomenclatura para las subunidades de las ficobiliproteínas y sus polipéptidos asociados que representa las subunidades α y β con un supraíndice que corresponde al pigmento que se describe, en este caso PC por ser ficocianina,

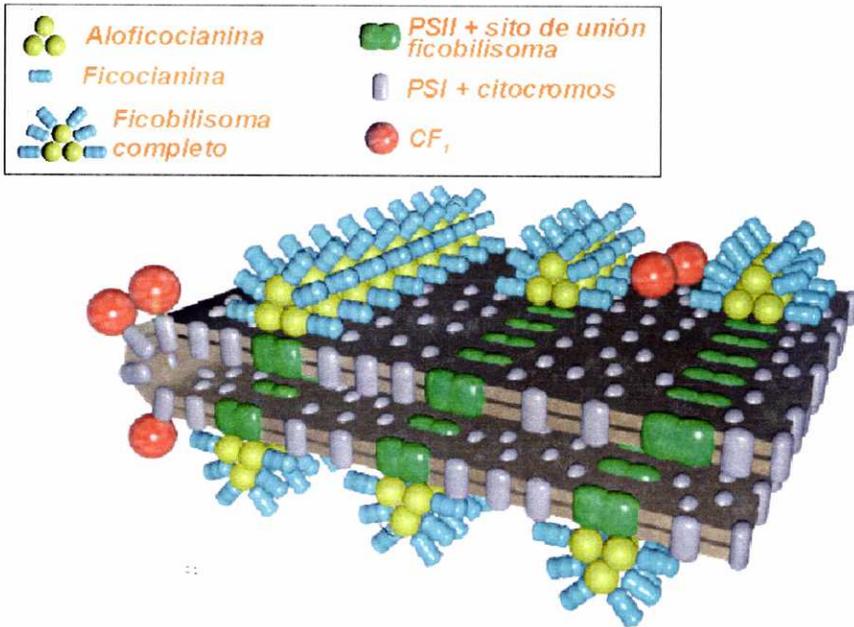


Figura 5.6.- Modelo estructural de la membrana tilacoideal con los ficobilisomas y sus componentes. Realizado a partir de Rowan, 1989.

incluidas ambas entre paréntesis, con un subíndice que indica el número de subunidades; a continuación va una L, que identifica al componente de los polipéptidos no coloreados (“rod linker polypeptides”), con un supraíndice que indica el valor del peso molecular expresado en kilodaltos y un subíndice que indica su situación en la estructura, R si es en las varillas radiales (“rods”), C si es en el núcleo (“core”) ó M si es en la membrana tilacoideal (thylakoid membrane) (Glazer, 1985). Utilizando esta nomenclatura, el ordenamiento de los componentes del ficobilisoma de *Synechococcus* sp. IO9201 es: $(\alpha^{\text{PC}}\beta^{\text{PC}})_3\text{L}_R^{41}$. Un modelo del ficobilisoma para esta especie se representa en la Figura 5.6 (Rowan, 1989).

Se sabe que los puntos isoeléctricos y los pesos moleculares de la proteína globular y de sus subunidades en las ficocianinas son muy similares. Estas características están de acuerdo con el alto grado de conservación de las propiedades

moleculares en esta clase de proteínas e incluso se extiende a la composición de aminoácidos (Rowan, 1989).

Una característica interesante a señalar respecto a la composición de aminoácidos es la ausencia de histidina de las subunidades β de la ficocianinas, mientras que está siempre presente en las subunidades α (Glazer & Fang, 1973). Esto explica las bajas concentraciones de histidina, en relación con el resto de los aminoácidos, en la ficocianina de *Synechococcus* sp. IO9201 (Tabla 4.0.1).

Debido a la considerable similitud entre la composición de aminoácidos de las subunidades α y β de la ficocianina, se sugiere un origen evolutivo común de éstas cadenas, como en el caso de las cadenas α y β de la hemoglobina (Glazer & Fang, 1973).

Estas similitudes no sólo existen entre las ficocianinas de organismos procarióticos sino, sino también en las de algas rojas, eucarióticas. Similitudes paralelas se han encontrado para las AFC y las FE (Glazer *et al.*, 1971b; Glazer *et al.*, 1971a). Esto probablemente puede atribuirse a los requerimientos estructurales para la agregación de las subunidades en los ficobilisomas (Brown *et al.*, 1979).

Al aislar los polipéptidos no coloreados de *Synechococcus* 6301 y determinar su composición de aminoácidos se encontró que tres de ellos, con pesos moleculares entre 27 y 33 kD, tenían una composición de aminoácidos similar aunque sus mapas peptídicos diferían, mientras que el polipéptido de mayor peso molecular, 45 kD no tenía ninguna relación con los anteriores (Yamanaka *et al.*, 1978).

La presencia de un polipéptido no coloreado en la C-FC de *Synechococcus* sp. IO9201 puede ser la causa de las diferencias en la composición de aminoácidos respecto a de la C-FC de *Synechococcus* sp. (Glazer & Fang, 1973); los valores de algunos aminoácidos, particularmente la alanina y la cisteína son mucho mayores (Tabla 5.3). Esta secuencia de aminoácidos guarda relación con el papel que cada

Tabla 6.3. Comparación en la proporción de la composición de aminoácidos de la C-FC de *Synechococcus* sp. IO9201 y *Synechococcus* sp.

Aminoácidos	<i>Synechococcus</i> sp. IO9201	<i>Synechococcus</i> sp. ¹
Histidina	1	1
Cisteína	49.6	1.3
Metionina	9.6	4.8
Prolina	13.4	10.0
Fenilalanina	9.6	10.3
Lisina	23.5	12.0
Tirosina	15.6	15.8
Isoleucina	12.1	16.3
Arginina	16.9	16.7
Valina	18.1	18.4
Treonina	18.3	20.6
Acido glutámico	24.7	21.0
Glicina	32.0	23.9
Serina	21.9	26.8
Leucina	31.1	29.3
Acido aspártico	27.9	38.4
Alanina	530.6	57.0
Triptófano	ND	1.4

¹ Según Glazer y Fang (1973)

ND: no determinado

proteína juega en el ficobilisoma y, en este sentido, los polipéptidos no coloreados contribuyen fundamentalmente a la estabilidad de la estructura.

A pesar de estas diferencias, la composición de aminoácidos de la C-FC de *Synechococcus* sp. IO9201 se ajusta en lo fundamental al mapa peptídico citado para otras especies de este género, tanto en el tipo de aminoácidos presentes como en sus proporciones relativas. Esto concuerda con el alto grado de conservación citado para las secuencias de aminoácidos en las ficobilioproteínas de las cianobacterias.

