

EVALUACIÓN DE UN PROCESO FED-BATCH PARA LA PRODUCCIÓN DE  
FICOCIANINA (C-PC) DE GRADO INDUSTRIAL A PARTIR DE BIOMASA  
DE *Potamosiphon* sp.

Director

Ing. MSc CRISÓSTOMO BARAJAS FERREIRA

Codirector

Biol, PhD. ANDRÉS FERNANDO BARAJAS SOLANO

Ing. JEFFERSON EDUARDO CONTRERAS ROPERO

Estudiante de la Maestría de Ingeniería Química

Tesis de maestría presentada para optar al título de  
Magíster en Ingeniería Química

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERIAS FISICOQUIMICAS  
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA  
MAESTRIA INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA

2024

### **Dedicatoria:**

En memoria de Carmen Rosa Ascanio, mi segunda madre, a quien hoy debo parte de lo que soy. Su guía y apoyo han moldeado mi ser, y su influencia resuena en cada aspecto de mi vida. Estoy eternamente agradecido por el profundo impacto que tuvo en mí.

## **Agradecimientos**

- A Dios, por su infinita bondad y por todas las bendiciones que nos brinda cada día.
- A mi madre, María Elizabeth Roper, por ser una fuente incondicional de amor, apoyo y sabiduría en mi vida.
- A mi Compañera de Vida, Melisa Suarez Jimenez, por estar siempre a mi lado y apoyarme en cada uno de mis objetivos y metas.
- A mi hijo, Andrés Emiliano Contreras Suarez, quien ilumina mi vida con su amor y alegría, y es la razón fundamental de mis propósitos y esfuerzos.
- Al profesor Crisóstomo, por su constante apoyo, orientación y confianza en mí, que han sido fundamentales en mi desarrollo académico y personal.
- A la familia que me ha brindado la vida. Especialmente, quiero agradecer al amigo, profesor y segundo padre, Andrés Fernando Barjas Solano, por su inspiración, consejos y apoyo.

## RESUMEN

**Título:** Evaluación de un proceso fed-batch para la producción de ficocianina (c-pc) de grado industrial a partir de biomasa de *Potamosiphon* sp. \*

**Autor:** Jefferson Eduardo Contreras Roperero \*\*

**Palabras claves:** Cianobacterias, C-PC, Fed-Batch, Simulación de procesos, SuperPro

**Descripción:** Las cianobacterias de entornos acuáticos termales son una alternativa prometedora para la síntesis de metabolitos industriales, como la ficocianina (C-PC). Este estudio investiga el impacto de condiciones ambientales, como el espectro lumínico (incluyendo Rojo:Azul 3:1), intensidad lumínica (50-200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), ciclo de luz (5-20 horas) y limitación nutricional ( $\text{No}_2$ ,  $\text{Po}_4$ ), en la producción de C-PC por *Potamosiphon* sp. Los resultados destacan la influencia significativa de la longitud de onda, fotoperiodo e intensidad lumínica en la producción de C-PC, con mejores resultados bajo luz roja-azul (3:1), 283  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y hasta 17.8 horas de fotoperiodo. Se desarrolla un modelo matemático del proceso y se simula una planta de producción de C-PC, considerando aspectos upstream y downstream, junto con la evaluación de costos. Estos hallazgos resaltan la importancia de las condiciones lumínicas para la producción de ficocianinas, subrayando la necesidad de considerarlas para maximizar la producción. La simulación y optimización de procesos emergen como herramientas clave para mejorar la eficiencia y rentabilidad de la producción, con implicaciones para investigaciones futuras.

---

\* \* Proyecto de investigación de Maestría.

\*\* Facultad de Ingenierías Físico Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Maestría en Ingeniería Química. Director: Crisóstomo Barajas Ferreira. Magister en ingeniería química. Codirector: Andrés Fernando Barjas Solano Dr. en ingeniería química

## ABSTRACT

**Title:** Assessment of a fed-batch process for industrial-grade ficocyanin (C-PC) production from *Potamosiphon* sp. biomass \*

**Author:** Jefferson Eduardo Contreras Roperó \*\*

**Key words:** Cyanobacteria, C-PC, Fed-Batch, Process Simulation, SuperPro

**Description:** Cyanobacteria from thermal aquatic environments represent a promising alternative for synthesizing industrial metabolites such as phycocyanin (C-PC). This study investigates the impact of environmental conditions, including light spectrum (including Red:Blue 3:1), light intensity ( $50\text{-}200\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ ), light cycle (5-20 hours), and nutrient limitation ( $\text{No}_2$ ,  $\text{Po}_4$ ), on C-PC production by *Potamosiphon* sp. Results underscore the significant influence of wavelength, photoperiod, and light intensity on C-PC production, with optimal outcomes observed under red-blue light (3:1),  $283\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ , and up to 17.8 hours of photoperiod. Growth kinetics were established, revealing that phosphate and nitrates significantly influence C-PC and biomass production, respectively. A representative mathematical model of the production process was developed. Finally, a C-PC production plant was simulated, considering upstream and downstream aspects, with associated costs evaluated. These findings demonstrate the pivotal role of applying diverse light spectra in maximizing phycocyanin production via cyanobacteria. Process simulation and optimization enhance production efficiency and profitability, with significant implications for future endeavors.

---

\* \* Master's research project

\*\*Faculty of Physical Chemical Engineering. School of Chemical Engineering. Master's in chemical engineering. Director: Crisostomo Barajas Ferreira. Master in chemical engineering. Co-director: Andrés Fernando Barajas Solano. PhD in chemical engineering.

## Tabla de contenido

1.	Introducción .....	11
2.	Estado del Arte .....	13
2.1.	Producción bibliográfica y su evolución en el tiempo.....	13
2.2.	Análisis Bibliométrico.....	17
2.3.	Factores fundamentales en la producción ficocianinas .....	20
3.	Planteamiento del problema.....	21
4.	Justificación. ....	24
4.1.	Hipótesis .....	25
4.2.	Objetivo general .....	26
4.3.	Objetivos específicos.....	26
5.	Metas Alcances y delimitaciones.....	26
5.1.	Meta .....	26
5.2.	Alcance y delimitación .....	26
5.2.1.	Espacial.....	26
5.2.2.	Temporal.....	27
5.2.3.	Conceptual.....	27
5.3.	Tipo de investigación.....	27
5.4.	Población y muestra.....	27
5.4.1.	Población.....	27
5.4.2.	Muestra.....	27
6.	Metodología .....	28
6.1.	Protocolos .....	28
6.1.1.	Microorganismo y condiciones de cultivo .....	28
6.1.2.	Cuantificación de Biomasa (peso seco) (Moheimani et al. 2013) ..	28
6.2.	Diseño experimental.....	30
6.2.1.	Evaluación de variables lumínicas.....	30
6.2.2.	Efecto del ciclo luz:oscuridad e intensidad .....	31

6.2.3. Determinación de constantes cinéticas .....	32
6.2.4. Establecimiento y Comprobación de modelo matemático Batch. ..	35
6.2.5. Diseño y comprobación del proceso Fed-Batch. ....	36
6.2.6. Simulación una planta de producción de ficocianina (C-PC) a partir de cultivos de <i>Potamosiphon</i> sp. ....	36
7. Resultados y discusión.....	38
7.1. Primer diseño de experimentos.....	38
7.1.1. Producción de biomasa .....	38
7.1.2. Concentración de C-PC.....	39
7.1.3. Pureza del extracto de C-PC .....	40
7.2. Segundo diseño de experimentos.....	45
7.2.3. Producción de Biomasa.....	45
7.2.4. Concentración de C-PC.....	47
7.2.5. Índice de pureza de C-PC .....	50
7.3. Determinación de parámetros cinéticos de cultivo .....	55
7.4. Establecimiento del modelo matemático Batch y Fed-Batch. ....	60
7.4.1. Modelado Batch .....	60
7.4.2. Modelado Fed-Batch .....	64
7.5. Simulación de planta de producción de ficocianina (C-PC) a partir de cultivos de <i>Potamosiphon</i> sp. ....	72
7.5.1. Proceso upstream .....	72
7.5.2. Proceso downstream.....	72
7.5.3. Costo de la planta.....	73
8. Conclusiones.....	77
9. Recomendaciones.....	78
10. Referencias .....	79

## Lista de figura

Figura 1. (A) División de la producción bibliográfica; (B)Tendencia de las investigaciones realizadas y publicadas con relación a las palabras claves seleccionadas y los años comprendidos. ....	14
Figura 2. Ejes temáticos más importantes estudiados en la producción bibliográfica analizada .....	15
Figura 3. (A) Número de Citaciones recibidas por documentos publicados durante los últimos 20 años y (B) países con mayor número de publicaciones.....	16
Figura 4. Análisis de co-ocurrencia de la información recolectada según: (A) Grupos de Palabras más importantes.....	18
Figura 5. Tendencias de las investigaciones en el tiempo .....	19
Figura 6. Ficobiliproteínas extraídas de <i>Potamosiphon</i> sp (A) y su composición total (B). ....	25
Figura 7 Codificación de factores en función de: (a) concentración de Biomasa; (b) concentración de C-PC; (c) Índice de pureza de C-PC. ....	43
Figura 8. Superficie de respuesta en función de Biomasa .....	47
Figura 9. Superficie de respuesta en función de C-PC .....	50
Figura 10. Superficie de respuesta en función del índice de pureza de C-PC.....	53
Figura 11. Superficie de respuesta en función del índice de pureza de C-PC.....	54
Figura 12. Evolución de Biomasa y pigmentos en función de Concentración de Sustratos en el Tiempo.....	56
Figura 13. Gráfico de Linealización y Ecuación de Regresión Lineal de Monod NO <sub>3</sub> (a) y PO <sub>4</sub> (b).....	57
Figura 14. Gráfico de Rendimiento del Producto por Sustrato NO <sub>3</sub> (a) y PO <sub>4</sub> (b).....	57
Figura 15. Gráfico de Rendimiento de biomasa por Sustrato NO <sub>3</sub> (a) y PO <sub>4</sub> (b) .....	58
Figura 13. Modelado vs Experimental Proceso Batch.....	63
Figura 16. Modelado vs Experimental de Proceso Fed-Batch en función de: (a) Biomasa; (b) C-PC, y Sustrato (c).....	70
Figura 17. Diagrama de la simulación del proceso para la obtención de C-PC liofilizado en polvo. ....	74
Figura 18. Diagrama de la simulación del proceso para la obtención de C-PC líquido. .	75
Figura 19. Evolución del valor de producción para las dos alternativas (líquido y liofilizado) en función del volumen del sistema de cultivo.....	76

## **Lista de tablas**

Tabla 1. Diseño de experimentos Intensidad de luz y tipo de luz en función de la producción de biomasa y ficocianinas. ....	30
Tabla 2. Diseño de experimentos Fotoperiodo e Intensidad de luz en función de la producción de biomasa y ficocianinas. ....	32
Tabla 3 Contantes cinéticas de modelado.....	35
Tabla 4. Análisis ANOVA producción de biomasa .....	38
Tabla 5. Estadísticos de ajuste para el modelo propuesto de producción de biomasa. .	39
Tabla 6. Análisis ANOVA para la concentración de C-PC .....	39
Tabla 7. Estadísticos de ajuste sobre la concentración de C-PC.....	40
Tabla 8. Análisis ANOVA para el índice de pureza de C-PC .....	41
Tabla 9. Estadísticas de ajuste sobre el índice de pureza de C-PC .....	41
Tabla 10. Condiciones obtenidas para mejorar la concentración de biomasa, C-PC y pureza de C-PC.....	44
Tabla 11. Análisis ANOVA sobre la producción final de biomasa .....	45
Tabla 12. Estadísticas de ajuste para la concentración de biomasa .....	46
Tabla 13. Análisis ANOVA para la concentración de C-PC .....	48
Tabla 14. Estadísticas de ajuste para la concentración de C-PC .....	49
Tabla 15. Análisis ANOVA para el índice de pureza de C-PC .....	51
Tabla 16. Estadísticos de ajuste para el índice de pureza de C-PC .....	51
Tabla 17. Condiciones obtenidas para maximizar la concentración de biomasa, C-PC y pureza de C-PC.....	53
Tabla 18. Constantes cinéticas en función de sustratos .....	59
Tabla 19. Porcentaje de error entre los datos experimentales y los cuatro modelos evaluados. ....	71
Tabla 20. Estimación del capital fijo para dos escenarios de producción de C-PC utilizando Potamosiphon sp.....	76

## 1. Introducción

Las cianobacterias, son generalmente conocidas como algas verdes o azules. Dichos organismos son procariontes fotosintéticos, que hace más de 3,5 millones de años reestructuraron toda la biosfera a como la conocemos actualmente. Las cianobacterias fueron los primeros en realizar fotosíntesis oxigénica (Romero et al., 2017). Las cianobacterias son organismos de gran interés ambiental y biotecnológico debido a su capacidad de asimilación de nutrientes, bioconversión de moléculas contaminantes, alta eficiencia fotosintética, consumo de CO<sub>2</sub>, producción de oxígeno los cuales poseen diferentes aplicaciones desde la producción de biocombustibles y/o bioproductos industriales hasta el tratamiento de aguas residuales (Kotoula et al. 2020; Silos Vega, 2021).

Hoy en día las cianobacterias que habitan los ecosistemas acuáticos termales se presentan como una alternativa interesante para diferentes procesos industriales. Puesto que poseen una gran versatilidad metabólica adquirida, debido al alto contenido de minerales presentes en los cuerpos de aguas, cambios climáticos e irradiancias del hábitat (A. Patel, Matsakas, Rova, & Christakopoulos., 2019). Diversos investigadores han concluido que las limitaciones principales de la producción de estos organismos son: la productividad biomasa y calidad de esta a un bajo costo, lo cual permitirá la escalabilidad y viabilidad del proceso (Assunção, et al., 2022).

El sistema fotosintético de las cianobacterias es un conjunto de fotosistemas compuesto por el fotosistema I (FSI), Fotosistema (FSII) y un ficobilisoma. Estos tres sistemas de captación de luz les confieren a los organismos antes mencionados la capacidad de absorber diversos espectros de luz emitidos por las diferentes gamas de colores que van desde 400 a 700 nm (Dobson et al., 2021; Santos-Merino et al., 2021). Los ficobilisomas son un complejo proteico accesorio, cuya principal función es la captación y conducción de luz hacia los centros activos de los diferentes fotosistemas presentes en las cianobacterias. Estos compuestos proteicos están conformados por ficobiliproteínas organizadas estructuralmente con un centro de Alococianina (A-PC) y varillas céntricas de Ficocianinas (C-PC) y ficoeritrina (PE) (Adir et al., 2020; Liu et al., 2021)). Las ficobiliproteínas son compuestos cromóforos altamente fluorescentes de interés industrial las cuales presentan en su estructura grupos prostéticos tetrapirrólicos lineales. Estos pigmentos son de importancia para la ciencia debido a sus propiedades terapéuticas, como activos antiinflamatorios, antioxidantes, anticancerígeno, antiviral entre otras. (W. Li et al., 2019;

Pagels et al., 2019). La C- ficocianina (o C-PC) es el compuesto pigmentario de color azul más abundantes en las ficobiliproteínas, dicha concentración va a depender principalmente de cada cepa, genero e incluso especie y su variación con los parámetros de estrés lumínico y nutrimental expuestos para su crecimiento. Afectando así directamente el costo de directo asociado a la producción del pigmento.

El principal potencial de las ficocianinas es su uso como colorantes naturales, pero un número creciente de estudios ha demostrado las propiedades relacionadas con los beneficios para la salud y la amplia aplicación farmacéutica (W. Li et al., 2019; Pagels, et al., 2019), además, las ficobiliproteínas son ampliamente utilizadas en pruebas de laboratorio y ensayos inmunológicos, debido a sus propiedades tales como alta fluorescencia, buena estabilidad de almacenamiento a temperaturas entre 4 y 10°C, punto isoeléctrico (IP) cercano a 4.65, lo que los hace fácilmente enlazables a anticuerpos y otras proteínas por técnicas convencionales sin cambiar sus características espectrales, tienen un alto coeficiente de absorción molar y emisión, estabilidad oligomérica y alta fotoestabilidad (Patel. et al., 2018; Hsieh-Lo et al., 2019; Zhang et al., 2021) Sin embargo, la falta de información a profundidad de las moléculas que las componen y las técnicas de cultivo para la mejora de estos son escasas. Actualmente y Durante los últimos años el interés investigativo ha aumentado centrándose en la problemática asociada a la optimización en la producción de compuestos químicos de interés modificando condiciones medio ambientales y nutricionales. Para que la implementación de las cianobacterias en las diferentes cadenas de productivas sea sostenible, se deben cumplir con dos criterios. En el primero podemos encontrar la disminución de los costos asociados a su producción y por ultimo y no menos importante es el aumento considerable del rendimiento productivo del sistema. Sin embargo, el aumento de la productividad de los metabolitos de interés dependerá del tipo de cultivo, distribución de los nutrientes dentro del mismo y los parámetros asociados a la luz, los cuales dan paso a la capacidad de adaptabilidad para la optimización del aprovechamiento de los recursos disponibles, disminuyendo la pérdida de su población.

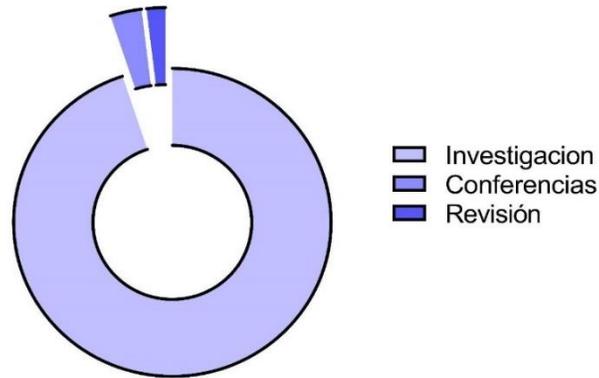
En ese contexto La implementación estrategias nutrimentales y ambientales para el desarrollo y producción de pigmentos fotosintéticos utilizando cianobacterias es una técnica prometedora, puesto que, permitiría mitigar el impacto las emisiones de CO<sub>2</sub> y disminuir los costos en la cadena de producción, aumentado su productividad y haciendo el cultivo de cianobacterias atractivo para la industria.