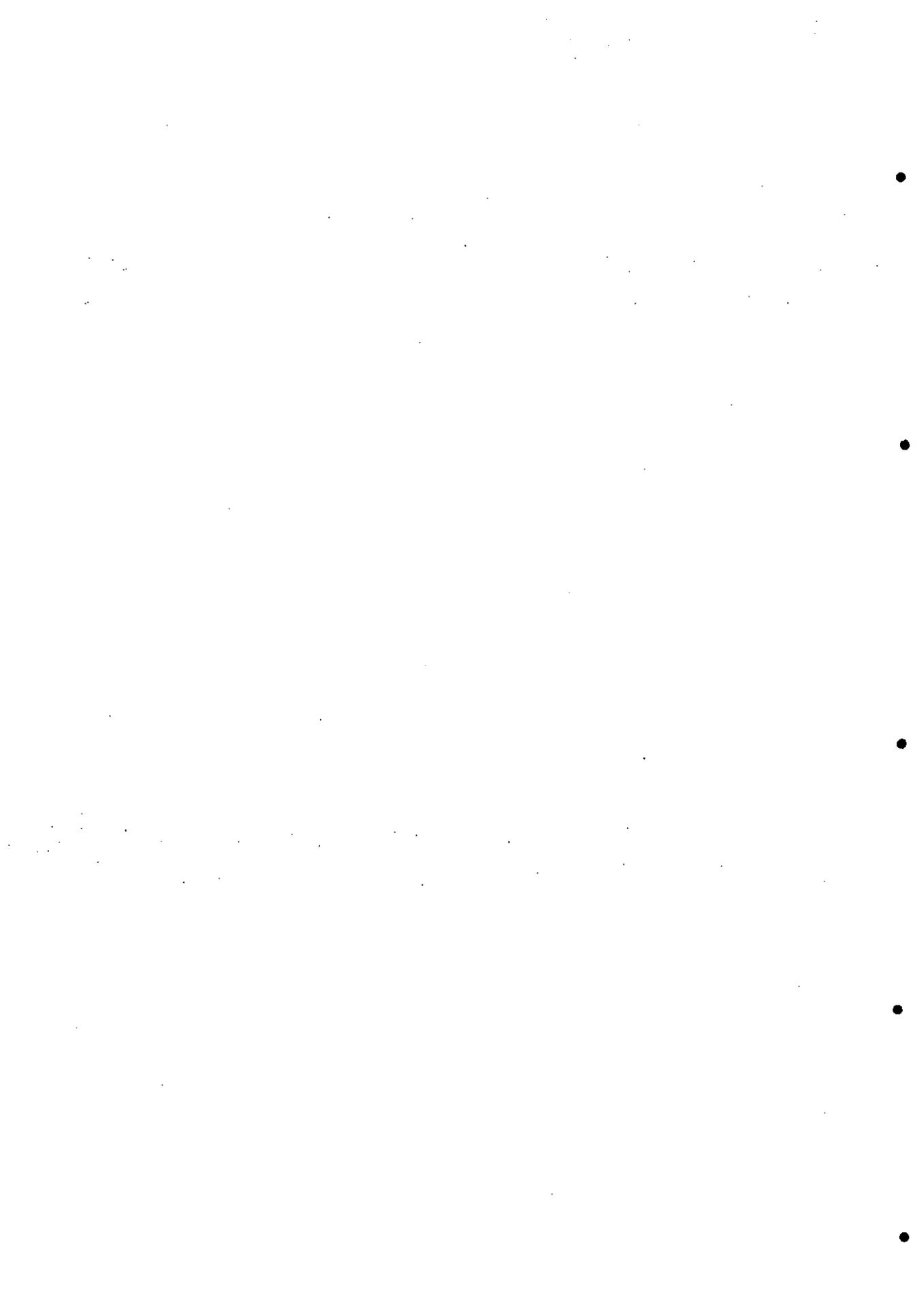
Los resultados obtenidos intentan proporcionar una base para el estudio de los pigmentos de esta cianobacteria marina como punto de partida de futuros trabajos,

ya que conseguir la utilización óptima de microalgas y cianobacterias marinas para la producción de cualquier compuesto requiere de un gran esfuerzo de investigación.

En este aspecto, si se toma como ejemplo la ya clásica *Spirulina platensis* se observa que desde la revisión de Vonshak y Richmond (1988) hace ya casi una década, los estudios para ampliar y mejorar su utilización no han cesado, aún cuando esta especie se cultiva comercialmente en varios países con una producción anual de varios cientos de toneladas. Sin embargo, el esfuerzo de investigación sobre esta cianobacteria ha continuado y, sólo teniendo en cuenta los resultados más recientes, se pueden citar las investigaciones con *S. platensis* en la caracterización, aislamiento y producción de nuevos exopolisacáridos (Filalimouhim *et al.*, 1993); el estudio de los efectos de la acumulación de oxígeno en su crecimiento (Marquez *et al.*, 1995) en conjunción con la luz (Vonshak *et al.*, 1996), los efectos del sustrato de carbono y la intensidad luminosa en el crecimiento y la formación de ficocianina (Chen *et al.*, 1996), los efectos del nitrógeno (Schlesinger *et al.*, 1996) e, incluso en el presente año, se continúan estudiando los efectos de la luz, el pH, la temperatura y los nutrientes en en su metabolismo lipídico (Funteu *et al.*, 1997).

Las especies de *Synechococcus* son objeto de una atención cada vez mayor y no hay duda de que muchas de ellas encierran potencialmente un extraordinario valor. En este sentido, esta tesis supone una contribución al estudio de una especie marina de *Synechococcus* (*Synechococcus* sp. IO9201) aislada en aguas cubanas, cuya explotación puede ser de particular importancia para la economía de Cuba.

6.- Conclusiones



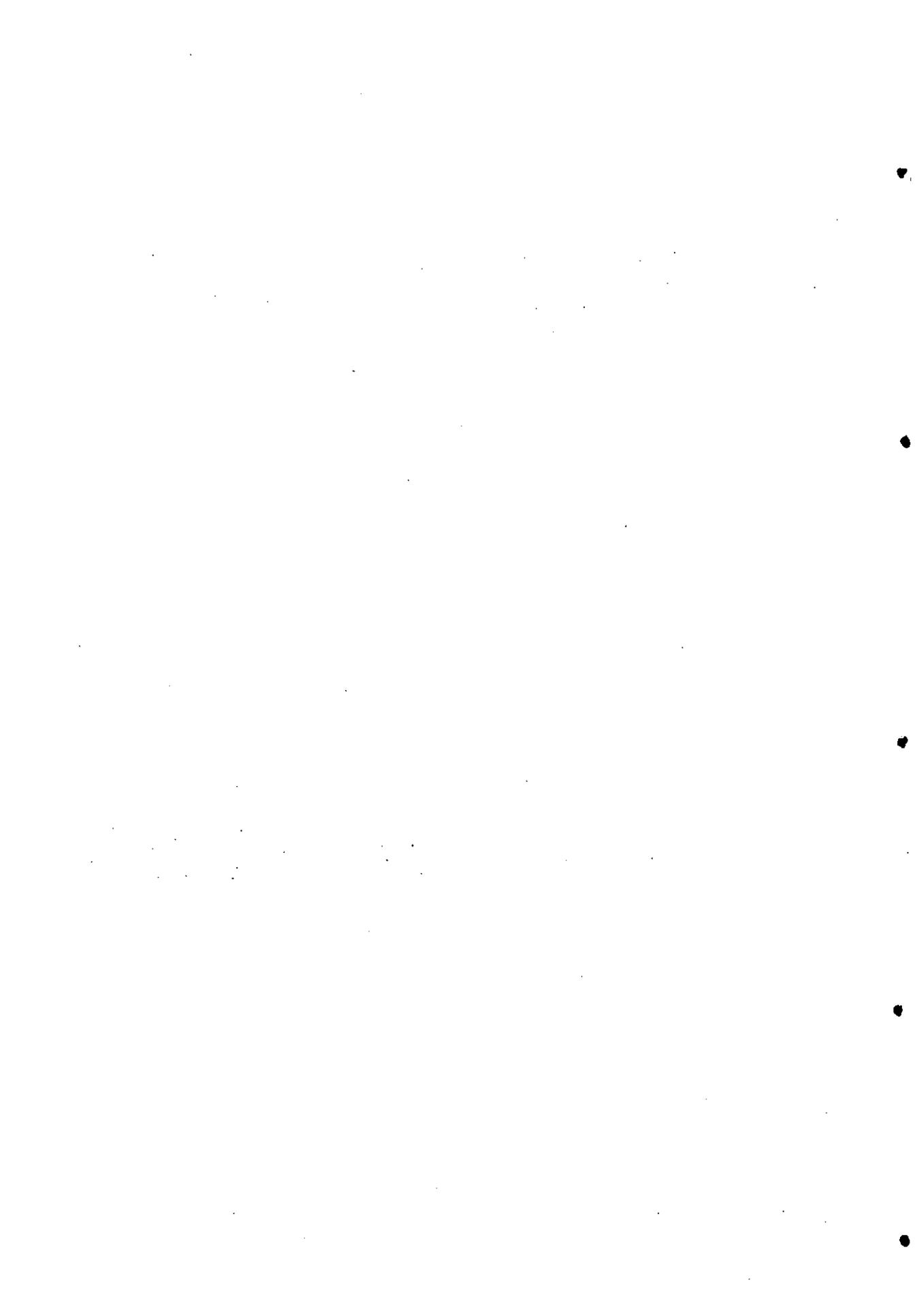
La mayor producción de biomasa de la cianobacteria marina *Synechococcus* sp. IO9201 y la máxima concentración de ficocianina se obtienen con valores de nitrógeno de 8mM, una relación N/P de 20:1 e iluminación con luz blanca.

Se ha conseguido obtener ficocianina con un alto grado de pureza utilizando extracción en solución alcalina por congelación y descongelación sucesiva y posterior purificación mediante cromatografía de interacción hidrofóbica y cromatografía de intercambio iónico.

Synechococcus sp. IO9201 pertenece al grupo de las cianobacterias que no poseen ficoeritrina, por lo que en las varillas radiales del ficobilisoma se encuentra sólo la ficocianina en su forma C-FC del tipo I. Esta ficocianina tiene una estructura $(\alpha^{PC}\beta^{PC})_3L_R^{41}$, es decir, está constituida una subunidad α de peso molecular 19000 D, dos β de 21000 D y al menos un polipéptido de enlace (no coloreado) con 41000 D.

Ficocianina producida por *Synechococcus* sp. 109201

7.- Bibliografía



- Ahlgren, G. (1988). Phosphorus as growth-regulating factor relative to other environmental factors in cultured algae. *Hydrobiol.* 170: 191-210.
- Alberte, R.S., Wood, A.M., Kursar, T.A. & Guillard, R.R.L. (1984). Novel phycoerythrins in marine *Synechococcus* spp.: characterization and evolutionary and ecological significance. *Plant Physiol.* 75: 732-739.
- Alvarez Cobelas, M. (1989). Lipids in microalgae. A review II. Environment. *Grasas Aceites* 40: 213-223.
- Alvarez Cobelas, M. & Gallardo, T. (1989). Una revisión sobre la biotecnología de las algas. *Bot. Complutensis* 15: 9-60.
- Allen, M.M., Hutchinson, F. & Weathers, P.J. (1980). Cyanophycin granule polypeptide (CGP) formation and degradation in the cyanobacterium, *Aphanocapsa* 6308. *J. Bacteriol.* 114: 687.
- Allen, M.M. & Hutchison, F. (1980). Nitrogen limitation and recovery in the cyanobacterium *Aphanocapsa* 6308. *Arch. Microbiol.* 128: 1-7.
- Allen, M.M. & Smith, A.J. (1969). Nitrogen chlorosis in blue-green algae. *Arch. Mikrobiol.* 69: 114-120.
- Allen, M.M. & Weathers, P.J. (1980). Structure and composition of cyanophycin granules in the cyanobacterium *Aphanocapsa* 6308. *J. Bacteriol.* 114: 959.
- Arnon, D.I., McSwain, B.D., Tsujimoto, H.Y. & Wada, K. (1974). Photochemical activity and components of membrane preparations from blue-green algae: I. Coexistence of two photosystems in relation to chlorophyll a and removal of phycocyanin. *Biocim. Biophys. Acta.* 357: 231-245.
- Barkholt, V. & Jensen, A.L. (1989). Amino acid analysis: determination of cysteine plus half-cystine in proteins after hydrochloric acid hydrolysis with a disulfide compound as additive. *Anal. Biochem.* 177: 318-322.

- Bayer, M.G. & Schenk, H.E.A. (1986). Biosynthesis of proteins in *Cyanophora paradoxa*. I. Protein import into the endocyanelle analyzed by micro two-dimensional gel-electrophoresis. *Endocyt. Cell Res.* 3: 197-202.
- Beale, S. & Cornejo, J. (1991). Biosynthesis of phycobilins. *The Journal of Biological Chemistry* 266: 22341-22345.
- Becker, E.W. (1994). **Microalgae. Biotechnology and Microbiology.** Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Becker, E.W. & Venkataraman, L.V. (1982). Biotechnology and Exploitation of Algae. The Indian Approach. *Deutsche Gesellschaft Für Technische Zusammenarbeit GmbH. Eschborn. F.R.G.* : 216.
- Ben-Amotz, A., Tornabene, T.G. & Thomas, W.H. (1985). Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. *J. Phycol.* 21: 72-81.
- Biswal, B., Smith, A.J. & Rogers, L.J. (1994). Changes in carotenoids but not in D1 protein in response to nitrogen depletion and recovery in cyanobacterium. *FEMS-MICROBIOL-LETT* 166: 341-348.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J. (1959). Lipid extraction. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.
- Borowitzka, M.A. (1988). Vitamins and fine chemicals from micro-algae. In: Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. (eds.). **Micro-algal Biotechnology.** Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp: 153-196.
- Boussiba, S. & Richmond, A.E. (1980). C-phycocyanin as a storage protein in the blue-green algae *Spirulina platensis*. *Arch. Microbiol.* 125: 143-147.
- Brown, A.S., Offner, G.D., Ehrhardt., M.M. & Troxler, E.F. (1979). Phycobilin-apoprotein linkages in the α y b subunits of phycocyanin from the unicellular rhodophyte, *Cyanidium caldarium*. *Journal of Biological Chemistry* 254: 7803-7811.
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W. & Garland, C.D. (1989). Nutritional aspects of microalgae used in mariculture; a literature review. *Rep. CSIRO Mar. Lab.*, : 50.

- Bryant, D.A. (1982). Phycoerythrin and phycocyanin: Properties and occurrence in cyanobacteria. *J.Gen.Microbiol.* 128: 835-844.
- Bryant, D.A., Cohen-Bazire, G. & Glazer, A.N. (1981). Characterization of the biliproteins of *Gloeobacter violaceus*. Chromophore content of a cyanobacterial phycoerythrin carrying phycourobilin chromophore. *Arch. Microbiol.* 129: 190-198.
- Bryant, D.A., Glazer, A.N. & Eiserling, F.A. (1976). Characterization and structural properties of major biliproteins of *Anabaena* sp. *Arch.Microbiol.* 110: 61-75.
- Bryant, D.A., Guglielmi, G., Tandeau de Marsac, N. & Castets, Cohen-Bazire, G. (1979). The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model. *Arch. Microbiol.* 123: 113-127.
- Bryant, D.A., Hixson, C.S. & Glazer, A.N. (1978). Structural studies on phycobiliproteins. III. Composition of bilin-containing peptides from the β subunits of C-phycocyanin, R-phycocyanin and phycoerythrocyanin. *J.Biol.Chem.* 253: 220-225.
- Cannell, R.J.P., Kellam, S.J., Owsianka, A.M. & Walker, J.M. (1987). Microalgae and cyanobacteria as a source of glycosidase inhibitors. *Journal of General Microbiology* 133: 1701-1705.
- Cannell, R.J.P., Kellam, S.J., Owsianka, A.M. & Walker, J.M. (1988). Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. *Planta Medica* 54: 10-14.
- Carmichael, W.W. (1992). Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology.* 72: 445-459.
- Carr, N.G. (1988). Nitrogen reserves and dynamic reservoirs in cyanobacteria. *In:* Rogers, L.J. & Gallon, J.R. (eds.). **Biochemistry of the algae and cyanobacteria**. Clarendon Press, Oxford, pp: 13-21.