## 2. Estado del Arte

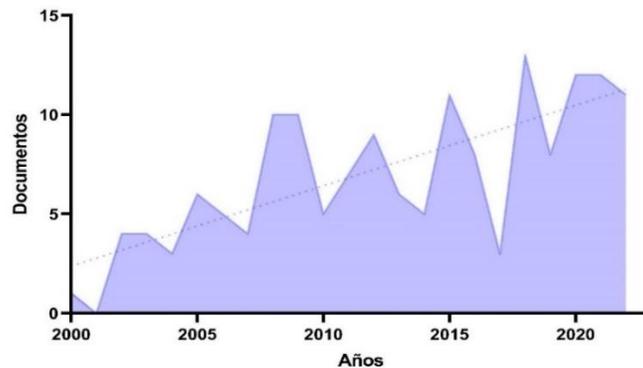
### 2.1. Producción bibliográfica y su evolución en el tiempo.

De acuerdo con una búsqueda de literatura en la base de datos SCOPUS usando las palabras claves TITLE-ABS-KEY (models AND kinetic) OR TITLE-ABS-KEY (growth AND cell) OR TITLE-ABS-KEY (mathematical AND models) AND TITLE-ABS-KEY (phycocyanins) AND TITLE-ABS-KEY (cyanobacteria)) entre los años 2000-2022. De acuerdo con los parámetros de búsqueda fue posible encontrar 157 documentos, dentro de estos documentos predominan los artículos de investigación con un 95 % seguido del 5% conferencias, y finalmente con un 3% revisiones (figura 1A).

La evolución y el interés por los diferentes entes investigativos (Empresas, Entidades no Gubernamentales e Investigadores) tiene una tendencia creciente en el tiempo, con picos comprendidos en los años 2020 y 2021, los cuales cuentan con 12 publicaciones cada uno (Figura 1B). además, de los documentos analizados los últimos 5 años, los más relevantes y/o más impacto han tenido en la ciencia dado sus citas podemos encontrar a Prates et al., (2018) con su investigación titulada Cultivo de espirulina bajo diferentes diodos emisores de luz: Mejora del crecimiento celular y la producción de ficocianinas, el cual evaluó la aplicación de los LED como fuente de luz en *Arthrospira* (Spirulina) sp. En función de los parámetros de crecimiento celular; así mismo otra investigación titulada Efectos diferenciales de concentraciones variables de fósforo, hierro y nitrógeno en cianobacterias fijadoras de N<sub>2</sub> estudiaron la respuesta de adaptación de la cianobacteria mediante un análisis bioinformático de los regulones Pho, Fur y NtcA y su interacción con las condiciones variables de los nutrientes PO<sub>4</sub> y Fe (Fernández-Juárez et al., 2020); También otro estudio realizado por Ren et al., (2020) el cual investigo la capacidad de adaptación de la cianobacteria, pero esta vez asociados a los efectos de la radiación UV y su relación con el fosforo inorgánico. Y como estas investigaciones muchas más donde la temática general del desarrollo de la investigación gira en torno a los componentes ya antes dichos, los cuales buscan optimizar, y profundizar el entendimiento del comportamiento del crecimiento cianobacteria implementando estrategias ambientales y/o nutrimentales con la finalidad de aumentar su producción.



A



B

Figura 1. (A) División de la producción bibliográfica; (B)Tendencia de las investigaciones realizadas y publicadas con relación a las palabras claves seleccionadas y los años comprendidos.

La investigación llevada a cabo entre los años 2000 y 2022 ha explorado diversos ejes temáticos, destacando especialmente la Bioquímica, que ha desempeñado un papel crucial al profundizar en los procesos químicos en organismos vivos. También tenemos la Genética y la Biología Molecular, las cuales han contribuido a descifrar el código genético y los mecanismos de expresión génica. Por otro lado, encontramos la Inmunología y la Microbiología, siendo estas esenciales para comprender las respuestas inmunológicas y las interacciones microbianas. Asimismo, encontramos también la Ingeniería Química, la cual ha facilitado la aplicación práctica de estos hallazgos, optimizando procesos biotecnológicos. Finalmente, encontramos que las Ciencias Agrícolas, Biológicas y

Ambientales se han entrelazado para abordar cuestiones cruciales como la seguridad alimentaria y la sostenibilidad ambiental. Estas temáticas, en conjunto, representan un 73% del total acumulado y agremian el desarrollo multidisciplinario, el cual se refleja no solo en la comprensión teórica, sino también en la aplicación práctica de conocimientos. Destaca la utilización de organismos vivos para obtener y mejorar bienes comunes. Desde la ingeniería genética hasta prácticas agrícolas sostenibles, la investigación ha buscado activamente aprovechar el potencial de la vida para el beneficio de la sociedad, delineando un panorama diverso que contribuye al avance científico y tecnológico en la comprensión y mejora de la vida en diversas dimensiones (ver figura 3).

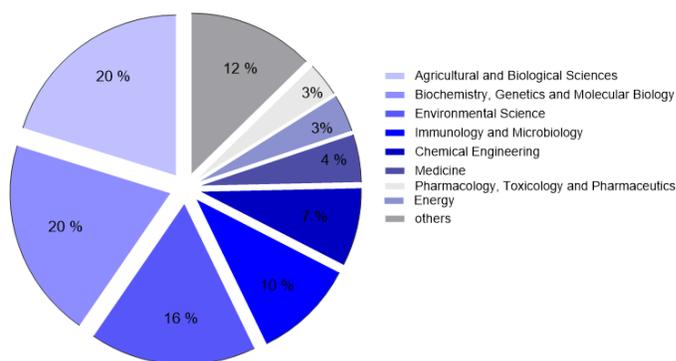
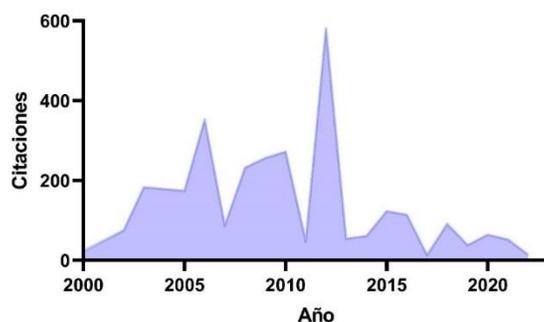


Figura 2. Ejes temáticos más importantes estudiados en la producción bibliográfica analizada

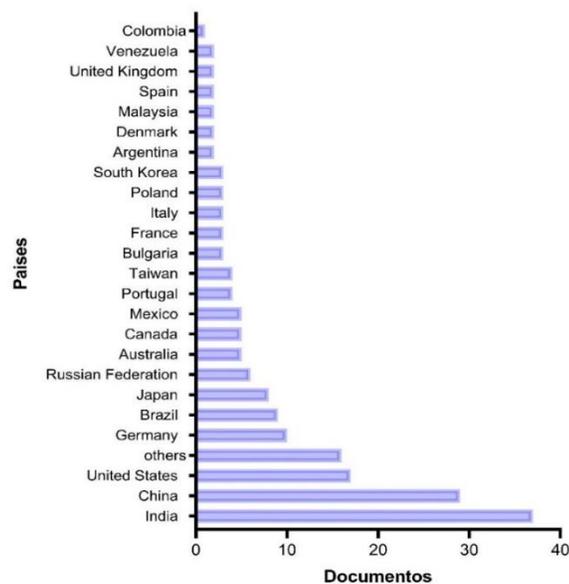
La producción de pigmentos de origen natural utilizando cianobacterias ha emergido como un área de gran interés científico en las últimas dos décadas. Para entender un poco más el interés científico se realizó un análisis bibliométrico de los periodos antes mencionados y las palabras acá citadas. Dicho análisis ha permitido trazar una línea temporal del desarrollo de esta temática y entender las tendencias en citaciones y la distribución geográfica de la temática en cuestión.

Para empezar, es importante señalar que, durante las últimas dos décadas, la investigación sobre la producción de pigmentos utilizando cianobacterias ha atraído constantemente la atención, como lo demuestra un promedio de 18 citas. Este promedio es significativo y demuestra la relevancia del tema dentro de la comunidad científica. Sin embargo, en 2012 se registró un pico de 580 citaciones, lo cual alcanza el 20 % total de las citaciones realizadas en el periodo de 2002 – 2023. Este aumento destaca un aumento de interés y reconocimiento durante ese año, potencialmente debido a descubrimientos o avances significativos en la producción de pigmentos naturales con cianobacterias. ( ver Figura 4A).

Al examinar la distribución geográfica de la investigación, se revela que los principales países contribuyentes a este campo son India, China, Estados Unidos, Alemania y Brasil, que en conjunto representan el 60% de la producción bibliográfica total. Estos países no solo han liderado en términos de cantidad de investigación, sino que también han influido en la dirección y la calidad de los estudios en esta área. La colaboración internacional, evidenciada por la diversidad de países involucrados, destaca la naturaleza global y colaborativa de la investigación en la producción de pigmentos con cianobacterias ( ver Figura 4B)..



A



B

Figura 3. (A) Número de Citaciones recibidas por documentos publicados durante los últimos 20 años y (B) países con mayor número de publicaciones.

## 2.2. Análisis Bibliométrico

A partir de la información expuesta en la sección anterior, se realizó un análisis mediante el uso del software VOSviewer, permitiendo la identificación de patrones de co-ocurrencia de palabras clave. Este enfoque reveló la existencia de 5 grupos distintos, cada uno representado por colores diferentes y con las palabras "Ficocianina" y "Cianobacteria" como ejes centrales. Estos grupos reflejan la diversidad y complejidad de la investigación en torno a la producción de pigmentos cianobacterianos.

Los principales grupos identificados están fuertemente vinculados al estudio de los diversos componentes que influyen en el metabolismo durante la producción de pigmentos cianobacterianos. En particular, se destacan las ficobiliproteínas (azul) como elementos clave en estos estudios. Estos pigmentos, fundamentales en el proceso biológico de las cianobacterias, han sido objeto de una atención significativa, reflejada en la agrupación temática en torno a su función y regulación. Además, otros grupos identificados en el análisis abordan aspectos diferentes, pero igualmente relevantes en el ámbito de la investigación en cianobacterias y pigmentos. Un conjunto se enfoca en modelos matemáticos predictivos del crecimiento biológico (verde)), proporcionando herramientas cruciales para entender y prever el comportamiento de las poblaciones de cianobacterias en entornos específicos. Este enfoque matemático añade una dimensión predictiva valiosa a la investigación, contribuyendo a la planificación y optimización de procesos.

Otro grupo relevante se centra en la función final de los pigmentos de origen cianobacterial. Aquí, se exploran las aplicaciones prácticas de estos pigmentos en diversos contextos, desde la biotecnología hasta la medicina (amarillo). La comprensión de las funciones finales de estos compuestos es esencial para maximizar su utilidad en aplicaciones industriales y científicas. (ver Figura 5)

En cuanto a la dinámica evolutiva de las investigaciones, se observa un fenómeno interesante. El grupo dos, que inicialmente se centraba en estudios de la función y/o implementación de compuestos derivados de cianobacterias y su composición química, ha experimentado un aumento en su relevancia a lo largo del tiempo. Este cambio sugiere una tendencia en la investigación hacia la exploración más profunda y aplicada de los compuestos producidos por cianobacterias, indicando una evolución natural en el interés científico. (ver Figura 6)

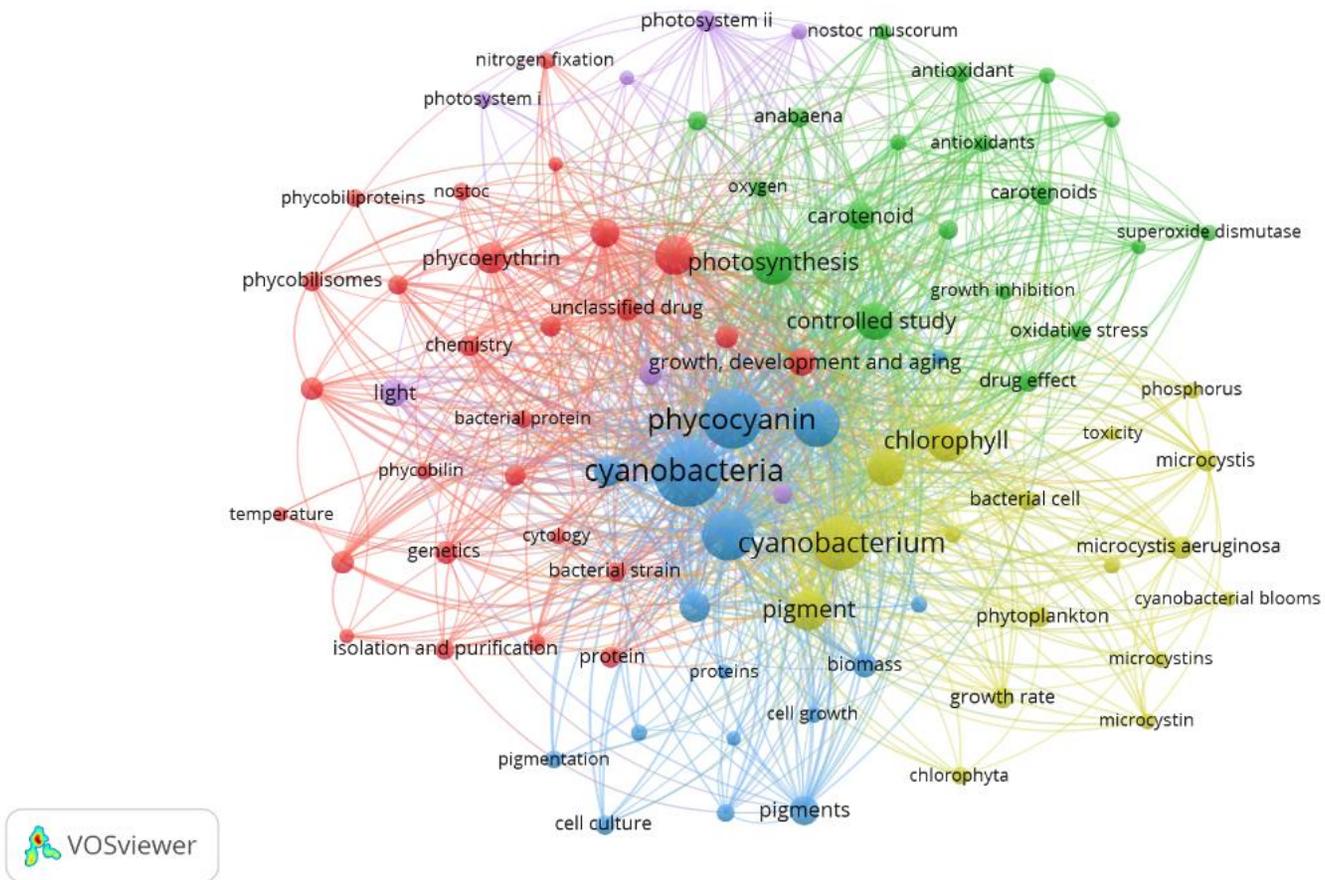


Figura 4. Análisis de co-ocurrencia de la información recolectada según: (A) Grupos de Palabras más importantes



### 2.3. Factores fundamentales en la producción ficocianinas

La producción de cianobacterias depende de diversas variables los cuales alterarán la composición final de la biomasa. dentro de los factores es posible resaltar, la luz, dicha variable juega un papel crucial en la acumulación de ciertos metabolitos Debido a que estos microorganismos requieren de una fuente lumínica para poder llevar a cabo diferentes procesos metabólicos, (Schulze et al., 2014). Los parámetros críticos más estudiados son tipo, intensidad, calidad y tiempo de exposición a la luz (Pagels et al, 2019; Gris et al., 2017). Así mismo, las fuentes nutricionales de los macronutrientes como N/P son variables importantes que favorecen el desarrollo de las cianobacterias y aumenta la producción de pigmentos de origen fotosintético existe una compresión limitada entre la relación de estos macronutrientes en función de la mejora de productividad del cultivo de cianobacterias. Este grupo de microorganismos puede emplear amonio, urea, nitratos e incluso nitrógeno gaseoso para su crecimiento (Pagels et al 2019). También, utiliza nutrientes de diferentes fuentes de sales asociadas al fosforo ( $PO_4$ ) incorporando dichos compuestos en su cadena trófica (Puzorjov & McCormick, 2020; Klepacz-Smółka et al., 2020). En las cianobacterias, el nitrógeno y el fosforo funcionan como un eslabón estructural y intermediario en los diferentes procesos metabólicos incluyendo la producción de ficobiliproteínas, por lo cual, la disponibilidad en el medio es un factor crucial para la producción de estos pigmentos (Lee., et al 2017) (Ramos, 2020).

La implementación de estrategias nutrimentales como Fed-batch en la optimización de la producción de metabolitos de interés utilizando microorganismos, es una metodología que toma fuerza (Rio-Chanona et al., 2015; Ma et al., 2020). Dicha técnica consiste en suministrar los nutrientes limitantes para el desarrollo de los organismos manteniendo su fase exponencial o logarítmica de la curva de crecimiento (Manirafasha et al., 2018). Sin embargo, para lograr el control de dicho proceso, es necesario predecir con exactitud el comportamiento del microorganismo en función de los nutrientes limitantes y desarrollar con éxito el control dinámico. Por otro lado, la obtención del modelo matemático de reacción del reactor es un proceso que presenta dificultades, dado que encontrar un modelo adecuado que permita predecir los datos experimentales con rangos de error bajo puede ser desafiante, teniendo en cuenta las diferentes rutas metabólicas que se pueden derivar de los organismos estudiados (Carlozzi & Touloupakis, 2021; (Abeyisiriwardana-Arachchige & Nirmalakhandan, 2019).

### 3. Planteamiento del problema

La biodiversidad colombiana se presenta como un promotor al desarrollo sostenible del país. Así mismo es categorizado como oportunidad para el crecimiento económico universal. Sin embargo, el poco conocimiento de los requerimientos nutricionales para un crecimiento óptimo de estos organismos acompañado de la alta biodiversidad presente en Colombia genera brechas científicas altas que no permiten avanzar en pro del desarrollo industrial sostenible. Actualmente las sociedades en general dirigen sus esfuerzos en la búsqueda, desarrollo y comercialización de productos derivados a partir de Cianobacterias y microalgas, generando así una tendencia científica en esta área la cual ha permitido la formulación de grandes y numerosas investigaciones, artículos científicos y patentes cada año; sin embargo diferentes compañías involucradas inicialmente en la producción de biomasa para biocombustibles han comenzado a cambiar su visión de negocio hacia otros campos, principalmente porque este área requiere de un aprovechamiento integral de toda la biomasa producida para generar una sostenibilidad económica del proceso.

Colombia no es ajena a este escenario, durante los últimos años la investigación en este campo ha estado enfocada fuertemente en la producción de biocombustibles (principalmente biodiesel); proyectos como “BIOPROSPECCIÓN DE MICROALGAS COLOMBIANAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BODIESEL” financiado por MINAGRO-ECOPETROL-UIS y otras iniciativas apoyadas por COLCIENCIAS y Universidades a lo largo de todo el país han generado diversos productos científicos, pero hasta ahora ningún producto que pueda ser aprovechado por las empresas Colombianas. Recientemente el enfoque de investigación ha cambiado, evidencia de esto son proyectos con financiación internacional como “GREENBIOREFINERY” (Laboratorio Nacional de Energía e Geología, I.P. Universidad de Almería, National Technological University Regional Faculty Buenos Aires, Universidad de Antioquia, Cervecería Unión S.A y Mahou San Miguel. Monto total: € 394.727,00) y creación y fortalecimiento de una red de transferencia de conocimiento y tecnología entre estados unidos y Colombia mediante el desarrollo de procesos de biorrefinería para la obtención de biocombustibles y productos de alto valor agregado a partir de biomasa de microalgas. Entidades participantes: COLCIENCIAS, UIS, Dow Chemical Company y Texas A&M University. Monto total: \$COP: 587'747.688 COP).

Las fuentes hidrotermales son ambientes inusuales, los cuales se encuentran distribuidos a lo largo de toda la corteza terrestre (Moro et al., 2010); el tipo y conformación fisicoquímica de estas fuentes varía dependiendo de su cercanía con volcanes y otros fenómenos geotérmicos, además su composición química difiere en función de la estructura y composición fisicoquímica del lecho rocoso por donde fluye el agua antes de salir a la superficie y su tiempo de retención (Reysenbach et al., 2001). El flujo de diferentes nutrientes ha sido decisivo para la colonización de diferentes de microorganismos tanto termo-tolerantes (35-60°C) como termofílicos ( $\geq 70^\circ\text{C}$ ) (Finore et al., 2015).

Dentro de los diferentes microorganismos que habitan estos ambientes se puede resaltar la presencia de comunidades de cianobacterias y en algunos casos por microalgas adaptadas a altas temperaturas (hasta 60°C) (Castenholz, 1969, Brock, 1978). Sin embargo, a diferencia de las microalgas, las cianobacterias pueden adaptarse mejor a altas temperaturas (hasta 75°C). Cabe resaltar que la presencia de microorganismos fotosintéticos termo-tolerantes y extremófilos es una guía importante para entender la biodiversidad bioquímica y estructural de los manantiales geotérmicos, ya que estos se distribuyen a través de toda la corteza terrestre, permitiendo el flujo de nutrientes a través de las aguas subterráneas durante miles de años (Finore et al., 2015).

Las cianobacterias son un grupo de microorganismos fotosintéticos que han tenido un interés significativo por parte de los científicos con investigaciones de alto impacto, esto se debe principalmente a la capacidad de producir una gran variedad de compuestos que son utilizados en diferentes industrias como: farmacéuticas, alimentarias, ambientales, petroquímicas, entre otras (Maroneze et al., 2016) que van desde proteínas, carbohidratos, lípidos y sus derivados. Las ficobiliproteínas son pigmentos cromóforos principalmente producidos por cianobacterias, dichos pigmentos son los encargados de absorber la energía lumínica (Samsonoff & MacColl, 2001). Dentro de las ficobiliproteínas se pueden distinguir 2 tipos: ficocianinas C (C-PC, R-PC y A-PC) y ficoeritrina (PE) (Dasgupta, 2015). Estas proteínas son solubles en agua y poseen un color azul (para ficocianinas) y rojo (para ficoeritrina) brillante (Ílter et al., 2018). La principal función de estos pigmentos es la transferencia de energía hacia los centros de reacción de la membrana de tilacoides (De Marsac & Cohen-Bazire, 1977). Este grupo de proteínas son explotadas como colorantes para la industria alimentaria (postres, gomas, gelatinas, helados) y farmacéutica (delineadores, pintalabios y maquillaje), e incluso en el desarrollo de anticancerígenos

(Fernández-Rojas et al., 2014; Manirafasha et al., 2016; Martelli et al., 2014; Kim et al., 2014; Kumar et al., 2014; Wu et al., 2016).

Uno de los principales factores para tener en cuenta es la cepa y su procedencia. Si bien todas las cianobacterias producen de forma natural estos pigmentos. la producción y correcto desarrollo de estos va a depender del tipo de cultivo, la intensidad del luz, fotoperiodo y disposición de nutrientes. Los cuales dan paso a la capacidad de adaptabilidad para la optimización del aprovechamiento de los recursos disponibles y disminuye la pérdida de su población. Para la producción de Cianobacterias a Gran escala se han diseñado dos sistemas de producción. los sistemas abiertos los cuales tienen como ventaja su bajo costo económico, teniendo un balance energético más favorable, pero con una facilidad más alta de contaminación por diferentes factores, exponiendo dificultades de mantener las cepas seleccionadas con una alta pureza, además requieren gran espacio de tierra para su cultivo (Zittelli., et al 2013). Los sistemas cerrados conocidos como fotobiorreactores (PBR; sus siglas en inglés) son menos propensos a contaminarse porque controlan rigurosamente los factores abióticos, biológicos, químicos y físicos, los cuales aumentarán el crecimiento de las cianobacterias. Sin embargo, dicho sistema presenta deficiencia, debido a los altos costos operativos, suministro de luz deficiente sumados con el alto riesgo de sobrecalentamiento y su acumulación de oxígeno, dando paso a una inhibición (Solimeno et al., 2017). para que la producción de masiva de biomasa o metabolitos sea optima, es indispensable, los factores de luz como fotoperiodo, tipo de luz, temperatura, concentración de CO<sub>2</sub>, nutrientes y la distribución correcta de los fotones en el cultivo por la agitación. Dichas variables juegan un papel importante en el aprovechamiento energético, de tal forma que permitirá concentraciones celulares más altas y posibilitará la obtención de productos con un alto valor agregado (Perin et al., 2016 & Yen et al., 2014)

Este trabajo pretende demostrar la posibilidad de aumentar la producción a escala laboratorio de biomasa cianobacterial y ficocianinas mediante el entendimiento procesos y técnicas nutrimentales implementado el modelado matemático y experimental. Teniendo en cuenta lo anterior, el presente proyecto tiene como pregunta de investigación: ¿Es posible diseñar un sistema fed-batch que permita la optimización de la producción de biomasa de cianobacterias termotolerantes para la obtención de ficocianinas como metabolitos de alto valor agregado para la industria colombiana? Se espera que este proyecto permita

aumentar significativamente el conocimiento en este campo científico y tecnológico a nivel nacional e internacional.

#### **4. Justificación.**

Durante los últimos años el laboratorio para la innovación en Microalgas y Cianobacterias INNOValgae de la Universidad Francisco de Paula Santander, en cooperación con la Universidad Industrial de Santander han aunado esfuerzos para mejorar el conocimiento básico y aplicado en microalgas y cianobacterias de ambientes nacionales. En el 2020, el laboratorio INNOValgae obtuvo la financiación del proyecto “ALGALCOLOR: BIO-PLATFORM FOR THE SUSTAINABLE PRODUCTION OF CYANOBACTERIAL-BASED COLORS AND FINE CHEMICALS” financiado por NEWTON FUND INSTITUTIONAL, por el cual se obtuvieron cepas únicas aisladas de termales regionales las cuales poseen características únicas para la producción de diferentes ficobiliproteínas (figura 6) en el cual se diseñó el primer portafolio de cianobacterias promisorias en el departamento de Norte de Santander. Dicho portafolio cuenta con 11 cianobacterias pertenecientes a las clases *Cyanophyceae*: *Nostoc* sp, *Leptolyngbya* sp, *Chroococcus* sp y *Potamosiphon* sp con capacidad de producir concentraciones considerables de ficobiliproteínas (especialmente Ficocianina) Hasta el momento, estas cepas han sido evaluadas en condiciones básicas de cultivo (Temperatura 20-30°C, ciclo luz:oscuridad 12:12, medio de cultivo BG11 y 30 días de cultivo) y no se conocen las condiciones necesarias para la optimización en la producción de ficocianinas. Sin embargo es necesario profundizar en las técnicas adecuadas de cultivo que permitan un desarrollo óptimo de la cianobacteria.

El valor comercial de la ficocianina está directamente relacionado con su grado de pureza, que puede variar entre una tasa mínima que se considerará de grado alimenticio (valor aproximado de 0.13 USD/mg) hasta el nivel más alto de pureza (producto considerado de grado analítico), donde el producto puede venderse hasta 25 USD/mg. Sin embargo, optimizar la producción, extracción y purificación de ficocianinas, así como desarrollar formulaciones más estables, puede garantizar una aplicación aún más amplia (Derner, 2006; Spolaore, et al., 2006; Eriksen, 2008).

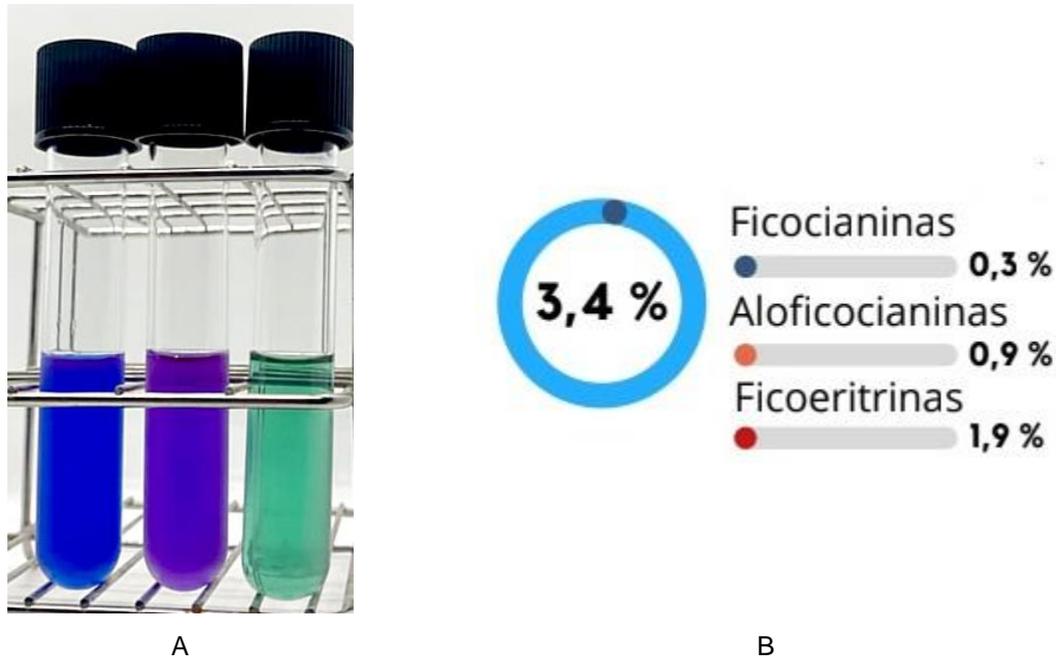


Figura 6. Ficobiliproteínas extraídas de *Potamosiphon* sp (A) y su composición total (B).

Este proyecto propone desarrollar y contribuir a desarrollo sostenible de los Santanderes, mediante la evaluación de un sistema Fed-batch para la producción ficocianinas a partir de Cianobacterias termotolerantes. Obteniendo las condiciones de operación que maximicen la producción de dichos metabolitos, validando el efecto de los diferentes parámetros de luz y su integración con las estrategias de diseño nutricionales, promoviendo la conservación y uso sostenible de la biodiversidad natural como facilitador de capacidades económicas verdes.

#### 4.1. Hipótesis

Las interacciones del flujo nutricional y su integración con los parámetros lumínicos intervienen directamente en la eficiencia de la producción de ficocianina (c-pc) de grado industrial a partir de biomasa de *Potamosiphon* sp.

## **4.2. Objetivo general**

Evaluar un proceso fed-Batch para la producción de ficocianina (C-PC) de grado industrial a partir de biomasa de *Potamosiphon* sp.

## **4.3. Objetivos específicos**

- 4.3.1.** Evaluar el efecto de la calidad de luz (longitud de onda, Fotoperiodo e intensidad) en la producción de biomasa y ficocianinas.
- 4.3.2.** Determinar los parámetros cinéticos de cultivo (Nitrógeno y fosforo) en función de la producción de biomasa y ficocianinas (C-PC).
- 4.3.3.** Establecer el modelo matemático que permita modelar el crecimiento de *Potamosiphon* sp. y la producción de ficocianinas.
- 4.3.4.** Simular una planta de producción de ficocianina (C-PC) a partir de cultivos de *Potamosiphon* sp.

## **5. Metas Alcances y delimitaciones**

### **5.1. Meta**

La meta del proyecto es diseñar un sistema Fed-batch con las mejores condiciones nutricionales y ambientales que permitan la mejora en de la producción de biomasa Cianobacteria para la obtención de pigmentos fotosintéticos como la Ficocianina como metabolito de valor agregado para la industria colombiana, permitiendo el uso sostenible de la biodiversidad natural de la región de Norte de Santander como facilitador de capacidades económicas verdes.

### **5.2. Alcance y delimitación**

#### **5.2.1. Espacial.**

La investigación se llevará a cabo en la universidad Francisco de Paula Santander, sede Campos Elíseos, Los Patios, el área metropolitana de su capital, Cúcuta, Norte de Santander.

### **5.2.2. Temporal.**

El presente trabajo de investigación se desarrollará entre enero y diciembre, correspondientes al periodo académico de los semestres 1 y 2 del año 2023.

### **5.2.3. Conceptual.**

Este proyecto de investigación tiene por conceptos fundamentales el de nutrición, producción, escalado y extracción de pigmentos fotosintéticos cianobacteriales, así como análisis estadísticos de datos.

## **5.3. Tipo de investigación**

La investigación que se desarrollara es de tipo experimental ya que se emplearan metodologías de laboratorio para contrastar, seleccionar, producir y extraer cianobacterias y sus metabolitos en cuestión; además del análisis de la interacción de las variaciones nutricionales y las variables relacionadas con la luz como fuente de energía para la producción.

## **5.4. Población y muestra.**

### **5.4.1. Población.**

Para este proyecto la población fue finita y accesible que corresponde a 1 cepa que se caracterizó como *Potamosiphon* sp. la cual se encuentran conservadas en el banco de cepas del Laboratorio de Investigación **INNOValgæ** sede campos elíseos.

### **5.4.2. Muestra.**

Se realizó un muestreo censal, dado que no fue necesario limitar la muestra para los procesos de producción y extracción.

## 6. Metodología

La metodología implementada en el proyecto se encuentra dividida en dos grandes apartados. la primera encontramos los protocolos diseñados para mantenimiento, cuantificación y cosecha de cianobacterias. Así mismo presenta metodologías implementadas para la extracción y cuantificación de los metabolitos de interés industrial (ficocianinas); por último, tenemos las metodologías y análisis experimental diseñado para el cumplimiento de cada objetivo. En este ítem encontraremos los diseños experimentales y condiciones que serán tenidas en cuenta para la fase experimental del proceso.

### 6.1. Protocolos

#### 6.1.1. Microorganismo y condiciones de cultivo

Para el mantenimiento, escalado y experimentación, las cianobacterias serán reactivadas en medio líquido BG11 (Andersen et al., 2005) trasvasándolas de las cajas Petri a tubos falcón de 15 mL, seguido a 50 mL y finalmente a reactores de 500 mL. Cada fase del mantenimiento y escalado se llevará a cabo teniendo un volumen de trabajo de 60% un fotoperiodo 12:12 con radiación constante de  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y agitados por inmersión e inyección de aire (0.6 vvm) para los tubos y reactores respectivamente. Cada etapa tendrá un periodo de 20 días, a la terminación del tiempo se repetirá el proceso manteniendo los cultivos asépticos y dispuestos para el escalado o experimentación.

#### 6.1.2. Cuantificación de Biomasa (peso seco) (Moheimani et al. 2013).

Para determinar la concentración de biomasa, se implementará la técnica de peso seco donde una vez finalizado la experimentación se tomarán alícuotas entre 10-20 mL de la producción de cianobacterias, se filtrarán utilizando filtros de microfibra de vidrio Whatman GF/C (pre-combustionados) y secaran en el horno durante 24 horas a  $60^{\circ}\text{C}$ , seguido de 2 horas en el desecador para alcanzar peso constante. una vez finalizado el proceso de filtración y secado se tomará el peso del filtro con biomasa para luego determinar su concentración con la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de biomasa (g/L)} = \frac{\text{peso del filtro con biomasa (g)} - \text{peso del filtro (g)}}{\text{Volumen filtrado (L)}} \quad \text{Ec.1}$$

### 6.1.3. Extracción y Cuantificación de Ficocianinas

Para determinar la producción de los pigmentos ficobiliproteicos presentes en las cianobacterias se llevará a cabo una extracción de los pigmentos, teniendo en cuenta la metodología detallada por Chen et al. (2016). Donde inmediatamente después de obtener los filtros con biomasa y libres de humedad se suspendieran en 10 mL de solución buffer fosfato al 0,15 M, pH 7,0 y alrededor de 2 gramos de perlas de vidrio. las células serán destruidas mecánicamente empleando un vortex a 1500 rpm Durante 30 minutos divididos en dos secciones de 15 minutos y dejando descansar la muestra durante 2 minutos en baño de hielo. Al completar el proceso, la muestra será almacenada a 4 °C durante 24 horas; la separación y colecta de los pigmentos se realizará sometiendo la muestra a un proceso de centrifugación a 3400 rpm y °C durante 15 minutos. Finalmente, el sobrenadante será medido en un espectrofotómetro a longitudes de onda de 620, 652 y 562 nm. El cálculo de la concentración de ficocianinas se realizó empleando la ecuación 2 descrita por Bennett & Bogobad. (1973).

$$C - PC \left( \frac{g}{L} \right) = \frac{(OD\ 620 - (0,474 \times OD652))}{5,34} \quad \text{Ec.2}$$

$$A - PC \left( \frac{g}{L} \right) = \frac{(OD\ 652 - (0,208 \times OD620))}{5,09} \quad \text{Ec.3}$$

$$PE \left( \frac{g}{L} \right) = \frac{(OD\ 562 - (2,41 \times C - PC) - (0,849 \times APC))}{9,62} \quad \text{Ec.4}$$

## 6.2. Diseño experimental

### 6.2.1. Evaluación de variables lumínicas.

Se analizará el efecto de 4 colores de luces LED en la producción de biomasa y ficobiliproteínas en la cepa *Potamosiphon* sp. Para lograr lo anterior se empleará un diseño de experimentos de optimización (diseño tipo Custom) utilizando una variable categórica (color de LED), una variable numérica (intensidad de luz LED) y 5 bloques mediante el software Design Expert® (versión 13.0, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA) (tabla 1). la cepa se cultivará en medio BG11 (Andersen et al., 2005) en reactores de 2000 mL con un volumen de trabajo de 1600 mL. El medio se agitará mediante la inyección de aire a un flujo de aproximadamente 180 mL<sub>aire</sub>/min y se mantendrá bajo las condiciones de iluminación de la tabla 1.