- Cembella, A.D., Antia, N.J. & Harrison, P.J. (1984). The utilization of inorganic and organic phosphorus compounds as nutrients by eukariotic microalgae: a multidisciplinary perspective. Part 2. *Crit. Rev. Microbiol.* 11: 13-117.
- Cohen, Z. (1986). Products of microalgae. *In: Richmond, A. (ed.). Handbook of Microalgae Mass Culture.* C.R.C. Press., Boca Raton, Florida, pp: 421-454.
- Cohen-Bazire, G. & Bryant, D. (1982). Phycobilisomes: composition and structure. *In: Carr, N. & Whitton, B. (eds.). The Biology of the Cyanobacteria.* Blackwell, New York, pp: 143-191.
- Coleman, L.W., Rosen, B.H. & Schwartzbach, S.D. (1988). Preferential loss of chloroplast proteins in nitrogen deficient *Euglena*. *Plant Cell Physiol.* 29: 1007-1014.
- Collier, J.L. & Grossman, A.R. (1992). Chlorosis induced by nutrient deprivation in *Synechococcus* sp Strain PCC 7942: not all bleaching is the same. *J. Bacteriol.* 174: 4718-4726.
- Collier, J.L. & Palenik, B.P. (1996). Urea utilization by marine *Synechococcus*. *J. Phycol.* 31: 12.
- Collins, C.D. & Boylen, C.W. (1982). Physiological responses of *Anabaena variabilis* (Cyanophyceae) to instantaneous exposure to various combinations of light intensity and temperature. *J. Phycol.* 18: 206-211.
- Chapman, D.J. (1973). *The biology of blue green Algae.* Univ. California Press, Berkely.
- Chapman, D.J., Cole, W.J. & Siegelman, H.W. (1968). Phylogenetic implications of phycocyanobilin and C-phycocyanin. *Amer. J. Bot.* 55: 314-316.
- Chen, F., Zhang, Y. & Guo, S. (1996). Growth and phycocyanin formation of *Spirulina platensis* in photoheterotrophic culture. *Biotechnology Letters.* 18: 603-608.
- Darley, W.M. (1982). *Algal Biology: A Physiological Approach.* Blackwell Scientifcan Publication

- Dubinsky, Z. & Aaronson, S. (1979). Increase of lipid yields from some algae by acid extraction. *Phytochemistry* 18: 51-52.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Annal. Chem* 28: 350-356.
- Emdadi, D. & Berland, B. (1989). Variation on lipid class composition during batch growth of *Nannochloropsis salina* and *Pavlova lutheri*. *Mar. Chem.* 26: 215-225.
- Eppley, R.W. & Peterson, B.J. (1979). Particulate organic matter flux and planktonic new production in deep ocean. *Nature* 282: 677-680.
- Fábregas, J., Abalde, J., Cabezas, B. & Herrero, C. (1989a). Changes in protein, carbohydrates and gross energy in the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) by nitrogen concentrations as nitrate, nitrite and urea. *Aquacult. Eng.* 8: 223-239.
- Fábregas, J., Abalde, J. & Herrero, C. (1989b). Biochemical composition and growth of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with different ammonium nitrogen concentrations as chloride, sulphate, nitrate and carbonate. *Aquaculture* 83: 289-304.
- Fábregas, J., Abalde, J., Herrero, C., Cabezas, B. & Veiga, M. (1984). Growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. *Aquaculture* 42: 207-215.
- Fábregas, J., Herrero, C., Cabezas, B. & Abalde, J. (1985). Mass culture and biochemical variability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* Kylin (Butch) with high nutrient concentrations. *Aquaculture* 49: 231-244.
- Falkowski, P.G. & Owens, T.G. (1978). Effects of light intensity on photosynthesis and dark respiration in six species of marine phytoplanton. *Mar. Biol.* 45: 289-295.
- FAO/WHO (1973). **Amino acid content of foods and biological data on proteins.**, Roma, Italy.

- Fay, P. (1983). **The Blue-greens (Cyanophyta-Cyanobacteria)**. *Studies in Biology*. Edward Arnold (Publishers) Ltd., London.
- Fernández-Reiriz, M.J., Perez-Camacho, A., Ferreiro, M.J., Blanco, J., Planas, M., Campos, M. & Labarta, U. (1989). Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture* 83: 17-37.
- Filalimouhim, R., Corner, J.-F., Fontainet, T., Fournet, B. & Dubertret, G. (1993). Production, isolation and preliminary characterization of the exopolysaccharide of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Biotechnology Letters* 15: 567-572.
- Fogg, G.E., Stewart, W.D.P., Fay, P. & Walsby, A.E. (1973). **The Blue-Green Algae**. Academic Press, New York.
- Foy, R.H. (1993). The phycocyanin to chlorophyll a ratio and cell components as indicators of nutrient limitation in two planktonic cyanobacteria subjected to low-light exposures. *Journal of Plankton Research* 15: 1263-1276.
- Frank, G., Silder, W., Widmer, H. & Zuber, H. (1978). The complete amino acid sequence of both subunits of C-phycocyanin from the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Physiol. Chem.* 359: 1491-1507.
- Friedmann, E.I. & Borowitzka, L.J. (1982). The simposium on taxonomic concepts in blue green algae: towards a compromise with the bacteriological code? *Taxon* 3: 673-683.
- Fuglistaller, F., Suter, F. & Zuber, H. (1986). Linker polypeptides of phycobilisomes from the cyanobacterium, *Mastigocladus laminosus*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* 367: 601-614.
- Fuglistaller, P., Widmer, H., Silder, W., Frank, G. & Zuber, H. (1981). Isolation and characterization of phycoerythrocyanin and chromatic adaptation of thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Arch. Microbiol.* 129: 268-274.

- Funchs, H.J., Macdowell, J. & Sheillito, J.E. (1988). Use of phycocyanin allows quantitative description by flow cytometry of alveolar macrophage surface antigens present in low numbers of cells. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138: 1124-1128.
- Funteu, F., Guet, C., Wu, B. & Trémolières, A. (1997). Effects of environmental factors on lipid metabolism in *Spirulina platensis*. *Plant. Physiol. Biochem.* 35: 63-71.
- Gantt, E. (1981). Phycobilisomes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32: 327-347.
- Geider, R.J. & Osborne, B.A. (1992). **Algal photosynthesis**. Chapman and Hall, Inc., London.
- Ginzburg, M. (1987). *Dunaliella*: a green alga adapted to salt. *Adv. Bot. Res.* 14: 95-184.
- Glazer, A.N. (1981). Photosynthetic accessory proteins with bilin prosthetic groups. In: Conn, E.E. & Stumpf, P.K. (eds.). **The Biochemistry of Plants**, vol: 8. Academic Press Inc., New York, pp: 51-96.
- Glazer, A.N. (1983). Comparative biochemistry of photosynthetic light-harvesting systems. *Annu. Rev. Biochem.* 52: 125-157.
- Glazer, A.N. (1984). Phycobilisome. A macromolecular complex optimized for light-energy transfer. *Biochim. Biophys. Acta.* 786: 28-51.
- Glazer, A.N. (1985). Light harvesting by phycobilisomes. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 14: 47-77.
- Glazer, A.N. (1988). The phycobilisomes. In: Packer, L. & Glazer, A.N. (eds.). **Methods enzymol.**, vol: 167. Academic Press, Inc., California, pp: 304-312.
- Glazer, A.N. (1989). Light guides. *J. Mol. Biol.* 264: 1-4.
- Glazer, A.N. (1994). Phycobiliproteins - a family of valuable, widely used fluorophores. *J. Appl. Phycol.* 6: 105-112.
- Glazer, A.N. & Bryant, D.A. (1975). Allophycocyanin B (λ_{max} 671,618 nm). A new cyanobacterial phycobiliprotein. *Arch. Microbiol* 104: 15-22.