Tabla 1. Diseño de experimentos Intensidad de luz y tipo de luz en función de la producción de biomasa y ficocianinas.

Block	Run	Factor 1 A: Intensidad $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .	Factor 2 B: Color
Block 1	1	125	Rojo:Azul_5:1
Block 1	2	200	Blanco
Block 1	3	125	Rojo:Azul_5:1
Block 1	4	200	Rojo:Azul_3:1
Block 1	5	125	Rojo:Azul_4:1
Block 1	6	50	Rojo:Azul_3:1
Block 1	7	200	Rojo:Azul_3:1
Block 1	8	50	Rojo:Azul_3:1
Block 2	9	162.5	Rojo:Azul_3:1
Block 2	10	87.5	Rojo:Azul_4:1
Block 2	11	200	Rojo:Azul_5:1
Block 2	12	125	Verde
Block 2	13	50	Blanco
Block 3	14	125	Rojo:Azul_3:1
Block 3	15	200	Verde
Block 3	16	162.5	Rojo:Azul_4:1
Block 3	17	192.5	Azul
Block 3	18	125	Rojo:Azul_3:1

Block 4	19	200	Rojo:Azul_4:1
Block 4	20	50	Rojo:Azul_4:1
Block 4	21	125	Blanco
Block 4	22	59	Azul
Block 4	23	125	Blanco
Block 5	24	50	Rojo:Azul_5:1
Block 5	25	87,5	Rojo:Azul_3:1
Block 5	26	125	Azul
Block 5	27	50	Verde

Una vez cada 5 días se tomará 5 mL de medio de cultivo, se centrifugará la muestra a 3400 RPM durante 20 minutos, se retirará el sobrenadante y se re-suspenderá el pellet de biomasa en agua destilada. La cuantificación de biomasa y las ficobiliproteínas se realizará de acuerdo con la metodología planteada anteriormente.

### 6.2.2. Efecto del ciclo luz:oscuridad e intensidad

Con base en los resultados obtenidos en la fase anterior, se construyó un nuevo diseño que incorpora la mejor fuente de luz LED para maximizar la síntesis de ficobiliproteínas. Este diseño se centrará en analizar el impacto del ciclo luz:oscuridad y la intensidad lumínica, buscando optimizar la interacción entre estas variables y su influencia en la síntesis de Ficobiliproteínas fotosintéticas. Para llevar a cabo esta evaluación, se implementará un diseño de experimentos de optimización, específicamente un Diseño Central Compuesto, que empleará dos variables numéricas: el ciclo de luz y la intensidad lumínica. Para el diseño experimental el nivel alfa se ha establecido en 1.41, se contó con dos bloques incluyendo 6 puntos centrales en el diseño experimental. Este proceso se llevará a cabo utilizando el software Design Expert 13 de StatEase, como se detalla en la tabla 2.

Para el desarrollo del objetivo propuesto cada cepa se cultivó en un medio BG11 según las especificaciones de Andersen et al. (2005), utilizando reactores de 2000 mL con un volumen de trabajo de 1600 mL. La agitación del medio se realizará mediante la inyección de aire a un flujo aproximado de 180 mL/minuto, manteniendo así las condiciones de iluminación detalladas en la tabla 2.

Finalmente, una vez cada 5 días se tomó 5 mL de medio de cultivo, se centrifugará la muestra a 3400 RPM durante 20 minutos, se retirará el sobrenadante y se re-suspenderá el pellet de biomasa en agua destilada. La cuantificación de biomasa y las ficobiliproteínas se realizará de acuerdo con la metodología planteada anteriormente

Tabla 2. Diseño de experimentos Fotoperiodo e Intensidad de luz en función de la producción de biomasa y ficocianinas.

Std	Block	Run	Factor A	Factor B
			Ciclo luz (h)	intensidad ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )
7	Block 1	1	200	12,5
3	Block 1	2	50	20
4	Block 1	3	350	20
1	Block 1	4	50	5
6	Block 1	5	200	12,5
2	Block 1	6	350	5
5	Block 1	7	200	12,5
8	Block 2	8	-12.132	12,5
9	Block 2	11	412.132	12,5
10	Block 2	14	200	1,89
11	Block 2	9	200	23,1
12	Block 2	13	200	12,5
13	Block 2	10	200	12,5
14	Block 2	12	200	12,5

### 6.2.3. Determinación de constantes cinéticas.

Para la obtención de las constantes cada cinco días se extraerán axénicamente 30 mL de medio cultivo y se concentrará la biomasa por medio de centrifugación (3400 rpm 20 min). La biomasa recuperada será deshidratada (50 °C, 12 h) y se pesará. El medio sin células se filtrará y se utilizará para la determinación de  $\text{NO}_3$  (HI 93728-01, HANNA),  $\text{PO}_4$  (HI 93713-01, HANNA). A partir de los resultados de las concentraciones de biomasa y producción de ficocianinas,  $\text{NO}_3$ ,  $\text{PO}_4$  se describirán las constantes cinéticas por medio de la linealización de la ecuación monod :

$$\mu = \frac{\mu_{max} * S}{K_S + S} \quad \text{Ec. 5}$$

La ecuación de Monod (Ec. 5) describe la relación entre la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y la concentración de sustrato ( $[S]$ ). Para la determinación de las constantes de consumo y rendimiento de producción, se dejó la ecuación de Monod expresada en las variables de interés, en este caso, la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), como una función de la concentración de sustrato ( $[S]$ ), así mismo se invirtió la ecuación de Monod para aislar la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) en el denominador. Como resultado para la determinación de las constantes cinéticas se implementó la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_{max}} + \frac{K_S}{\mu_{max}} * \frac{1}{S} \quad \text{Ec. 6}$$

Para la implementación de la Ecuación 6 se utilizó la ecuación 7 la cual representa la tasa específica de crecimiento microbiano ( $\mu$ ), donde  $X_f$  es la biomasa final,  $X_i$  es la biomasa inicial,  $T_f$  es el tiempo final y  $T_o$  es el tiempo inicial. La expresión  $X_f/X_i$  refleja el factor de crecimiento de la biomasa, indicando cuánto ha aumentado la población cianobacteriana en el intervalo de tiempo dado. El logaritmo natural de este factor,  $\ln(X_f/X_i)$ , es proporcional al tiempo de duplicación de la población. Dividiendo este logaritmo natural entre el intervalo de tiempo  $T_f - T_o$ , obtenemos la tasa específica de crecimiento, proporcionando una medida cuantitativa de la velocidad de crecimiento microbiano en función del tiempo transcurrido.

$$\mu = \frac{\ln(X_f/X_i)}{\Delta t} \quad \text{Ec. 7}$$

Considerando la fase anterior se buscó la mejor opción para recrear un biorreactor tipo Fed-Batch a escala Laboratorio, por lo tanto, se emplearán modelos seleccionados Previamente con los parámetros cinéticos obtenidos, con la finalidad de simular la evolución del crecimiento cianobacterial y producción de ficocianinas a través del tiempo y contrastar dichos valores con los experimentales obtenidos. La cinética que más se ajuste a disminuyendo el porcentaje de error implementando mínimos cuadrados como una correlación de datos matemáticos (ver Ecuación 6). Para ellos se Cultivará la cepa en medio BG11 (Andersen et al., 2005) en reactores de 30 L con un volumen de trabajo de 80% V/V. El medio se agitará mediante la inyección de aire a un flujo de aproximadamente 180 mL<sub>aire</sub>/min y condiciones óptimas anteriores cada 5 días se retirará axenicamente 30 mL de medio de cultivo y se medirá Peso Seco, Ficocianinas, Nitratos, Fosfatos y Carbono orgánico total. Cada experimentación se realizará por triplicado.

$$\% \text{ de error} = \left( \frac{\sum (Ei - Ci)^2}{N_t} \right) \quad \text{Ec.6}$$

En esta investigación, se implementaron tres modelos matemáticos ampliamente utilizados para predecir el crecimiento microbiano en función de la concentración de sustrato: el Modelo Contois, el Modelo Moser y el Modelo Tessier. Cada uno de estos modelos presenta formulaciones específicas que capturan distintos aspectos de las interacciones entre sustrato y biomasa, permitiendo un análisis más detallado del comportamiento del crecimiento microbiano.

**Modelo Contois:** Este modelo se fundamenta en la premisa de que la tasa de crecimiento específico es proporcional a la concentración de sustrato en exceso y la concentración de biomasa. La ecuación utilizada es la Ec.7. donde

- $\mu$  representa la tasa de crecimiento específico.
- $\mu_{max}$  la tasa máxima de crecimiento.
- S la concentración de sustrato.
- $K_s$  la constante de saturación.
- X la concentración de biomasa.

$$\mu = \frac{\mu_{max} * S}{K_s + S * X} \quad \text{Ec.7}$$

**Modelo Moser:** Diseñado para situaciones de cultivos con sustrato limitante, el Modelo Moser establece la relación entre la tasa de crecimiento específico y la concentración de sustrato. Su ecuación es Ec.8. donde los términos mantienen sus significados anteriores y se agrega el parámetro

$$\mu = \frac{\mu_{max} * S}{K_s + S + K_s * X} \quad \text{Ec.8}$$

**Modelo Tessier:** Considerado como una variante del modelo de crecimiento exponencial o Monod, el Modelo Tessier incorpora un término adicional para representar la influencia de la concentración de sustrato. Su ecuación es, donde los términos siguen manteniéndose y  $X^2$  refleja la contribución cuadrática de la biomasa, permitiendo una adaptación más precisa a las complejidades del sistema.

$$\mu = \frac{\mu_{max} * S}{K_S + S + K_S * X^2} \quad \text{Ec.9}$$

La aplicación de estos modelos nos permitió evaluar la idoneidad de cada uno para prever el crecimiento microbiano en diferentes contextos, proporcionando así una comprensión más completa de las interacciones sustrato-biomasa en entornos específicos de cultivo.

#### 6.2.4. Establecimiento y Comprobación de modelo matemático Batch.

Para el establecimiento del modelo se realizó un análisis bibliográfico con la finalidad de obtener el modelo más adecuado que permita predecir el comportamiento de la cianobacterias teniendo en cuenta que debe modelar el crecimiento en función de los nutrientes limitantes dentro del cultivo. Para esto, a partir de los resultados de las etapas anterior, se determinarán las constantes en función de la tasa de consumo de los nutrientes seleccionados previamente (N/P) (ver tabla 3), posteriormente se modelara el comportamiento de los metabolitos de interés (Biomasa y Ficocianinas) y su relación con los nutrientes implementando los modelos cinéticos más adecuados; finalmente se realizará una comprobación de los mismo, donde la cepa se cultivará en medio BG11 (Andersen et al., 2005) en reactores de 10 L con un volumen de trabajo de 8 L. El medio se agitará mediante la inyección de aire a un flujo de aproximadamente 180 mL<sub>aire</sub>/min y se mantendrá bajo las condiciones de iluminación, tipo de luz, fotoperiodo e intensidad lumínica más optimas del apartado anterior. Cada experimentación se realizará por triplicado.

Tabla 3 Constantes cinéticas de modelado

Constantes	Variables
$\mu$	Tasa de crecimiento especifica
$\mu_{max}$	Constante de transformación de Nitrógeno
$Y_{x/s}$	Constante de transformación de Fosforo
$Y_{p/s}$	Constante de Producción de Ficocianinas

### 6.2.5. Diseño y comprobación del proceso Fed-Batch.

Considerando la fase anterior se buscó la mejor opción para recrear un biorreactor tipo Fed-Batch a escala Laboratorio, por lo tanto, se emplearán modelos seleccionados Previamente con los parámetros cinéticos obtenidos, con la finalidad de simular la evolución del crecimiento cianobacterial y producción de ficocianinas a través del tiempo y contrastar dichos valores con los experimentales obtenidos. Para ellos se Cultivará la cepa en medio BG11 (Andersen et al., 2005) en reactores de 30 L con un volumen de trabajo de 80% V/V. El medio se agitará mediante la inyección de aire a un flujo de aproximadamente 180 mL<sub>aire</sub>/min y condiciones óptimas anteriores cada 5 días se retirará axenicamente 30 mL de medio de cultivo y se medirá Peso Seco, Ficocianinas, Nitratos, Fosfatos y Carbono orgánico total. Cada experimentación se realizará por triplicado.

### 6.2.6. Simulación una planta de producción de ficocianina (C-PC) a partir de cultivos de *Potamosiphon* sp.

La simulación de la planta de producción de ficocianina mediante el uso de cultivos de *Potamosiphon* sp se llevó a cabo utilizando el software SuperPro Designer® v8.0, una herramienta reconocida por su capacidad para modelar procesos bioquímicos y optimizar operaciones industriales. Este software, desarrollado por Intelligen, Inc., con sede en Scotch Plains, Nueva Jersey, EE. UU., proporcionó un entorno robusto para implementar los parámetros óptimos derivados de la investigación en curso.

En el proceso de escalado, se adoptó una estrategia potencial, donde la producción de biomasa cianobacterial, alcanzada después del tiempo óptimo determinado en los cultivos fed-batch, se transfirió a un sistema de mayor capacidad. Este nuevo sistema presentó una capacidad diez veces mayor que el anterior, dando lugar a un aumento significativo en la producción. La implementación de un tren de inoculación permitió trabajar con volúmenes finales de 50, 100 y 200 m<sup>3</sup>, brindando flexibilidad operativa y adaptabilidad a diferentes demandas de producción. Para el cosechado de la biomasa cianobacterial, se optó por la centrifugación, una técnica ampliamente utilizada a nivel industrial debido a su eficiencia en la separación de sólidos y líquidos. Este paso fue crucial para concentrar la biomasa y facilitar las etapas posteriores del proceso.

En el proceso de extracción y secado, se siguieron los parámetros óptimos establecidos por Barajas-Solano (2022). La etapa de secado se llevó a cabo mediante deshidratación a una temperatura controlada de 40 °C durante un período de 30 horas, asegurando condiciones ideales para preservar la calidad del producto final. La extracción de las ficocianinas, metabolito de interés, se realizó en un homogeneizador, comúnmente conocido como reactor de perlas. Este equipo funcionó con una relación biomasa/solvente de 0,26 y una proporción perlas/biomasa de 14.9 durante 30 minutos, con una agitación constante a 1500 RPM. Posteriormente, se aplicó una cadena de frío de 24 horas a 16 °C para la saturación del producto. La etapa final del proceso implicó la centrifugación del material obtenido y la recolección del sobrenadante para someterlo a un proceso de purificación con sulfato de amonio. Este método, reconocido por su eficacia en la separación de proteínas, permitió obtener un producto final de alta pureza. El empaquetamiento y conservación se llevaron a cabo según las mejores prácticas de la industria, garantizando la estabilidad y calidad del producto a lo largo de su vida útil.

## 7. Resultados y discusión

### 7.1. Primer diseño de experimentos

#### 7.1.1. Producción de biomasa

El posible efecto de la calidad de la luz en la síntesis de biomasa y múltiples metabolitos en cianobacterias y microalgas incluye aspectos como la longitud de onda, el fotoperíodo y la intensidad, se observó que dichas variables son significantes en el crecimiento y producción de ficocianina. Para el análisis de la concentración de biomasa el análisis de varianza (ANOVA) realizado (tabla 8). El modelo que más se ajusta a la producción de Biomasa es el modelo 2FI. Este modelo permite evaluar la interacción entre máximo dos variables independientes. La elección de este modelo se justifica porque el modelo propuesto es significativo estadísticamente, tanto para el F-value (96.06), como para el p-value ( $p < 0.0001$ ). En este caso, los factores intensidad (A), color (B) y la interacción entre las variables (AB) afectan significativamente el crecimiento celular (tabla 8). En general se considera que un F-value mayor a 1 y un p-value menor de 0.05 (95% de confianza) son significativos y que las variables consideradas son relevantes en el contexto de la investigación (Ortiz-Moreno et al., 2020). Finalmente, el Lack of fit del modelo demuestra que el “ruido” experimental es pequeño en comparación con la “señal” de los datos.

Tabla 4. Análisis ANOVA producción de biomasa

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value
Block	0,1780	4	0,0445		
<b>Model</b>	1,09	11	0,0989	96,06	< 0,0001*
A-Intensidad	0,5346	1	0,5346	519,34	< 0,0001*
B-Color	0,4924	5	0,0985	95,66	< 0,0001*
AB	0,1449	5	0,0290	28,16	< 0,0001*
<b>Residual</b>	0,0113	11	0,0010		
Lack of Fit	0,0061	6	0,0010	0,9718	0,5233**
Pure Error	0,0052	5	0,0010		
<b>Cor Total</b>	1,28	26			

\* Significativo, \*\* No significativo

Por otro lado, la tabla 9 presenta los estadísticos de ajuste para el modelo propuesto para la concentración de biomasa bajo las dos variables seleccionadas. Las estadísticas de

ajuste, como la desviación estándar (0.0321) y el coeficiente de variación (%CV) del 8.89%, junto con los coeficientes de determinación ( $R^2$ ,  $R^2$  ajustado,  $R^2$  predicho) cercanos al 1, indican una calidad del ajuste del modelo. Lo cual permite Validar la predicción de posteriores resultados de Las variables dependientes y su interacción con las independientes como intensidad y color.

Tabla 5. Estadísticos de ajuste para el modelo propuesto de producción de biomasa.

<b>Std. Dev.</b>	0,0321	<b>R<sup>2</sup></b>	0,9897
<b>Mean</b>	0,3611	<b>Adjusted R<sup>2</sup></b>	0,9794
<b>C.V. %</b>	8,89	<b>Predicted R<sup>2</sup></b>	0,9219
		<b>Adeq Precision</b>	35,1554

### 7.1.2. Concentración de C-PC

En el caso de la concentración de C-PC, el análisis de varianza (ANOVA) demuestra que el modelo matemático que más se ajusta es un 2FI, lo que sugiere un diseño factorial de dos factores independientes. Al igual que en la producción de biomasa, los factores intensidad (A), color (B) y la interacción entre las variables (AB) afectan significativamente la síntesis de C-PC (F-value 80.34; p-value  $p < 0.0001$ ) (tabla 10). Estos resultados indican que tanto la intensidad como el color tienen un impacto importante en las respuestas observadas, lo cual se ajusta a los resultados reportados por Rizzo et al. (2015) y Contreras-Ropero et al. (2022). La falta de significancia del Lack of Fit contribuye a la confianza en las conclusiones del análisis de ANOVA, respaldando la capacidad del modelo para explicar la variabilidad presente en los datos. Así mismo, valor del error puro revela una variabilidad controlada, lo determina que el modelo aborda adecuadamente las fuentes principales de variación.

Tabla 6. Análisis ANOVA para la concentración de C-PC

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	P-value
--------	----------------	----	-------------	---------	---------

Block	9,07	4	2,27		
<b>Model</b>	53,19	11	4,84	80,34	< 0,0001*
A-Intensidad	20,24	1	20,24	336,35	< 0,0001*
B-Color	26,16	5	5,23	86,91	< 0,0001*
AB	9,19	5	1,84	30,55	< 0,0001*
<b>Residual</b>	0,6621	11	0,0602		
Lack of Fit	0,4238	6	0,0706	1,48	0,3414**
Pure Error	0,2383	5	0,0477		
<b>Cor Total</b>	62,92	26			

\* Significativo, \*\* No significativo

En cuanto a las estadísticas de ajuste (tabla 11) estos valores, en conjunto, respaldan la calidad del ajuste del modelo. Los coeficientes de determinación ( $R^2$ ,  $R^2$  ajustado,  $R^2$  predicho) refuerzan la capacidad explicativa del modelo.

Tabla 7. Estadísticos de ajuste sobre la concentración de C-PC

<b>Std. Dev.</b>	0.2453	<b>R<sup>2</sup></b>	0,9877
<b>Mean</b>	2,60	<b>Adjusted R<sup>2</sup></b>	0,9754
<b>C.V. %</b>	9,43	<b>Predicted R<sup>2</sup></b>	0,8489
		<b>Adeq Precision</b>	31,5050

### 7.1.3. Pureza del extracto de C-PC

La pureza del C-PC extraído, el cual se determina a partir del índice de pureza de las ficocianinas no solo impacta la calidad y eficacia de los productos finales, sino que también tiene implicaciones directas en la seguridad del consumidor, la optimización de procesos industriales y el cumplimiento de normativas, consolidándolo como un parámetro esencial en la cadena de producción y aplicación de estos valiosos pigmentos naturales (Felipe, 2006). El análisis de la ANOVA (tabla 12) demuestra que el modelo que más se adecua al comportamiento de los datos fue al modelo cuadrático. De igual forma, los factores intensidad (A), color (B), intensidad elevado al cuadrado ( $A^2$ ) y la interacción entre las variables (AB) afectan significativamente la síntesis de C-PC (F-value 70.05; p-value  $p < 0.0001$ ) (tabla 12).

Es fundamental destacar que, previo al análisis de varianza (ANOVA), se aplicó una transformación logarítmica natural a los datos del Índice de Pureza. Esta decisión se tomó con el propósito de ajustar los valores a un modelo cuadrático de manera más efectiva,

considerando la posibilidad de relaciones no lineales entre las variables. Dicha transformación logarítmica se basa en la premisa de que este tipo de ajuste puede facilitar la captura de patrones complejos y no lineales en los datos, lo cual es particularmente relevante cuando se trabaja con modelos cuadráticos. La transformación logarítmica puede ayudar a estabilizar la varianza y mejorar la linealidad, lo que a su vez contribuye a una interpretación más precisa de los efectos de las variables en el Índice de Pureza. (Gardini et al., 2021).

Tabla 8. Análisis ANOVA para el índice de pureza de C-PC

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value
Block	0,9709	4	0,2427		
<b>Model</b>	4,05	12	0,3376	70,05	< 0,0001*
A-Intensidad	1,76	1	1,76	365,11	< 0,0001*
B-Color	1,72	5	0,3438	71,34	< 0,0001*
AB	0,2314	5	0,0463	9,60	0,0014*
A <sup>2</sup>	0,3476	1	0,3476	72,14	< 0,0001*
<b>Residual</b>	0,0482	10	0,0048		
Lack of Fit	0,0400	5	0,0080	4,89	0,0531**
Pure Error	0,0082	5	0,0016		
<b>Cor Total</b>	5,07	26			

\* Significativo, \*\* No significativo

Los estadísticos de ajuste revelan la validez del modelo (tabla 13). La baja desviación estándar (0,0694) y el coeficiente de variación (11.69%) indican consistencia y estabilidad en las mediciones. Los coeficientes de determinación, con un R<sup>2</sup> de 0.9882 y un R<sup>2</sup> Ajustado de 0,9741, destacan la capacidad del modelo para explicar la variación en la respuesta y generalizar a nuevas observaciones. El R<sup>2</sup> Predicho (83,35%) soporta la fiabilidad del modelo en predicciones futuras. Así mismo, la relación señal-ruido (Adequate Precision = 36.0006) sugiere que el modelo es robusto y puede utilizarse confiablemente en el diseño experimental, fortaleciendo así la credibilidad de los resultados obtenidos en el ANOVA y proporcionando una base metodológica sólida para la interpretación de las relaciones entre las variables estudiadas.

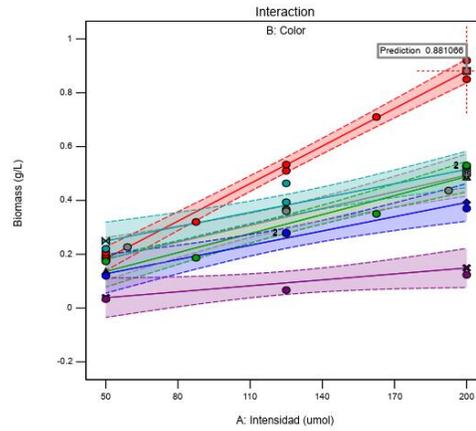
Tabla 9. Estadísticas de ajuste sobre el índice de pureza de C-PC

<b>Std. Dev.</b>	0,0694	<b>R<sup>2</sup></b>	0,9882
<b>Mean</b>	-0,5937	<b>Adjusted R<sup>2</sup></b>	0,9741

<b>C.V. %</b>	11.69	<b>Predicted R<sup>2</sup></b>	0,8335
		<b>Adeq Precision</b>	36.0006

La representación gráfica del comportamiento de los resultados se presenta de manera clara en la Figura 7, donde se destaca la influencia de la relación de luz roja a azul en 3:1 en diversos aspectos del proceso. Esta proporción específica emerge como un factor determinante en la producción de biomasa y ficocianinas, así como en la pureza de los pigmentos resultantes. Los hallazgos convergen con investigaciones recientes, como las llevadas a cabo por Contreras-Ropero et al. (2022), cuyos resultados han proporcionado una comprensión más profunda de la interacción entre la luz y el cultivo de cianobacterias. Contreras-Ropero et al. (2022) determinaron que una combinación precisa de LED rojo y azul, con una intensidad de  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , incide de manera significativa en el desarrollo de la biomasa, registrando un aumento de hasta el 200 % de su concentración en comparación con condiciones de cultivo convencionales con lámparas fluorescentes. Además, se evidenció un incremento notable del 40 % en la producción de ficocianinas, compuestos pigmentarios cruciales, junto con un índice de pureza que supera el 20 % en relación a las cepas cultivadas bajo fuentes de luz convencionales.

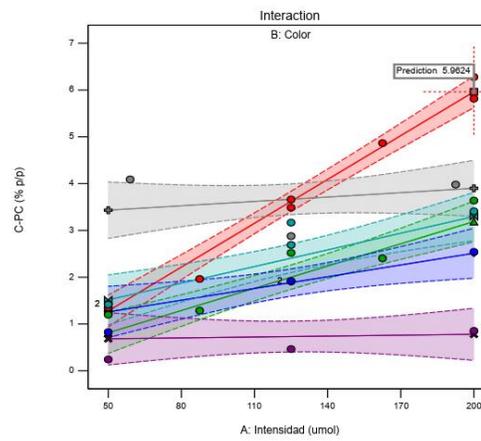
Este fenómeno resalta la importancia del ajuste del flujo lumínico en los cultivos de cianobacterias subrayando la capacidad de las combinaciones específicas de luz para desencadenar respuestas metabólicas y bioquímicas particulares. La luz roja, en este contexto, emerge como un promotor clave del crecimiento de la biomasa, mientras que las longitudes de onda rojas y azules exhiben un papel fundamental en la concentración y producción de ficobiliproteínas, esenciales para la fisiología celular de las cianobacterias. De acuerdo con Loreto et al. (2003) las características inherentes de cada especie, al igual que las condiciones del medio ambientales pueden modular las respuestas a las distintas longitudes de onda. Este estudio permite determinar que las cianobacterias de diferentes géneros y especies pueden exhibir respuestas variables a la luz roja y azul, lo que sugiere la existencia de adaptaciones específicas a nivel genético que rigen las interacciones luz-cianobacteria.



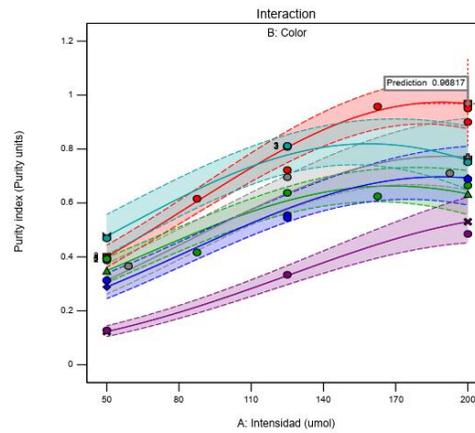
a.

Factor Coding: Actual  
All Responses  
● Design Points

■ B1 Rojo:Azul\_3:1  
▲ B2 Rojo:Azul\_4:1  
◆ B3 Rojo:Azul\_5:1  
⊕ B4 Azul  
⊗ B5 Verde  
⊖ B6 Blanco



b.



c.

Figura 7 Codificación de factores en función de: (a) concentración de Biomasa; (b) concentración de C-PC; (c) Índice de pureza de C-PC.

Finalmente, mediante la aplicación de los criterios de deseabilidad, conseguimos identificar una solución óptima que nos brinda la capacidad de determinar las variables más eficientes, aquellas que maximizan el rendimiento en biomasa, C-PC e índice de pureza. Estos criterios de deseabilidad son ampliamente reconocidos y utilizados para evaluar y seleccionar la mejor solución o resultado entre diversas opciones. Su aplicación puede variar según el problema o la situación específica que se esté abordando; sin embargo, en términos generales, buscan maximizar o minimizar ciertas variables, garantizar la factibilidad y optimizar los resultados en función de costos o eficiencia. De acuerdo con los resultados obtenidos en el software Design Expert se proponen las condiciones necesarias de tipo de luz e intensidad que permitan maximizar las tres variables de respuestas estudiadas; lo anterior se presenta en la tabla 14, donde de acuerdo con la solución numérica, las mejores condiciones son luz LED Rojo Azul en una relación 3:1 y una intensidad de  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Estos resultados son fundamentales para la creación de un nuevo diseño de experimentos que incorpora la mejor fuente de luz LED disponible, con el objetivo de maximizar la síntesis de ficobiliproteínas, componentes esenciales en los procesos biológicos de las cianobacterias.

Tabla 10. Condiciones obtenidas para mejorar la concentración de biomasa, C-PC y pureza de C-PC.

<b>Codigo</b>	<b>Variable</b>	<b>Unidad</b>	<b>Valor</b>
A	Intensidad	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	200
B	Color	n/a	Rojo:Azul 3_1
Z <sup>1</sup>	Biomasa	g/L	0,88
Z <sup>2</sup>	C-PC	% p/p	5,96
Z <sup>3</sup>	Pureza de C-PC	Indice de pureza	0,96

## 7.2. Segundo diseño de experimentos

Una vez identificada el mejor tipo de LEDs que maximiza la concentración de biomasa, C-PC y pureza de C-PC se plantea un nuevo diseño experimental que permitirá evaluar y ajustar el impacto del fotoperiodo en la maximización de las tres variables de respuesta propuestas. Para lograr lo anterior se empleó un diseño de dos factores y 3 niveles de tipo central compuesto (CCD) acoplado con superficie de respuesta, para un total de 14 experimentos separados en 2 bloques. El cambio de un diseño tipo custom a un CCD permitió hacer la transición hacia modelos más complejos como los cuadráticos; dado que, Mientras que los modelos 2FI empleados en diseños que evalúan factores categóricos discretos, la evaluación de variables numéricas continuas permite evaluar dinámicas más complejas, llevando a considerar efectos cuadráticos y otras formas de variabilidad no contempladas en modelos más simples. Entonces la migración hacia modelos cuadráticos se justifica por la necesidad de capturar estas complejidades emergentes y proporciona una mayor flexibilidad para representar patrones sofisticados. Esta transición no solo implica un aumento en la sofisticación estadística, sino también una mejor capacidad para explicar la variabilidad en los datos, permitiendo así una interpretación más precisa de las relaciones entre las variables y una toma de decisiones más informada en el contexto de la investigación experimental.

### 7.2.3. Producción de Biomasa

De acuerdo con la ANOVA para la producción de biomasa (tabla 15) se puede observar que el valor del F-value obtenido es de 237.68, por lo cual el modelo es significativo; de igual forma, las variables intensidad (A), fotoperiodo (B), su interacción y su respuesta elevada al cuadrado ( $A_2$  y  $B^2$ ) afectan el crecimiento del microorganismo ( $p < 0.0001$ ).

Tabla 11. Análisis ANOVA sobre la producción final de biomasa

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value
Block	0,0018	1	0,0018		
<b>Model</b>	1,13	5	0,2262	237,68	< 0,0001*
A-Intensity	0,2698	1	0,2698	283,47	< 0,0001*
B-Photoperiod	0,0450	1	0,0450	47,27	0,0002*
AB	0,0139	1	0,0139	14,63	0,0065*
A <sup>2</sup>	0,5666	1	0,5666	595,24	< 0,0001*
B <sup>2</sup>	0,2939	1	0,2939	308,76	< 0,0001*
<b>Residual</b>	0,0067	7	0,0010		
Lack of Fit	0,0067	3	0,0022		
Pure Error	0,0000	4	0,0000		
<b>Cor Total</b>	1,14	13			

\* Significativo, \*\* No significativo

Los estadísticos de ajuste para la concentración de biomasa (tabla 16) demuestran que el modelo propuesto presenta un ajuste estadísticamente significativo

Tabla 12. Estadísticas de ajuste para la concentración de biomasa

<b>Std. Dev.</b>	0,0309	<b>R<sup>2</sup></b>	0,9941
<b>Mean</b>	0,5577	<b>Adjusted R<sup>2</sup></b>	0,9900
<b>C.V. %</b>	5,53	<b>Predicted R<sup>2</sup></b>	0,9427
		<b>Adeq Precision</b>	38,3466

La superficie de respuesta que describe el comportamiento de la producción de biomasa en relación con la intensidad de luz y el fotoperiodo (Figura 9) en la cual se genera un cono donde se encuentra una zona con máxima respuesta rodeada de menores valores. Lo anterior sugiere que la respuesta de la biomasa a las variables experimentales sigue un patrón específico, siendo más favorable en ciertos rangos de intensidad lumínica y duración del fotoperiodo. La identificación de estos óptimos se traduce en valores máximos situados en un rango de 170 a 290 ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) de intensidad de luz y de 11 a 20 horas de luz como variable de fotoperiodo, logrando una producción máxima de 0,83 g/L de biomasa. Este hallazgo es consistente con investigaciones previas que han subrayado la importancia de la luz y el fotoperiodo en el crecimiento y la productividad de estos organismos

fotosintéticos, respaldando la validez y relevancia de los resultados obtenidos (Junique et al., 2021).

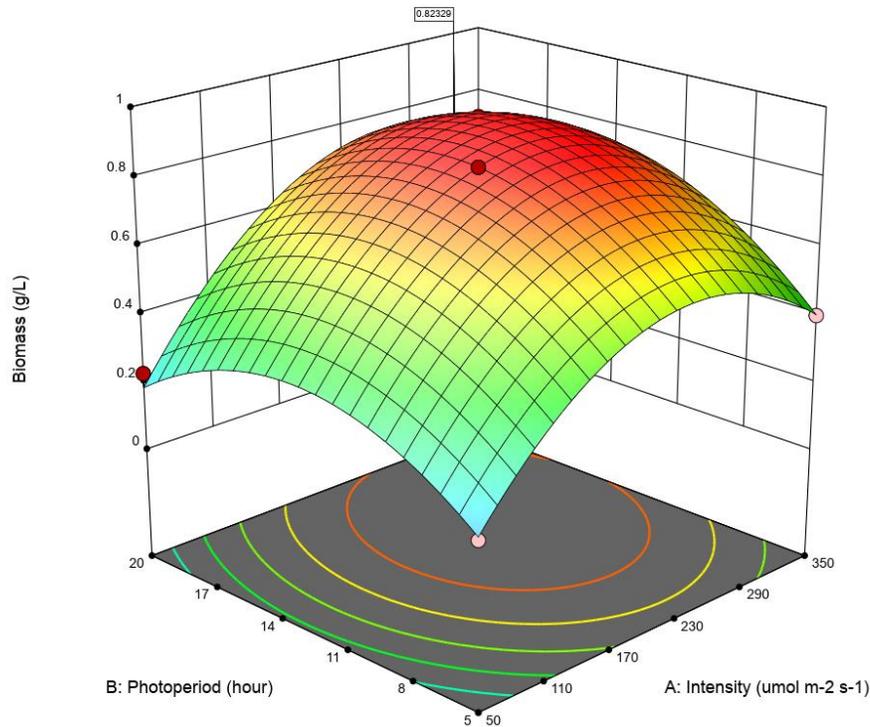


Figura 8. Superficie de respuesta en función de Biomasa

#### 7.2.4. Concentración de C-PC

Para el caso de la concentración de C-PC, la ANOVA (tabla 17) presenta un F-value y un p-value significativos (734.93, < 0.0001 respectivamente). Para lograr lo anterior, el software recomendó realizar una transformación de los datos mediante la ley de potencias. La Transformación de Potencia resulta ser una herramienta valiosa cuando se enfrenta a datos que no cumplen con los supuestos de normalidad. Al ajustar el valor de Lambda, que en este caso fue de 1.41, se sugiere que una transformación de potencia con una leve compresión hacia abajo es la óptima. Este proceso se vuelve especialmente útil cuando se trabaja con datos que exhiben heterocedasticidad o distribuciones sesgadas (Pelea, 2018). Por otro lado, al seleccionar la constante de 0 en la transformación, se indica que no se ha aplicado ningún desplazamiento a los datos, manteniendo así su posición relativa en la escala. Este parámetro es esencial al interpretar los resultados, ya que el desplazamiento

puede afectar la interpretación de los coeficientes y las comparaciones entre niveles de los factores. Esto logra una distribución más simétrica y homogénea, mejorando la validez de las inferencias realizadas mediante el modelo estadístico.