- Glazer, A.N., Cohen-Bazire, G. & Stanier, R.Y. (1971b). *Proc. Nat. Acad. Sci.* 68: 3005-3008.
- Glazer, A.N., Cohen-Bazire, G. & Stanier, R.Y. (1971a). *Arch. Microbiol.* 80: 1-18.
- Glazer, A.N. & Fang, S. (1973). Formation of hybrid proteins from the α and β subunits of phycocyanins of unicellular and filamentous blue-green algae. *Journal of Biological Chemistry* 248: 663-671.
- Glazer, A.N. & Stryer, L. (1983). Fluorescent tandem phycobiliprotein conjugates. *J. Biophys.* 43: 383-386.
- Glazer, A.N. & Stryer, L. (1984). Phycofluor probes. *Trends Biochem.* 9: 423-427.
- Glazer, N. (1982). Phycobilisomes: Structure and dynamics. *Annu. Rev. Microbiol.* 36: 173-198.
- Glover, H.G. (1985). The physiology and ecology of the marine cyanobacterial genus *Synechococcus*. *Advances in Aquatic Microbiology.* 3: 50-106.
- Gnaiger, E. & Bitterlich, G. (1984). Proximate biochemical composition and caloric content calculated from elemental CHN analysis: a stoichiometric concept. *Oecologia* 62: 289-298.
- Grabowski, J. & Grantt, E. (1978). Photophysical properties of phycobiliproteins from phycobilisomes: fluorescence lifetimes, quantum yields, and polarisation spectra. *Photochem. PhotoBiol.* 28: 39-45.
- Grant, E. (1981). Phycobilisomes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32: 327-347.
- Grobbellar, J.U. & House, W.A. (1995). Phosphorus as a limiting resource in inland waters; interactions with nitrogen. *In: Tiessen, H. (ed.). Phosphorus in the Global Environment.* John Wiley Sons Ltd., pp: 255-273.
- Grossman, A.R., Chiang, G.G. & Collier, J.L. (1993). The phycobilisome, a light-harvesting complex to enviromental conditions. *Microbiol. Reviews* 57: 725-749.

- Grossman, A.R., Lemaux, P.G. & Conley, P.B. (1986). Regulated synthesis of phycobilisome components. *Photochem. Photobiol.* 44: 827-837.
- Gustafson, K.R., Cardellina II, J.H., Fuller, R.W., Weislow, O.S., Kiser, K.M., Patterson, G.M.L. & Boyd, M.R. (1989). AIDS-antiviral sulfolipids from cyanobacteria (Blue-Green Algae). *Journal of National Cancer Institute* 81: 1254-1258.
- Hall, D.O. (1986). The production of biomass: a challenge to our society. *In*: Richmond, A. (ed.). **Handbook of Microalgal Mass Culture**. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp: 1-23.
- Hall, D.O. & Rao, K.K. (1994). Photosynthesis. **Photosynthesis**, Fifth edn. Cambridge Univ. Press, pp: 4-7, 23.
- Harris, E.L.V. & Angal, S. (1989). **Protein Purification Methods. A practical approach**. IRL Press. Oxford University Press, Oxford.
- Hauschild, C.A., McMurter, H.J.G. & Pick, F.R. (1991). Effect of spectral quality on growth and pigmentation of picocyanobacteria. *J. Phycol.* 27: 698-702.
- Healey, F.P. (1975). Physiological indicators of nutrient deficiency in algae. *Can. Fish. Mar. Ser. Res. Dev. Tech. Rep.* : 30.
- Henderson, R.J. & Sargent, J.R. (1989). Lipid composition and biosynthesis in ageing cultures of the marine cryptomonad, *Chroomonas salina*. *Phytochem.* 28: 1355-1361.
- Herbert, D., Phipps, P.J. & Strage, R.E. (1971). Chemical analysis of microbial cells. *In*: Norris, J.R. & Ribbons, D.W. (eds.). **Method of Enzimol.**, vol: 58. Academic Press, pp: 209-344.
- Herrera, A., Boussiba, S., Napoleone, V. & Hohlberg, A. (1989). Recovery of c-phycocyanin from the cyanobacterium *Spirulina maxima*. *J. Appl. Phycol.* 1: 325-331.

- Herrero, C., Cid, A., Fábregas, J. & Abalde, J. (1991). Yields in biomass and chemical constituents of four commercially important marine microalgae with different culture media. *Aquacult. Eng.* 10: 99-110.
- Herzig, R. & Falkowski, P. (1989). Nitrogen limitation in *Isochrysis galbana* (Haptophyceae). I. Photosynthetic energy conversion and growth efficiencies. *J. Phycol.* 25: 462-471.
- Hill, D.R.A. & Rowan, K.S. (1989). The biliproteins of the Cryptophyceae. *Phycologia* 28: 455-463.
- Hipkin, C.R. & Syrett, P.J. (1977). Some effects of nitrogen-starvation on nitrogen and carbohydrate metabolism in *Ankistrodesmus braunii*. *Planta* 133: 209-214.
- Hirose, H., Kumano, S. & Madono, K. (1969). Spectroscopic studies on phycoerythrins from Cyanophycean and Rhodophycean algae with special reference to their phylogenetical relations. *Bot. Mag. (Tokyo)* 82: 197-203.
- Holland, D.L. & Gabbott, P.A. (1971). A micro-analytical scheme for the determination of protein, carbohydrate, lipid and RNA levels in marine invertebrate larvae. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 51: 659-668.
- Honsell, E., Kosovel, V. & Talarico, L. (1984). Phycobilin distribution in Rhodophyta: Studies and interpretation on basis of their absorption spectra. *Bot. Mar.* 27: 1-16.
- Humm, H.J. & Wicks, S.R. (1980). **Introduction and guide to the marine bluegreen algae.** John Wiley and Sons.
- Iijima, N., I. F., Shimamatsu, H. & Katoh, S. (1982) **Antitumor agent and method of treatment therewith.** , US patent.
- Jensen, T.E. (1993). Cyanobacterial ultrastructure. In: Berner, T. (ed.). **Ultrastructure of Microalgae.** CRC Press, Boca Raton.
- Jones, L.W. & Galloway, R.A. (1979). Effect of light quality and intensity on glycerol content of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) and the relationship to cell growth/osmoregulation. *J. Phycol.* 15: 101-106.

- Jung, T.M. & Dailey, M.O. (1989). A novel and inexpensive source of allophycocyanin for multicolour flow cytometry. *J. Immunol. Methods*. 121: 9-18.
- Kana, T.M., Feirvel, N.L. & Flynn, L.C. (1992). Nitrogen starvation in marine *Synechococcus* strains: clonal differences in phycobiliprotein breakdown and energy coupling. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 88: 75-82.
- Kana, T.M. & Glibert, P.M. (1987). Effects of irradiances up to $2000\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ on marine *Synechococcus* WH7803. I. Growth, pigmentation, and cell composition. *Deep Sea Res.* 34: 479-495.
- Kana, T.M., Glibert, P.M., Goericke, R. & Welschmeyer, N.A. (1988). Zeaxanthin and β carotene in *Synechococcus* WH7803 respond differently to irradiance. *Limnol. Oceanogr.* 33: 1623-1627.
- Kaplan, D., Cohen, Z. & Abeliovich, A. (1986). Optimal growth conditions for *Isochrysis galbana*. *Biomass* 9: 37-48.
- Kaufman, Z.G., Lively, J.S. & Carpenter, E.J. (1983). Uptake of nitrogenous nutrients by phytoplankton in Barrier Island Estuary: Great South Bay. *Estuarine Coastal Shelf Sci.* 17: 483-493.
- Kirk, J.T. (1994). **Light Photosynthesis in aquatic system**, Second edn. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Kochert, G. (1978). Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric method. *In*: Hellebust, J. & Craigie, J. (eds.). **Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods**. Cambridge University Press, London, pp: 95-97.
- Kolber, Z., Zehr, J. & Falkowski, P.G. (1988). Effects of growth irradiance and nitrogen limitation on photosynthetic energy conversion in photosystem II. *Plant Physiol.* 88: 923-929.
- Kowallik, W. (1987). Blue light effects on carbohydrate and protein metabolism. *In*: Senger, H. (ed.). **Blue light responses**, vol. I. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp: 8-13.