En cuanto a la implementación de bloques en el diseño experimental, se observó que la suma de cuadrados para los bloques fue nula, lo que indica la ausencia de efectos significativos. Este resultado sugiere que la variabilidad observada en el estudio no se ve influida de manera significativa por la variable de bloques.

Al analizar los valores de intensidad y fotoperiodo, se identificaron patrones y tendencias, y se evidenció que tanto la intensidad como el fotoperiodo son términos significativos (Alvarez, 2018).

Tabla 13. Análisis ANOVA para la concentración de C-PC

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	P-value
Block	0,3344	1	0,3344		
<b>Model</b>	376,87	5	75,37	734,93	< 0,0001*
A-Intensity	117,09	1	117,09	1141,68	< 0,0001*
B-Photoperiod	54,23	1	54,23	528,79	< 0,0001*
AB	0,1293	1	0,1293	1.26	0,2986**
A <sup>2</sup>	126,71	1	126,71	1235,51	< 0,0001*
B <sup>2</sup>	94,31	1	94,31	919,52	< 0,0001*
<b>Residual</b>	0,7179	7	0,1026		
Lack of Fit	0,7179	3	0,2393		
Pure Error	0,0000	4	0,0000		
<b>Cor Total</b>	377,92	13			

\* Significativo, \*\* No significativo

Finalmente, al profundizar en las estadísticas de ajuste y las gráficas vinculadas a los coeficientes de determinación, se consolidó el modelo en su capacidad para explicar la variabilidad inherente a los datos. La precisa predicción, expresada a través de Adeg Precision con un valor de 69.770, destaca la eficacia del modelo cuadrático reducido en la anticipación de resultados. Este indicador de precisión señala que la relación señal-ruido es más de 69 veces mayor, proporcionando una sólida confianza en la capacidad del modelo para generalizar más allá de los datos utilizados en el estudio.

La coherencia entre el R<sup>2</sup> ajustado y el R<sup>2</sup> predicho refuerza la fiabilidad del modelo en diferentes contextos, indicando que la capacidad explicativa del modelo se mantiene

robusta. Este nivel de concordancia sugiere que el modelo no solo se ajusta bien a los datos actuales, sino que también tiene un alto grado de generalización, lo que es crucial al considerar su aplicabilidad en situaciones diversas.

Tabla 14. Estadísticas de ajuste para la concentración de C-PC

<b>Std. Dev.</b>	0,3202	<b>R<sup>2</sup></b>	0,9981
<b>Mean</b>	9,59	<b>Adjusted R<sup>2</sup></b>	0,9967
<b>C.V. %</b>	3,34	<b>Predicted R<sup>2</sup></b>	0,9828
		<b>Adeq Precision</b>	61,8423

La superficie de respuesta en función de la concentración de C-PC (figura 10) revela patrones significativos en la producción de pigmentos en función de la intensidad de luz y el fotoperiodo. En los valores máximos de la gráfica, que oscilan entre 170 y 290  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y un fotoperiodo de 8 a 20 horas de luz, se observa una clara concavidad lo cual establece la existencia de un posible óptimo global para la concentración de C-PC. Este comportamiento nos indica que a medida que nos acercamos a ciertos valores críticos de intensidad lumínica y duración del fotoperiodo, la producción de C-PC tiende a maximizarse, lo que es crucial para definir las condiciones ideales que favorecerán la síntesis de este compuesto. Estos resultados están en concordancia con diversas investigaciones, las cuales han estudiado el impacto de la luz en la producción de ficocianina en cianobacterias. Uno de las Investigaciones reveló que diferentes intensidades de luz pueden estimular el crecimiento y favorecer la síntesis de pigmentos específicos en *Synechococcus* sp., indicando que la manipulación de cultivos para la producción de biomasa enriquecida con pigmentos debe considerar la calidad de la luz, la intensidad de la luz y el fotoperiodo (Rosales-Loaiza et al., 2007). Por otro lado, otros autores que realizaron una investigación sobre la cianobacteria marina *Oscillatoria* sp. MOF-06 reveló que la producción de ficocianina depende más del pH que de otros factores como la eficiencia fotosintética, la intensidad de la luz o la tasa fotosintética máxima (Fuenmayor et al., 2009).

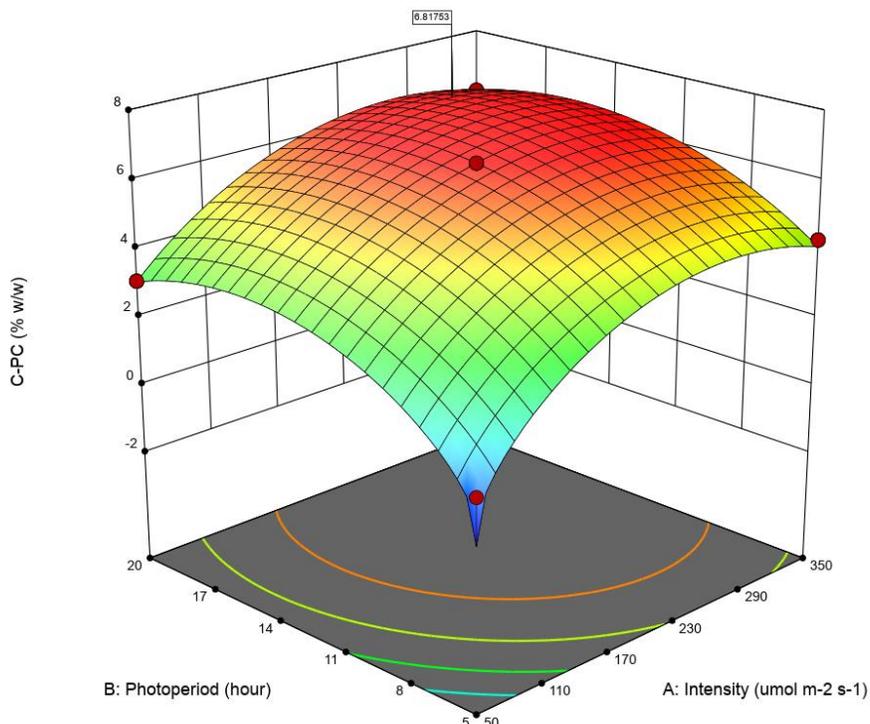


Figura 9. Superficie de respuesta en función de C-PC

### 7.2.5. Índice de pureza de C-PC

El análisis ANOVA la pureza de C-PC (tabla 19) determinó que la distribución de los datos se ajustaba de manera notable a un modelo cuadrático. Además, se destacó la influencia de la implementación de bloques en el diseño experimental, revelando una contribución aparentemente modesta pero potencialmente significativa en la variabilidad total, con una suma de cuadrados de 0.0079 y 1 grado de libertad. Las representaciones gráficas asociadas con la intensidad (A) y el fotoperiodo (B) exhibieron patrones notables, respaldados por valores F significativos de 103.28 y 81.15, respectivamente. La interacción AB entre la intensidad y el fotoperiodo surgió como un hallazgo destacado, sugiriendo que la combinación de ambas variables podría generar efectos sustanciales, más allá de una simple suma. La evaluación de las gráficas residuales y de falta de ajuste confirmó la robustez del modelo cuadrático reducido al explicar la variabilidad observada y reveló una falta de ajuste insignificante. Por otro lado, la revisión de las gráficas residuales y de falta de ajuste corroboró una vez más que el modelo cuadrático proporciona una explicación adecuada para el comportamiento de las variables. Este análisis refuerza la confianza en

la capacidad del modelo para representar de manera efectiva la relación entre las variables estudiadas.

Tabla 15. Análisis ANOVA para el índice de pureza de C-PC

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	P-value
Block	0,0079	1	0,0079		
<b>Model</b>	<b>1,77</b>	<b>4</b>	<b>0,4418</b>	<b>54,53</b>	<b>&lt; 0,0001</b>
A-Intensity	0,8367	1	0,8367	103,8	< 0,0001
B-Photoperiod	0,6574	1	0,6574	81,15	< 0,0001
A <sup>2</sup>	0,2382	1	0,2382	29,40	0,0006
B <sup>2</sup>	0,0499	1	0,0499	6,16	0,0380
<b>Residual</b>	<b>0,0648</b>	<b>8</b>	<b>0,0081</b>		
Lack of Fit	0,0648	4	0,0162		
Pure Error	0,0000	4	0,0000		
<b>Cor Total</b>	<b>1,84</b>	<b>13</b>			

\* Significativo, \*\* No significativo

Finalmente, los estadísticos de ajuste (tabla 20) junto con los coeficientes de determinación ( $R^2$ ,  $R^2$  Ajustado,  $R^2$  Predicho), proporcionaron una visión integral de la calidad del modelo. La desviación estándar fue de 0.0900, la media de 0.7736 y el coeficiente de variación (%CV) de 11.63, revelando la consistencia y precisión del modelo. Los coeficientes de determinación mostraron un  $R^2$  de 0.9646, indicando que el 96.46% de la variabilidad total es explicada por el modelo, y tanto el  $R^2$  Ajustado (0.9469) como el  $R^2$  Predicho (0.8020) respaldan la capacidad explicativa del modelo. En conjunto, este análisis de ANOVA no solo resalta la significancia estadística del modelo sino también su capacidad para proporcionar información valiosa y confiable sobre las complejidades subyacentes en el fenómeno estudiado.

Tabla 16. Estadísticos de ajuste para el índice de pureza de C-PC

<b>Std. Dev.</b>	0,0900	<b>R<sup>2</sup></b>	0,9646
<b>Mean</b>	0,7736	<b>Adjusted R<sup>2</sup></b>	0,9469
<b>C.V. %</b>	11,63	<b>Predicted R<sup>2</sup></b>	0,8020
		<b>Adeq Precision</b>	20,7073

La superficie de respuesta expone información sobre las condiciones óptimas para maximizar el índice de pureza en el proceso bajo estudio. La Figura 11 representa la interacción entre la intensidad de luz y el fotoperiodo en relación con el índice de pureza. Dicha grafica muestra los niveles que son esenciales para comprender y optimizar el

sistema. En primer lugar, la forma de la superficie de respuesta muestra una leve inclinación, indicando una relación positiva entre la intensidad de luz, el fotoperiodo y el índice de pureza. Esta inclinación sugiere que a medida que tanto la intensidad de luz como el fotoperiodo aumentan, el índice de pureza también tiende a incrementarse. La relación positiva entre estas variables resalta la importancia de encontrar el equilibrio adecuado entre la intensidad de luz y el fotoperiodo para maximizar la pureza total. Los valores máximos de la intensidad de luz están comprendidos entre 290 y 350 ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), mientras que los fotoperiodos óptimos se encuentran en el rango de 17 a 20 horas de luz. Estos valores representan los extremos altos de las variables independientes y son críticos para alcanzar el punto más alto en cuanto al índice de pureza. La importancia de estos extremos se refleja en la consecución del índice de pureza total de 1.208, indicando que estas condiciones específicas generan la máxima calidad deseada en el producto final. Dichos resultados están en concordancia con Contreras-Ropero et al. (2022) donde logro identificar que La pureza de las ficobiliproteínas puede verse afectada por los parámetros de luz utilizados durante el cultivo, lo que sugiere que el tipo de iluminación utilizado puede desempeñar un papel importante en la calidad de las ficobiliproteínas producidas. Por otro lado, la optimización de dichos pigmentos también se ve influenciado por la optimización del medio de cultivo, el cual afecta la acumulación de las ficobiliproteínas. Un estudio determino que la pureza de las ficobiliproteínas (PBPs) puede ser afectada por varios factores, incluyendo la concentración de micronutrientes en el medio de cultivo. Un estudio encontró que la reducción de la concentración de micronutrientes en un 50% resultó en un aumento significativo en la producción de C-PC, APC y PE, sin afectar la pureza de las PBPs (Zuorro et al., 2021).

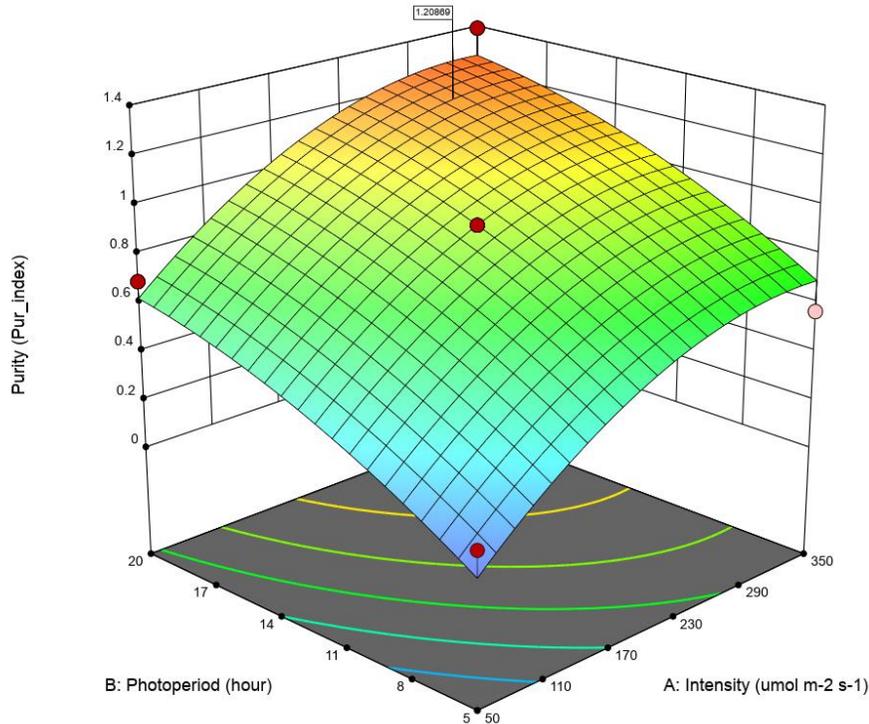


Figura 10. Superficie de respuesta en función del índice de pureza de C-PC

De acuerdo con los resultados obtenidos en el software Design Expert se proponen las condiciones necesarias intensidad y fotoperiodo que permitan maximizar las tres variables de respuestas estudiadas; lo anterior se presenta en la tabla 21. Estas condiciones fueron probadas para determinar la estabilidad del modelo propuesto. Para lograr lo anterior se inocularon 10 nuevos reactores (original y 9 replicas) de acuerdo con las condiciones de luz especificadas previamente.

Tabla 17. Condiciones obtenidas para maximizar la concentración de biomasa, C-PC y pureza de C-PC.

<b>Codigo</b>	<b>Variable</b>	<b>Unidad</b>	<b>Valor</b>
A	Intensidad	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	283
B	Fotoperiodo	h	17,8
Z <sup>1</sup>	Biomasa	g/L	0,83
Z <sup>2</sup>	C-PC	% p/p	6,82
Z <sup>3</sup>	Pureza de C-PC	Índice de pureza	1,20

Los valores obtenidos para la concentración de biomasa, C-PC y pureza de C-PC obtenidos de las condiciones de la tabla 21 fueron analizados empleando un t-test de una muestra en el software PRISM (Versión 10.1.0). Los resultados (figura 12) demuestran que el modelo propuesto es estable y que los datos se comportan como el esperado, por lo cual es posible afirmar que la maximización de las condiciones de luz permite aumentar la concentración de biomasa (figura 12a), C-PC (figura 12b) y pureza de C-PC extraído (figura 12c). De igual forma, el modelo de maximización evidentemente permite obtener una mayor cantidad de biomasa, C-PC y una alta pureza de C-PC; lo anterior confirma el gran impacto que posee la selección correcta del tipo de iluminación y sus factores secundarios (intensidad y ciclo de luz:oscuridad) que son críticos para la saturación lumínica de moléculas fotosensibles necesarias para la fotosíntesis en cianobacterias.

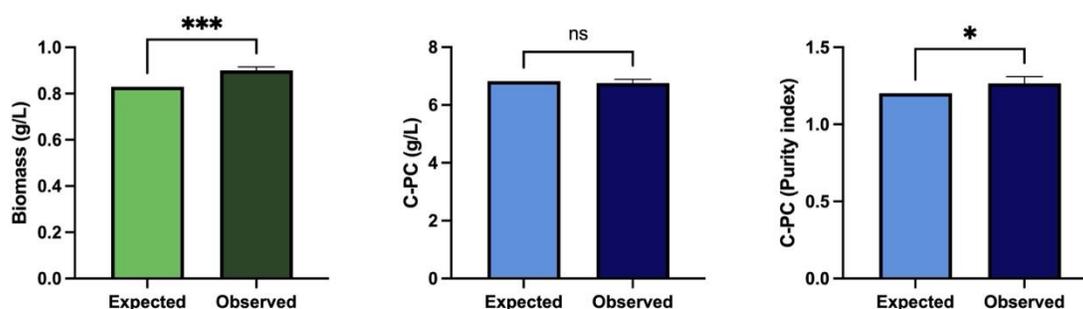


Figura 11. Superficie de respuesta en función del índice de pureza de C-PC

### 7.3. Determinación de parámetros cinéticos de cultivo

El análisis de la interacción entre el consumo de dos iones críticos ( $\text{NO}_3$  y  $\text{PO}_4$ ) en la producción de biomasa y síntesis de C-PC en *Potamosiphon* sp. Estos parámetros fueron evaluados siguiendo los protocolos establecidos previamente para cuantificar la biomasa, el pigmento y los iones, respectivamente durante 30 días de cultivo. De acuerdo con los resultados, el crecimiento muestra distintas fases, comenzando con una fase de latencia durante los primeros 5 días. Esta fase inicial representa el periodo de adaptación de los organismos al medio de cultivo ajustándose a las condiciones ambientales. La duración de la fase de latencia puede variar dependiendo de la cepa específica de cianobacterias, así como de las condiciones ambientales en las que se cultivan (Giannuzzi, 2019).

Las fases exponencial y estacionaria son las dos últimas fases del crecimiento de las cianobacterias. Durante la fase exponencial, los organismos crecen y se dividen activamente a su velocidad máxima, representada por el parámetro  $\mu_{\text{max}}$  esta variable indica la capacidad máxima de reproducción de los microorganismos en un entorno particular (Pedreira et al., 2022). Esta fase se caracteriza por un rápido aumento en el tamaño de la población y una alta tasa de asimilación de sustrato, representada por el parámetro U. Controlar y ajustar la tasa de  $\mu$  permite mantener un equilibrio óptimo en la disponibilidad de nutrientes, evitando tanto la escasez como el exceso, y asegurando un crecimiento saludable y sostenible (Zavřel et al., 2019). Durante esta fase, también se establece la concentración óptima de sustrato para el crecimiento, representada por el parámetro KS (Johnson & Goody, 2011). Dicha variable permite prevenir la saturación o la limitación de nutrientes, optimizando así las condiciones para un crecimiento continuo y eficiente. Finalmente, durante la fase estacionaria la tasa de crecimiento se ralentiza y finalmente se detiene a medida que las bacterias alcanzan su capacidad de carga y se quedan sin recursos disponibles (Baracho & Lombardi, 2023; Pedreira et al., 2022). Comprender las características de las fases exponencial y estacionaria es esencial para predecir y controlar el crecimiento de cianobacterias, ya que puede afectar el rendimiento general y la calidad del producto final.

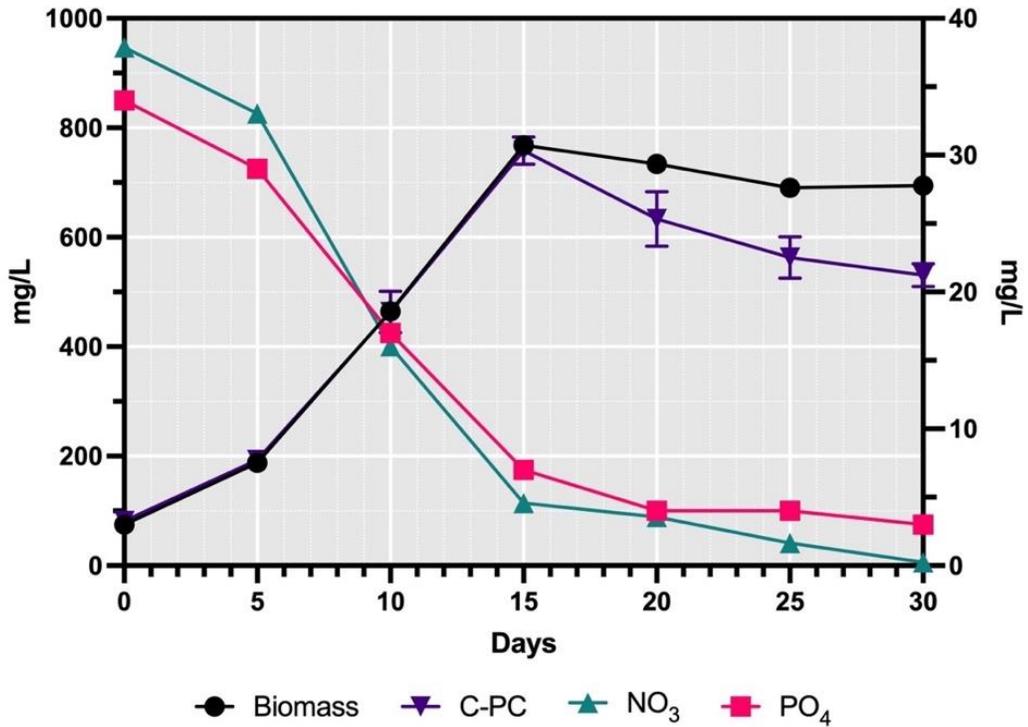
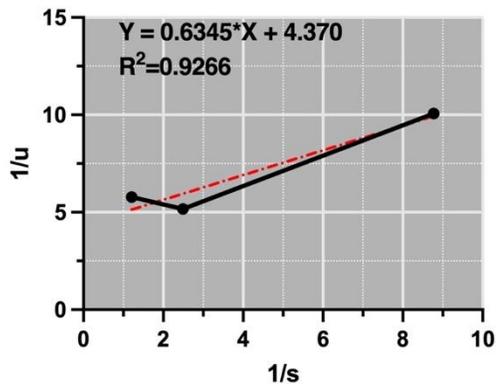
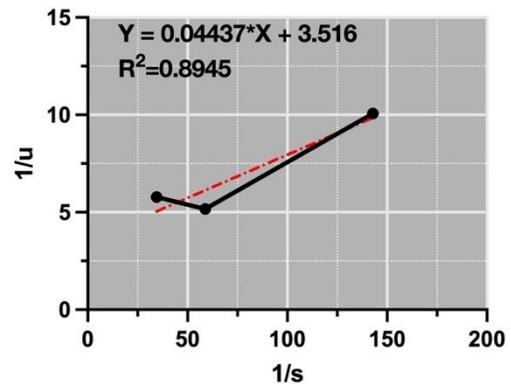


Figura 12. Evolución de Biomasa y pigmentos en función de la Concentración de Sustratos en el Tiempo

Para el cálculo de las constantes cinéticas se empleó la linealización de la ecuación de Monod de acuerdo con la ecuación 6, lo cual permitió obtener las constantes  $K_s$ , y  $\mu_{max}$ . La Figura 14(a, y b) ilustra la aplicación de la linealización de la ecuación de Monod, donde la inversa del sustrato se representa en función de la inversa de la tasa de crecimiento.



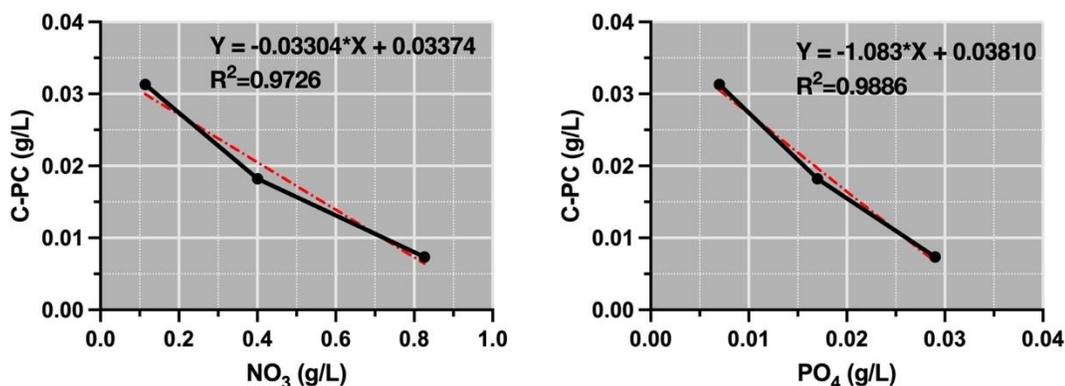
a.



b.

Figura 13. Gráfico de Linealización y Ecuación de Regresión Lineal de Monod  $\text{NO}_3$  (a) y  $\text{PO}_4$  (b)

Se calcularon las constantes del rendimiento del producto por sustrato ( $Y_{p/s}$ ), una métrica clave en bioprocesos que refleja la eficiencia con la cual un microorganismo o célula transforma un sustrato en un producto deseado. A medida que el valor de  $Y_{p/s}$  aumenta, la eficiencia del proceso de producción también incrementa, indicando una mayor producción de producto por cada unidad de sustrato consumido. Esta métrica es esencial para evaluar la economía y eficiencia del proceso, ya que un  $Y_{p/s}$  más alto implica una utilización más eficiente del sustrato, lo que puede traducirse en costos operativos más bajos. La Figura 15a y 15b muestra la tasa de conversión de cada sustrato limitante utilizado, destacando que Fosfatos alcanza la tasa de conversión más alta (1,083) en comparación con Nitratos (0,033). Es relevante señalar que, aunque la tasa de conversión es superior para Fosfatos, la proporción de nitratos en el medio de cultivo BG11 es 27 a 1 en comparación con los fosfatos y es importante reconocer que esta eficiencia no solo se debe a las características intrínsecas del sustrato, sino también a la relación específica de disponibilidad en el medio de cultivo BG11



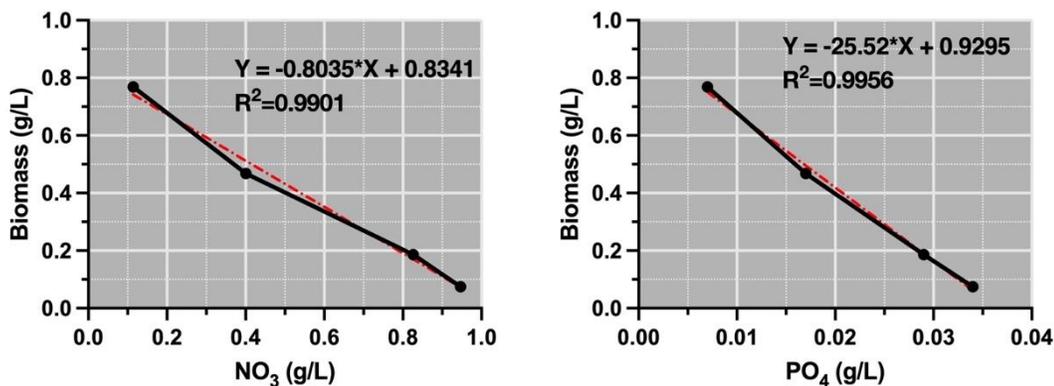
a.

b.

Figura 14. Gráfico de Rendimiento del Producto por Sustrato  $\text{NO}_3$  (a) y  $\text{PO}_4$  (b)

De acuerdo con la figura 16a y 16b se puede observar que los valores de  $Y_{x/s}$  (rendimiento de biomasa por sustrato) presentan un comportamiento contrario a los  $Y_{p/s}$  (rendimiento de producto por sustrato) para nitratos y fosfatos. Mientras que en el caso de  $Y_{p/s}$  los fosfatos presentaron una tasa de conversión más elevada que los nitratos, en  $Y_{x/s}$  los resultados fueron completamente opuestos, registrando valores de 0,7849 y 0,039 para nitratos y fosfatos, respectivamente. Esta inversión en la relación de rendimientos podría atribuirse a la interacción de diversos factores, incluyendo la demanda diferencial de energía y recursos

por parte del microorganismo para la síntesis de biomasa y la producción de productos específicos. En el caso de los nitratos, la abundancia relativa puede haber dirigido una mayor proporción de recursos hacia la formación de biomasa, resultando en un  $Y_{x/s}$  superior para nitratos. Esto es en concordancia con varios estudios que han demostrado la importancia del nitrógeno en la producción de biomasa en microalgas. Por ejemplo, en un estudio realizado por Suárez-Quintana et al. (2021), se encontró que el nitrógeno desempeña un papel crucial en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, componentes fundamentales para el crecimiento celular. Además, el nitrógeno es un componente esencial de la clorofila, la molécula responsable de la captura de energía luminosa en el proceso de fotosíntesis, lo que subraya aún más su importancia en la producción de biomasa en microalgas. Asimismo, otro estudio realizado por Barajas-Solano et al. (2022) encontró que el nitrógeno es esencial para la síntesis de proteínas y aminoácidos, que son fundamentales para el crecimiento y desarrollo celular en microalgas. La menor disponibilidad de fosfatos pudo haber limitado la síntesis de biomasa, pero favoreció una mayor tasa de conversión a productos, dando lugar a un  $Y_{p/s}$  más elevado para fosfatos. Este fenómeno se debe a que la concentración de fosfato de potasio ( $K_2HPO_4$ ) puede afectar la producción de ficocianinas en cianobacterias. Se ha encontrado que una concentración óptima de fosfato de potasio puede promover la síntesis de ficocianinas en ciertas cepas de cianobacterias; Además, la interacción del fosfato de potasio con otros componentes del medio de cultivo, como el nitrato de sodio ( $NaNO_3$ ) y los metales traza, también puede influir en la producción de ficocianinas (Zuorro et al., 2021).



a. b.  
 Figura 15. Gráfico de Rendimiento de biomasa por Sustrato  $NO_3$  (a) y  $PO_4$  (b)

De acuerdo con las ecuaciones obtenidas a partir de las diferentes regresiones lineales se establecieron las constantes cinéticas necesarias que permitan maximizar dos de las tres variables de respuestas estudiadas (Biomasa y ficocianinas); lo anterior se presenta en la tabla 22. Estas constantes serán probadas para la determinación del modelo predictivo de flujo de nutrientes dentro del proceso de producción de biomasa y ficocianinas a partir de *Potamosiphon* sp. Los valores destacan diferencias significativas entre ambos sustratos. La velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ) es mayor para fosfatos (0,284) que para nitratos (0,229), indicando una mayor capacidad de crecimiento en estas condiciones específicas. Asimismo, la constante de saturación de sustrato ( $K_s$ ) muestra una necesidad menor de fosfatos (0,013) en comparación con nitratos (0,145) para alcanzar la mitad de la velocidad máxima de crecimiento. El rendimiento de biomasa por sustrato ( $Y_{x/s}$ ) es considerablemente mayor para nitratos (0,805) que para fosfatos (0,039), señalando una mayor eficiencia en la conversión de nitratos en biomasa. En cuanto al rendimiento de producto por sustrato ( $Y_{p/s}$ ), la diferencia es notable, con un valor de 0,033 para nitratos y 1,083 para fosfatos, indicando una proporción sustancialmente mayor de producto generado en relación con la cantidad de fosfato consumido.

Tabla 18. Constantes cinéticas en función de sustratos

Constante	Variable	NO <sub>3</sub>	PO <sub>4</sub>
$\mu_{\max}$	Velocidad máxima de crecimiento	0,229	0,284
$K_s$	Constante de saturación de sustrato	0,145	0,013
$Y_{x/s}$	Rendimiento de biomasa por sustrato	0,805	0,039
$Y_{p/s}$	Rendimiento de producto por sustrato	0,033	1,083

## 7.4. Establecimiento del modelo matemático Batch y Fed-Batch.

### 7.4.1. Modelado Batch

El diseño y desarrollo de un modelo matemático del comportamiento de *Potamosiphon* sp Permite entender y maximizar el crecimiento tanto de la biomasa y la producción de ficocianinas en reactores con sustrato limitante. Este tipo de modelado proporciona una representación cuantitativa de las complejas interacciones biológicas entre la biomasa, el sustrato y el producto a lo largo del tiempo, permitiendo una comprensión más profunda de los fenómenos involucrados. Para el desarrollo del modelo planteado de reactores de lotes alimentados donde las condiciones experimentales varían durante los ciclos de alimentación, se desarrolló un modelo que primero permito validar el potencial que tiene para predecir las dinámicas cambiantes que suceden dentro de un proceso por lotes. Para lograr lo anterior se consideraron cuatro ecuaciones diferenciales que describen las tasas de crecimiento de la biomasa y la síntesis de ficocianinas en función del sustrato, así mismo se integraron los datos experimentales en la calibración del modelo lo cual fue esencial para garantizar su validez y precisión en la predicción de los resultados.

#### *7.4.1.1. Cinética y balances de masas en el modelo de lotes*

El desarrollo se basó en 4 ecuaciones las cuales se encuentran dependientes cada una de las variables propias desarrolladas por el mismo modelo. Dentro de las ecuaciones encontramos:

#### *7.4.1.2. Ecuación de producción de Biomasa*

Indica que la tasa de cambio de biomasa está influenciada por la concentración de biomasa y la velocidad específica de crecimiento. Sin embargo, es crucial destacar que también se incorpora un término de corrección que representa la pérdida de biomasa, ya sea por muerte celular u otros factores adversos. Por lo tanto, la tasa neta de cambio de biomasa no solo se relaciona de manera directa con la concentración de biomasa y la velocidad de crecimiento, sino que también tiene en cuenta los efectos negativos de la pérdida celular. A continuación, presentamos la ecuación de que permitirá medir la evolución de la biomasa en el tiempo y dependiendo del sustrato (Ec. 8). Las variables implicadas son:

- RX es la tasa de cambio de biomasa con respeto al tiempo.

- $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento de las cianobacterias.
- X es la concentración de biomasa.
- L es el factor de corrección por muerte celular

$$RX = (\mu * X) - L \quad \text{Ec.10}$$

#### 7.4.1.3. Ecuación de Monod

La ecuación de Monod, representada por la Ec. 5 antes descrita es fundamental para comprender cómo la velocidad específica de crecimiento varía en función de la concentración de sustrato. Dicha ecuación permite evidenciar cuando la concentración de sustrato se acerca a la constante de saturación, la velocidad de crecimiento tiende a aproximarse a la velocidad máxima de crecimiento específico. Este comportamiento indica que el crecimiento del organismo en cuestión está limitado por la disponibilidad de sustrato.

#### 7.4.1.4. Ecuación de consumo Sustrato

La Ecuación de Tasa de Sustrato, representada por Ec. 11 es esencial para comprender la dinámica entre la tasa de cambio de sustrato y la tasa de cambio de biomasa. Este fenómeno refleja la interacción entre el crecimiento de la biomasa y la disponibilidad de sustrato. Conforme la biomasa se desarrolla, consume el sustrato disponible, lo que se traduce en una disminución de la tasa de cambio de sustrato. Las variables implicadas son:

- RS representa la tasa de cambio de sustrato con respecto al tiempo.
- RX es la tasa de cambio de biomasa con respecto al tiempo.
- Y denota el rendimiento de biomasa con respecto al sustrato.

$$RS = -(RX/Y) \quad \text{Ec.11}$$

#### 7.4.1.5. Ecuación de producción C-PC

La Ecuación de Tasa de Producción de Producto, representada por la Ec. 12, Esta ecuación revela cómo la producción de producto está intrínsecamente vinculada a la velocidad específica de crecimiento y a la concentración de biomasa. A medida que la biomasa aumenta, la producción de producto también experimenta un aumento, y este fenómeno se

ve influenciado por la constante de producción de producto. En esta ecuación las variables involucradas son:

- RP representa la tasa de cambio de producto con respecto al tiempo.
- K1 es la constante de producción de producto.
- U denota la velocidad específica de crecimiento.
- X es la concentración de biomasa.

$$RP = (K1 * \mu) * X$$

Ec.12

Como resultado de las evaluaciones previas, se ha obtenido el siguiente gráfico que ilustra el comportamiento proyectado por el modelo numérico para diversas variables dependientes, tales como producto, sustrato y biomasa. En el mismo, se destacan tanto los valores esperados como los reales, evidenciando un comportamiento caracterizado por tres velocidades distintas tanto en términos de consumo como de producción (biomasa y producto (Wood et al., 2015).