- Kremer, B.P. (1988). Electrophoretic separation and spectral characterization of algal phycobiliproteins. *In*: Lobban, C.S., Chapman, D.J. & Kremer, B.P. (eds.). **Experimental Phycology. A Laboratory Manual**. Cambridge university Press.
- Kumazawa, S. & Mitsui, A. (1994). Efficient hydrogen photoproduction by synchronously grown cells of a marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. Miami BG 043511, under high cell density conditions. *Biotechnology and Bioengineering* 44: 854-858.
- La Roche, J., Geider, R.J., Graziano, L.M., Murray, H. & Lewis, K. (1993). Induction of specific proteins in eukaryotic algae grown under iron-, phosphorus-, or nitrogen-deficient conditions. *J. Phycol.* 29: 767-777.
- Lagarias, J.C., Klotz, A.V., Dallas, J.L., Glazer, A.N., Bishop, J.E., O'Connell, J.F. & Rapoport, H. (1987). Exclusive A-ring linkage for singly attached phycocyanobilins and phycoerythrobilins in phycobiliproteins. *The Journal of Biological Chemistry* 263: 12977-12985.
- Lau, R.H., Mackenzie, M.M. & Doolittle, W.F. (1977). Phycocyanin synthesis and degradation in the blue-green bacterium *Anacystis nidulans*. *J. Bact.* 132: 771-778.
- Lee, T., Tsuzuki, M., Takeuchi, T., Yokoyama, K. & Karube, I. (1994). In vivo fluorometric method for early detection of cyanobacterial waterblooms. *Journal of Applied Phycology* 6: 489-495.
- Lemasson, C., Tandeau de Marsac, N. & Cohen-Bazire, G. (1973). Role of allophycocyanin as a light-harvesting pigment in cyanobacteria. *Proc. natn. Acad. Sci. USA.* 70: 3130-3133.
- Levi, C. & Preiss, J. (1976). Regulatory properties of the ADP-glucose pyrophosphorylase of the blue-green bacterium *Synechococcus* 6301. *Plant Physiol.* 58: 753-756.

- Lewitus, A.J. & Caron, D.A. (1990). Relative effects of nitrogen and phosphorus depletion and light intensity on the pigmentation, chemical composition and volume of *Pyrenomonas salina* (Cryptophyceae). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 61: 171-181.
- Lundell, D.J. & Glazer, A.N. (1981). Allophycocyanin B. A common β subunit in *Synechococcus* allophycocyanin B (λ_{\max} 670nm) and allophycocyanin (λ_{\max} 650nm). *J. Biol. Chem.* 256: 12600-12606.
- Luo, Y.H. & Mitsui, A. (1994). Hydrogen production from organic substrates in an aerobic nitrogen-fixing marine unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain Miami BG 043511. *Biotechnology and Bioengineering* 44: 1255-1260.
- MacColl, R. & Guard-Friar, D. (1987). **Phycobiliproteins**. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- Madueño, F., Flores, E. & Guerrero, M.G. (1987). Competition between nitrate and nitrite uptake in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta* 896: 109-112.
- Marie, D., Vaulot, D. & Partensky, F. (1996). Application of the novel nucleic acid dyes YOYO-1, YOPRO-1, and picogreen for flow cytometric analysis of marine prokaryotes. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1649-1655.
- Marquez, F.J., Sasaki, K., Nishio, N. & Nagai, S. (1995). Inhibitor effect of oxygen accumulation on the growth of *Spirulina platensis*. *Biotechnology Letters* 17: 225-228.
- Marshak, D.R., Kadonaga, J.T., Burgess, R.R., Knuth, M.W., Brennan, W.A. & Lin, S.-H. (1996). Hydrophobic interactions chromatography. **Strategies for protein purification and characterization. A laboratory course manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, United States of America, pp: 396.
- Matsunaga, T. & Takeyama, H. (1995). Genetic engineering in marine cyanobacteria. *Journal of Applied Phycology* 7: 77-84.

- Matsunaga, T., Takeyama, H., Sudo, H., Oyama, N., Ariura, S., Takano, H., Hirano, M., Burgess, J.G., Sode, K. & Nakamura, N. (1991). Glutamate production from CO₂ by marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. using a novel biosolar reactor employing light-diffusing optical fibers. *Applied Biochem. Biotechnol.* 28/29: 157-167.
- Mianmanus, R. (1984). Metamorphosis of *Strombusgigos* (Lime) and *Aphasia brasiliiana*(Rug) in laboratory cultures. *J. Shellfish. Res.* 4: 95.
- Mörschel, E. & Wehrmeyer, W. (1977). Multiple forms of phycoerythrin - 545 from *Cryptomonas maculata*. *Arch. Microbiol.* 113: 83-89.
- Morse, A.N.C., Fragg, C.A. & Morse, D. (1984). Molecules from cyanobacteria and red algae that induce larval settlement and metamorphosis in the mollusc *Haliotes sufescens*. *Mar. Biol.* 81: 293-298.
- Murata, N. & Higashi, S. (1993). An in vivo study of substrate specificities of acyl-lipid desaturases and acyltransferases in lipid synthesis in *Synechocystis* PCC 6803. *Plant Physiol.* 102: 1275-1278.
- Myers, J. (1980). On the algae: thoughts about physiology and measurements of efficiency. In: Falkowski, P.G. (ed.). **Primary Productivity in the Sea**. Plenum Press, pp: 1-15.
- Nakamoto, H. (1995). Targeted inactivation of the gene *psal* encoding a subunit of photosystem I of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* 36: 1579-1587.
- Newman, J., Wyman, M. & Carr, N.G. (1987). Absence of the nitrogen reserve polymer cyanophycin from *Synechococcus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 44: 221-224.
- Nies, M. & Wehrmeyer, W. (1980). Isolation and biliprotein characterization of phycobilisomes from the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus* Cohn. *Planta* 150: 330-337.

- Noüe, J. & Pauw, N. (1988). The potential of microalgal biotechnology: a review of production and uses of microalgae. *Biotech Adv.* 6: 725-770.
- Odum, E.P. (1971). *Fundamentals of ecology.*, 3 edn. Saunders College Publishing., Philadelphia.
- Oi, V.T., Glazer, A.N. & Stryer, L. (1982). Fluorescent phycobiliprotein conjugates for analyses of cells and molecules. *J. Cell. Biol.* 93: 981-986.
- Omata, T. (1995). Structure, function and regulation of the nitrate transport system of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7972. *Plant Cell Physiol.* 36: 207-213.
- Patente, n° 79-138755(1981) **Cosmetics containing water soluble phycocyanin.** Dainippon Ink. and Chemicals Inc., Japan
- Patente, n° JP58065216-A-830418(1983) **Antitumoral agents containing phycobilin also used to treat ulcers and hemorrhoidal bleeding.** Dainippon Ink and Chemicals and Tokyo Kenkyukai.
- Perry, M.J., Talbot, M.C. & Alberte, R.S. (1981). Photoadaptation in marine phytoplankton: response of the photosynthetic unit. *Mar. Biol.* 62: 91-101.
- Phlips, E.J., Zeman, C. & Hansen, P. (1989). Growth, photosynthesis, nitrogen fixation and carbohydrate production by a unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. (Cyanophyta). *J. Appl. Phycol.* 1: 137-145.
- Pinsky, B.G., Ladasky, J., Lakowicz, J.R., Berndt, K. & Hoffman, R.A. (1993). Phase resolve fluorescence lifetime measurements for flow cytometry. *Cytometry* 14: 123-135.
- Piorreck, M., Baasch, K.H. & Pohl, P. (1984). Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue green algae under different nitrogen regimes. *Phytochem* 23: 207-216.
- Prézelin, B.B. (1982). Effects of light intensity on aging of the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Mar. Biol.* 69: 129-135.

- Price, N.M., Cochlan, W.P. & Harrison, P.J. (1985). Time course of uptake of inorganic and organic nitrogen by phytoplankton in the Strait of Georgia: comparison of frontal and stratified communities. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 27: 39-53.
- Rajasekaran, T., Somasekaran, T. & Venkataraman, L.V. (1981). Standardized procedures for pilot plant scale. Cultivation of *Spirulina platensis* under Indian conditions. *Arch. Hidrobiol.* 22: 114-126.
- Raven, J.A. (1984). A cost-benefit analysis of photon absorption by photosynthetic unicells. *New Phytol.* 98: 593-625.
- Raven, J.A. (1988). Limits to growth. In: Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. (eds.). **Micro-algal Biotechnology**. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp: 331-356.
- Rhee, G. & Gotham, I.J. (1980). Optimum N-P ratios and the coexistence of planktonic algae. *J. Phycol.* 16: 486-488.
- Richmond, A. (1986a). Cell response to environmental factors. In: Richmond, A. (ed.). **Handbook of Microalgal Mass Culture**. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp: 69-99.
- Richmond, A. (1990). Large scale microalgal culture and applications. *Prog. Phycol. Res.* 7: 1-62.
- Richmond, A. & Becker, E.W. (1986). Technological aspects of mass cultivation: a general outline. In: Richmond, A. (ed.). **Handbook of Microalgal Mass Culture**. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp: 245-263.
- Richmond, A.E. (1986b). Microalgal culture. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 4: 369-438.
- Rodriguez, H. & Guerrero, M.G. (1992). Products and uses of cyanobacteria (blue-green algae). In: Villa, T.G. & Abalde, J. (eds.). **Profiles on Biotechnology**. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, pp: 247-260.

- Romero, J.M., Coronil, T., Lara, C. & Guerrero, M.G. (1987). Modulation of nitrate uptake in *Anacystis nidulans* by the balance between ammonium assimilation and CO₂ fixation. *Arch. Biochim. Biophys.* 256: 578-584.
- Romero, J.M., Flores, E. & Guerrero, M.G. (1985). Inhibition of nitrate utilization by amino acids in intact *Anacystis nidulans* cells. *Arch. Microbiol.* 142: 1-5.
- Rowan, K.S. (1989). The biliproteins. **Photosynthetic pigments of algae**. Cambridge University Press, New York, pp: 166-210.
- Saila, S.B., Recksiek, C.W. & Prager, M.H. (1988). Basic fishery science programs. A compendium of microcomputer programs and manual operation. *Developments in aquaculture and fisheries science* 18: 346.
- Sánchez-Saavedra, M.P. & Voltolina, D. (1996). Effect of blue-green light on growth rate and chemical composition of three diatoms. *J. Appl. Phycol.* 8: 131-136.
- Schanz, F. & Zahler, U. (1981). Prediction of algal growth in batch cultures. *Schweiz. Z. Hydrol.* 43: 103-113.
- Schenk, H.E.A., Bayer, M.G. & Maier, T. (1987). Nitrate assimilation and regulation of biosynthesis and desintegration of phycobiliproteins by *Cyanophora paradoxa*. Indications for a nitrogen store function of the phycobiliproteins. *Endocyt. Cell Res.* 4: 167-176.
- Schlesinger, P., Belkin, S. & Boussiba, S. (1996). Sodium deprivation under alkaline conditions causes rapid death of the filamentous cyanobacterium *Spirulina paltensis*. *J. Phycol.* 32: 608-613.
- Sei, Y. & Arora, P.K. (1991). Quantitative analysis of calcium mobilisation after stimulation with mitogens or anti-Cd3 antibodies simultaneous fluo-3 and immunofluorescence flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 137: 237-244.
- Sellner, K.G., Olson, M.M. & Kononen, K. (1994). Copepod grazing in a summer cyanobacteria bloom in the Gulf of Finland. *Hydrobiologia* 293: 249-254.
- Shelef, G. & Soeder, C.J. (1980). **Algae Biomass. Production and Use**. Elsevier/North Holland Biomedical Press

- Shifrin, N.S. & Chisholm, S.W. (1981). Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles. *J. Phycol.* 17: 374-384.
- Shilo, M. (1989). The unique characteristics of benthic cyanobacteria. *In*: Cohen, Y. & Rosenberg, E. (eds.). **Microbial mat: physiological ecology of benthic microbial communities**. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp: 207-213.
- Siegelman, H.W. & Kycia, J.H. (1978). Algal biliproteins. *In*: Hellebust, J.A. & Craigie, J.S. (eds.). **Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods**. Cambridge University Press, Cambridge, pp: 71-79.
- Simon, R.D. & Weathers, P.J. (1976). Determination of the structure of novel polypeptide containing aspartic acid and arginine which is found in cyanobacteria. *Biochem. Biophys. Acta.* 420: 165.
- Smith, A. J. & Rogers, L.J. (1988). Tetrapyrrole biosynthesis-the C5 pathway. *In*: Rogers, L.G. & Gallon, J.R.(eds.). **Biochemistry of the Algae and Cyanobacteria**, Clarendon Press, Oxford, pp: 69-96.
- Sriharan, S., Bagga, D. & Sriharan, T.P. (1989). Environmental control of lipids and fatty acid production in the diatom *Navicula saprophila*. *Appl. Biochem. Bioten.* 20/ 21: 281-291.
- Staley, J.T., Bryant, M.P., Pfennig, N. & Holt, J.G. (1989). **Berger's manual of Systematic Bacteriology**. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Stanier, R.Y., Kunisawa, R., Mandel, M. & Cohen-Bazire, G. (1971). Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order *Chroococcales*). *American Society for Microbiology* 35: 171-205.
- Stevens, S.E.J., Balkill, D.L. & Paone, D.A.M. (1981). The effects of nitrogen limitation on the ultrastructure of the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum*. *Arch. Microbiol.* 130: 204-212.

- Stewart, D.E. & Farmer, F.H. (1984). Extraction, identification, and quantification of phycobiliprotein pigments from phototrophic plankton. *Limnol. Oceanogr.* 29: 392-397.
- Sukenik, A., Carmeli, Y. & Berner, T. (1989). Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *J. phycol.* 25: 686-692.
- Sukenik, A. & Wahnon, R. (1991). Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. I. *Isochrysis galbana*. *Aquaculture* 97: 61-72.
- Syrett, P.J. (1981). Nitrogen metabolism of microalgae. *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.* 210: 182-210.
- Tadros, M.G. & Johansen, J.R. (1988). Physiological characterization of six lipid-producing diatoms from the southeastern U.S. *J. Phycol.* 24: 445-452.
- Tadros, M.G., Smith, W. & Joseph, B. (1995). Yield and quality of cyanobacteria *Spirulina maxima* in continuous culture in response to sodium chloride. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 51/52: 275-281.
- Takano, H., Takeyama, H., Nakamura, N., Sode, K., Burgess, J.G., Manabe, E., Hirano, M. & Matsunaga, T. (1992). CO₂ removal by high-density culture of a marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. using an improved photobioreactor employing light-diffusing optical fibers. *Applied Biochem. Biotechnol.* 34/35: 449-458.
- Talarico, L. (1996). Phycobiliproteins and phycobilisomes in red algae: adaptative responses to light. In: Figueroa, F.L., Jiménez, C., Pérez-Lloréns, J.L. & Niell, F.X. (eds.). *Underwater light and algal photobiology*, vol: 61. Sci. Mar., Andalucía, pp: 205-222.
- Tandeau de Marsac, N. (1983). Phycobilisomes and complementary chromatic adaptation in Cyanobacteria. *Bull. Inst. Pasteur.* 81: 201-254.

- Tandeau de Marsac, N. (1991). Chromatic adaptation by cyanobacteria. *In*: Bogorad, L. & Basil, I.K. (eds.). **Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. The photosynthetic apparatus: Molecular Biology and operation.**, vol: 7B. Academic Press., New York, pp: 419-446.
- Tandeau de Marsac, N. & Cohen-Bazire, G. (1977). Molecular composition of cyanobacterial phycobilisomes. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 1635-1639.
- Tandeau de Marsac, N. & Houmard, J. (1988). Complementary Chromatic Adaptation: Physiological Conditions and Action Spectra. *In*: Packer, L. & Glazer, A.N. (eds.). **Methods enzymol.**, vol: 167. Academic Press, Inc., California, pp: 318-328.
- Teale, F.W.J. & Dale, R.E. (1970). Isolation and spectral characterization of phycobiliproteins. *J. Biochem.* 116: 161-169.
- Tedesco, M.A. & Duerr, E.O. (1989). Light, temperature and nitrogen starvation effects on the total lipid and fatty acid content and composition of *Spirulina platensis* UTEX 1928. *J. Appl. Phycol.* 1: 201-209.
- Tel-Or, E. (1980). Response of N-fixing cyanobacteria to salt. *Applied and Enviromental Microbiology.* 40: 689-693.
- Terry, K.L., Hirata, J. & Laws, E.A. (1985). Light, nitrogen, and phosphorus-limited growth of *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin strain TFX-1: chemical composition, carbon partitioning, and the diel periodicity of physiological processes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 86: 85-100.
- Thompson, P.A., Guo, M. & Harrison, P.J. (1992). Effects of variation in temperature. I. On the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton. *J. Phycol.* 28: 481-488.
- Utting, S.D. (1985). Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance. *Aquacult. Eng.* 4: 175-190.
- Venkataraman, L.V. (1983). **Blue-green Alga *Spirulina***. CFTRI Press, Mysore.

- Vieira, A. & Klaveness, D. (1986). The utilization of organic nitrogen compounds as sole nitrogen source by some freshwater phytoplankters. *Nord. J. Bot.* 6: 93-97.
- Vonshak, A. (1986). Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. In: Richmond, A. (ed.). **Handbook of Microalgal Mass Culture**. CRC Press, Florida, pp: 117-145.
- Vonshak, A. & Richmond, A. (1988). Mass production of the blue-green alga *Spirulina*: An Overview. *Biomass* 15: 233-247.
- Vonshak, A., Torzillo, G., Accolla, P. & Tomaselli, L. (1996). Light and oxygen stress in *Spirulina platensis* (cyanobacteria) grown outdoors in tubular reactors. *Physiologia Plantarum* 97: 175-179.
- Wadano, A., Kamata, Y., Iwaki, T., Nishikawa, K. & Hirahashi, T. (1995). Purification and characterization of phosphoribulokinase from the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. *Plant Cell Physiol.* 36: 1381-1385.
- Wake, H., Akasaka, A., Umetsu, H., Ozeki, Y., Shimomura, K. & Matsunaga, T. (1992). Enhanced germination of artificial seeds by marine cyanobacterial extract. *Appl. Microbiol. Biotech.* 36: 684-688.
- Wallen, D.G. & Allan, R. (1987). Utilization of amino acids by the blue-green alga *Synechococcus* AN (*Anacystis nidulans*). *Can. J. Bot.* 65: 1133-1136.
- Waterbury, J.B. & Rippka, R. (1989). The order *Chroococcales* Wettstein 1924, emend. Rippka et al., 1979. In: Staley, J.T., Bryant, M.P., Pfennig, N. & Holts, J.G. (eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, vol: 3. Williams & Wilkins, Baltimore, pp: 1728-1746.
- Waterbury, J.B. (1992). The Cyanobacteria - Isolation, Purification and Identification. In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. & Schleifer, K.H. (eds.). **The Prokaryotes**, vol: 2. Springer-Verlag, New York, pp: 2058-2078.
- Wehmeier, K.R. & Mooradian, A.D. (1994). Autoxidative and antioxidative potential of simple carbohydrates. *Free radical Biol. Med.* 17: 83-86.

- Wikfors, G.H. (1986). Altering growth and gross chemical composition of two microalgal molluscan food species by varying nitrate and phosphate. *Aquaculture* 59: 4-14.
- Witt, U., Koske, P.H., Kuhlmann, D., Lenz, J. & Nellen, W. (1981). Production of *Nannochloris* sp. (Chlorophyceae) in large-scale outdoors tanks and its use as a food organism in marine aquaculture. *Aquaculture* 23: 171-181.
- Wood, A.M., Horan, P.K., Muirhead, K., Phinney, D.A., Yentsch, C.M. & Waterbury, J.B. (1985). Discrimination between types of pigments in marine *Synechococcus* spp. by scanning spectroscopy, epifluorescence microscopy and flow cytometry. *Limnol. Oceanogr.* 30: 1303-1315.
- Wood, M.A., Teiser, M., Pichel, F.G. & Thiemann, C. (1995). Genetic variation in acclimated growth rate among *Synechococcus* clones isolated from the Mediterranean Sea. *J. Phycol.* 31: 23.
- Wood, N.B. & Haselkorn, R. (1980). Control of phycobiliprotein proteolysis and heterocyst differentiation in *Anabaena*. *J. Bacteriol.* 141: 1375-1385.
- Wurtsbaugh, W., Vicent, C.L., Alfaro, R., Richerson, P.G. & Vicent, W.F. (1984). Nutrient limitation of algal growth and nitrogen fixation in tropical alpine lake, Lake Titicaca (Perú-Bolivia). *Freshwat. Biol.* 15: 185-195.
- Wyman, M. (1992). An in vivo method for the estimation of phycoerythrin concentrations in marine cyanobacteria (*Synechococcus* sp.). *Limnol. Oceanogr.* 37: 1300-1306.
- Wynne, D. & Rhee, G.-Y. (1986). Effects of light intensity and quality on the relative N and P requirement (the optimum N:P ratio) of marine planktonic algae. *J. Plankton Res.* 8: 91-103.
- Yamanaka, G. & Glazer, A.N. (1980). Dynamic aspects of phycobilisome structure. *Arch. Microbiol.* 124: 39-47.
- Yamanaka, G., Glazer, A.N. & Williams, R.C. (1978). Cyanobacterial phycobilisomes. Characterization of the phycobilisomes of *Synechococcus* sp. 6301. *J. Biol. Chem.* 253: 8303-8310.

Yu, L., Zhao, J., Mühlhoff, U., Bryant, D.A. & Golbeck, J.H. (1993). PsaE is required for in vivo cyclic electron flow around photosystem I in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. *Plant Physiol.* 103: 171-180.

UNIVERSIDADE DA CORUÑA
Servicio de Bibliotecas



1700744174