La primera fase (adaptación) se presenta en el intervalo comprendido entre el día 5 y el día 10. En este período, se observa una pendiente menos pronunciada en los valores reales frente a los esperados. La biomasa presenta tasas de cambio de 0,022 y 0,019 g/L\*d<sup>-1</sup>, el sustrato exhibe 0,024 y 0,023 g/L\*d<sup>-1</sup>, mientras que la producción de C-PC registra 8,6 \* 10<sup>-4</sup> y 8,9 \* 10<sup>-4</sup> g/L\*d<sup>-1</sup>, respectivamente. Los resultados obtenidos en este estudio son consistentes con los resultados reportados por Rodrigues, M.S., et al. (2010) , en el cual reportan la influencia de fuentes de nitrógeno en la cultivación de *A. platensis*, se observó un comportamiento similar en términos de adaptación a las condiciones del entorno. La segunda etapa correspondiente al crecimiento exponencial se manifiesta posteriormente a la adaptación. En este punto, se experimenta un cambio significativo en la razón de cambio, con velocidades aumentadas para la biomasa (0,0583 y 0,066 g/L\*d<sup>-1</sup>), el sustrato (0,0712 y 0,0825 g/L\*d<sup>-1</sup>) y la producción de C-PC (0,002 y 0,0025 g/L\*d<sup>-1</sup>) en los valores reales frente a los esperados. Esta fase representa el período de máxima actividad metabólica y crecimiento acelerado, propio de un desarrollo biológico saludable. (Ortez et al., 2022) Estos resultados son consistentes con investigaciones similares realizadas en cianobacterias y microalgas. Por ejemplo, en un estudio realizado por Alonso-Santos et al. (2021) encontraron resultados similares en varias especies de cianobacterias en

iluminación continua y diferentes fuentes de carbono, donde también se observó un comportamiento de crecimiento acelerado después de una fase inicial de adaptación. Finalmente, la tercera etapa marca la desaceleración y eventual declive del organismo. Todas las pendientes muestran una constante de decrecimiento, indicando una fase de muerte y desaceleración. La biomasa presenta tasas de  $-0,0052$  y  $-0,008$   $\text{g/L}\cdot\text{d}^{-1}$ , el sustrato exhibe  $-0,00074$  y  $-2\times 10^{-18}$   $\text{g/L}\cdot\text{d}^{-1}$ , y la producción de C-PC registra  $-0,0007$  y  $-0,0004$   $\text{g/L}\cdot\text{d}^{-1}$  en los valores reales frente a los esperados, respectivamente. Estos indicadores reflejan el fin natural del ciclo de vida biológico, caracterizado por un descenso gradual en la actividad y la producción (Rodrigues et al., 2010).

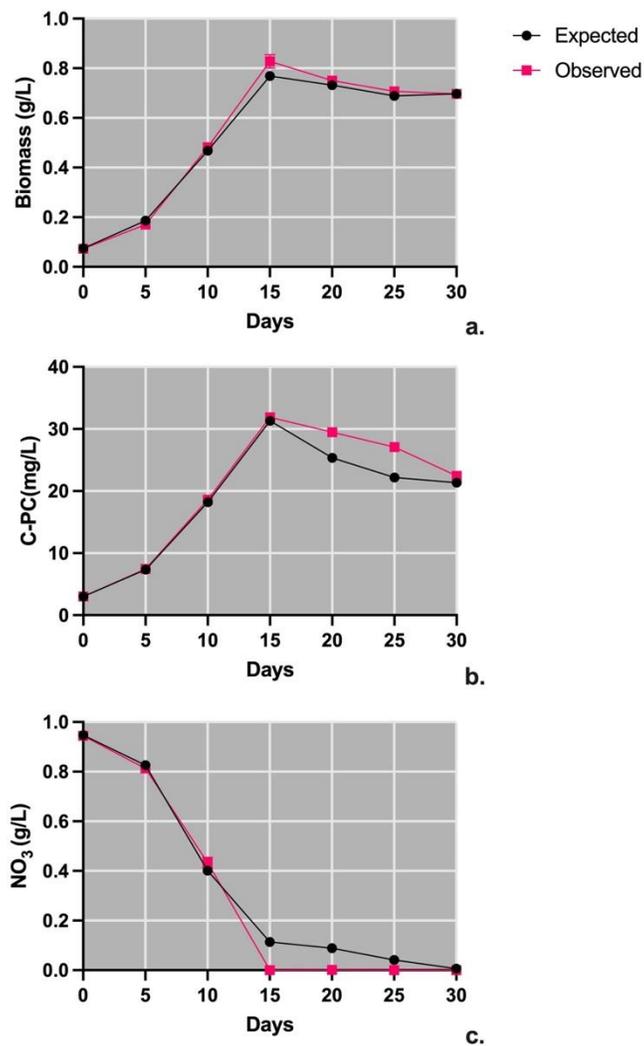


Figura 13. Modelado vs Experimental Proceso Batch

### 7.4.2. Modelado Fed-Batch

En el desarrollo del modelado comprender el balance de masa en un reactor biológico es crucial a la hora de analizar la transformación de biomasa, sustrato y producto a lo largo del tiempo. Cuando se trabaja en un sistema por lotes alimentado (lote FED), es fundamental considerar la dinámica temporal del proceso. Los ciclos de alimentación en los reactores de lotes introducen cambios sustanciales en las condiciones ambientales, lo que implica la necesidad de modelos dinámicos que puedan adaptarse a estas variaciones (Gayen & Venkatesh, 2007). Así mismo, es imprescindible tener en cuenta el factor del volumen, dado que al agregar una fuente externa de nutrientes la cual va diluida en un fluido afectara la concentración final de los productos que aquí se generen (Kim et al., 2018). En este sentido la implementación de algoritmos numéricos eficientes, como métodos de Runge-Kutta o algoritmos de diferencias finitas, facilita la simulación precisa de la evolución temporal de estos organismos (Arias et al., 2019). Además, la validación del modelo mediante comparaciones con datos experimentales reales es esenciales para evaluar su capacidad predictiva y ajustar los parámetros en consecuencia.

#### *7.4.2.1. Balances de masas en el modelo de lotes alimentado*

El modelo de lotes alimentado representa una estrategia esencial en el análisis de balances de masa en la ingeniería de procesos. En este enfoque se aborda el sistema considerando la entrada de Nutrientes de manera periódica en lotes discretos (Gong, 2010) . Este método ofrece una perspectiva detallada para comprender cómo la variabilidad en la alimentación de lotes influye en la distribución y transformación de los materiales a lo largo del proceso. Este enfoque no solo permite una mayor precisión en la gestión de recursos, sino que también facilita la identificación de posibles cuellos de botella o áreas de mejora en la eficiencia del sistema (Pavlov & Vassilev, 2012).

#### *7.4.2.2. Ecuación de producción de biomasa:*

El balance de masa total se formula considerando la tasa de cambio del volumen respecto al tiempo en función de la tasa de entrada de flujo (Maintinguer et al., 2013). Es fundamental entender que este enfoque se basa en la conservación de la masa, donde la variación en

el volumen del reactor está directamente vinculada a la cantidad de materia que entra en el sistema. (Ec. 13)

$$\frac{dv}{dt} = F \quad \text{Ec.13}$$

#### 7.4.2.3. Ecuación de producción de biomasa:

El balance de masas, en términos generales, se refiere a la conservación de la cantidad de material dentro de un sistema. En el caso de los reactores biológicos, este principio se aplica a la biomasa, una medida crítica que representa la cantidad de material biológico presente (Xie et al., 2015). La ecuación clave que determina el balance de biomasa en reactores biológicos se expresa de acuerdo a la Ec 14. La ecuación revela que el cambio en el volumen del reactor está directamente influenciado por la tasa de entrada de flujo. Cuando hay una entrada de flujo al sistema, el volumen experimenta un aumento proporcional a esta tasa de entrada.

Donde:

- Concentración de Biomasa (X): Representa la cantidad de material biológico presente en el reactor en un momento dado.
- Volumen del Reactor (V): Indica el espacio ocupado por el reactor biológico.)
- Tasa de Crecimiento de Biomasa (RX): Esta variable refleja la velocidad a la que la biomasa se incrementa en el sistema biológico.
- Tasa de corrección (L): la variable representa una tasa de corrección que se fundamenta en las células muertas dentro del proceso.
- 

$$\frac{d(Vx)}{dt} = RX * V - L \quad \text{Ec.14}$$

#### 7.4.2.4. Ecuación de consumo de sustrato:

Un balance de sustrato preciso es esencial para optimizar la eficiencia de los procesos biológicos. Permite ajustar las condiciones operativas, como el flujo de alimentación o el

tiempo de retención hidráulica, para lograr concentraciones de sustrato deseadas. Este enfoque se basa en el principio de conservación de la masa, donde la entrada y salida de sustancias deben equilibrarse con los cambios internos en el sistema. Esta ecuación modela el equilibrio dinámico entre la entrada y salida de sustrato en un reactor biológico (Ec 15). La tasa de cambio de la concentración de sustrato es influenciada por dos fuerzas principales: la aportación de sustrato a través del flujo de alimentación y la tasa de consumo proporcional al volumen del reactor. Dicho balance tiene condiciones específicas, como, por ejemplo:

- Si  $F \cdot SF$  es mayor que  $RS \cdot V$ , la concentración de sustrato tiende a aumentar con el tiempo, indicando que la entrada supera al consumo.
- Si  $RS \cdot V$  supera a  $F \cdot SF$ , la concentración de sustrato disminuirá, ya que el consumo es más alto que la entrada.

$$\frac{d(S)}{dt} = F \cdot SF + RS * V \quad \text{Ec.15}$$

- Concentración de Sustrato (S): Es la cantidad de sustrato presente en el sistema en un momento dado.
- Flujo de Alimentación (F): Representa la velocidad a la que entra el sustrato en el sistema a través del flujo de alimentación.
- Concentración de Sustrato en el Flujo (SF): Indica la concentración del sustrato en el flujo de alimentación.
- Tasa de Consumo de Sustrato (RS): Define la velocidad a la que los microorganismos consumen el sustrato. Es un parámetro crítico que impacta la eficiencia del proceso biológico.
- Volumen del Reactor (V): Representa el volumen total del reactor biológico. La multiplicación de la tasa de consumo de sustrato por el volumen del reactor proporciona la contribución total de la tasa de consumo al cambio en la concentración de sustrato.

#### 7.4.2.5. Ecuación de producción de C-PC:

En el caso específico de productos químicos, el balance de masas se convierte en una herramienta esencial para modelar la producción y cambio de concentración de productos a lo largo del tiempo. Esta expresión matemática encapsula la esencia del proceso, donde la tasa de cambio de la concentración de productos es proporcional a la tasa de producción de productos multiplicada por el volumen del sistema.

$$\frac{d(VP)}{dt} = RP * V \quad \text{Ec.16}$$

- Concentración de Productos (VP): Representa la cantidad de productos químicos en el sistema por unidad de volumen
- Tasa de Producción de Productos (RP): Indica la velocidad a la que se generan los productos químicos en el sistema.
- Volumen del Sistema (V): Es el espacio físico ocupado por el sistema químico. La variación en este volumen influye directamente en la tasa de cambio de la concentración de productos.

#### 7.4.2.6. Tasa Nominal de Dilución

La tasa nominal de dilución es un parámetro fundamental en el proceso. Este está representando la proporción entre la tasa de alimentación y el volumen del biorreactor. Dicha ecuación refleja la velocidad a la cual el contenido del biorreactor se diluye debido a la adición de nuevos componentes. Si D es alto, la dilución es más rápida, lo que puede afectar la concentración de biomasa y productos. Por otro lado, una tasa baja de dilución puede permitir la acumulación de productos, pero también puede influir en la disponibilidad de nutrientes.

La ecuación se integra con el modelo cinético del proceso, donde las tasas de crecimiento de la biomasa, consumo de sustrato, y producción de producto están interrelacionadas (Ec. 17). Esta integración proporciona información valiosa sobre cómo ajustar la tasa de alimentación para optimizar la producción de productos deseados y controlar la dinámica del sistema.

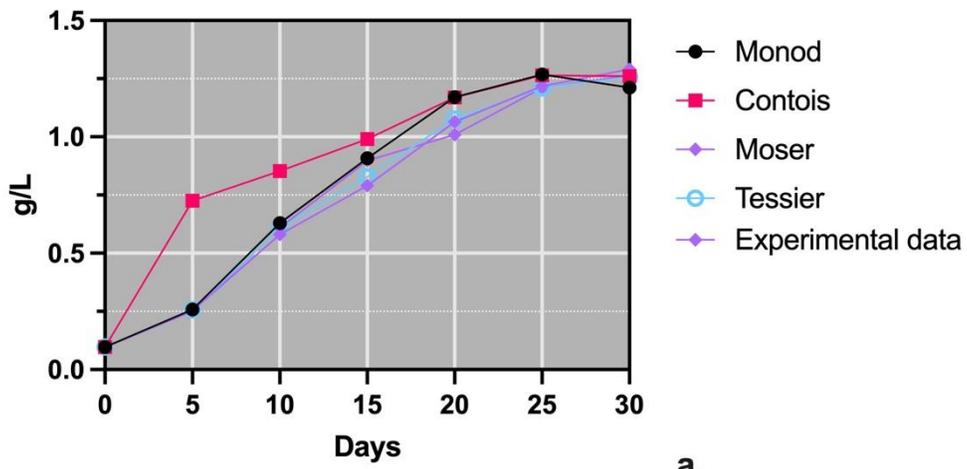
$$D = \frac{F}{V}$$

Ec.17

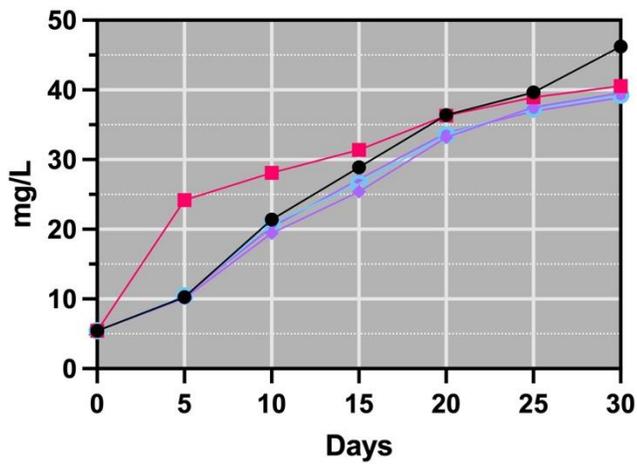
- Tasa Nominal de Dilución (D): Representa la tasa nominal de dilución en un biorreactor, es decir, la velocidad a la cual el contenido del biorreactor se diluye debido a la adición de nuevos sustratos y nutrientes.
- Tasa de Alimentación (F): Representa la tasa de alimentación de sustratos y nutrientes al biorreactor en el proceso biotecnológico.
- Volumen del Biorreactor (V): Es el volumen del biorreactor, que es la cantidad total de fluido o medio de cultivo presente en el sistema.

Las cinéticas se siguieron manteniendo las mismas formulas utilizadas para el proceso de lotes los cuales comprenden las ecuaciones 10-12.

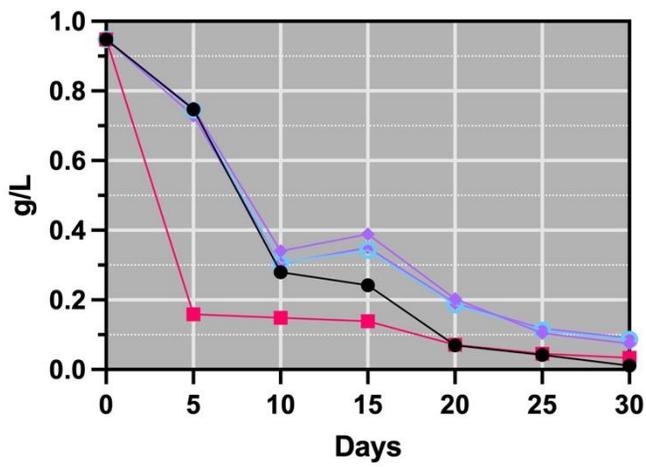
La representación gráfica del comportamiento de la biomasa en función del tiempo proporciona visualmente sobre la adecuación de los modelos matemáticos (Monod, 1949; Contois, 1959; Moser, 1958; Tessier, 1953) en comparación con los datos experimentales tanto de Biomasa, sustrato y producto (Y. Wang & Witarsa, 2016). En el análisis de los modelos en relación con la biomasa, se puede observar la eficacia del Modelo Tessier en prever con precisión el crecimiento (figura 14a). Mientras que el Modelo Monod, el Modelo Contois, Moser presentan desviaciones notables a medida que avanza el tiempo (Tabla 23). La formulación matemática más integral de Tessier, que incorpora la competencia y la limitación de sustrato, demuestra una adaptación más ajustada a la complejidad del sistema biológico. En la evaluación del porcentaje de error para el factor de Biomasa, se destaca que el Modelo Tessier exhibe el valor más bajo. Este resultado sugiere una capacidad superior para prever con precisión el crecimiento de la biomasa en comparación con los demás modelos. Esto no solo contribuye a una representación gráfica más limitada del comportamiento experimental de la biomasa, sino que también resalta la capacidad única de Tessier para capturar las complejidades dinámicas presentes en el crecimiento de los organismos a lo largo del tiempo.



a.



b.



c.

Figura 16. Modelado vs Experimental de Proceso Fed-Batch en función de: (a) Biomasa; (b) C-PC, y Sustrato (c).

La visualización de los datos experimentales en comparación con las predicciones de los modelos es una herramienta útil para evaluar la eficacia de los modelos matemáticos en la predicción del crecimiento de la biomasa. Sin embargo, es importante considerar que la eficacia de un modelo puede variar según las condiciones específicas del sistema biológico estudiado. Por ejemplo, el Modelo Tessier se destaca por su capacidad para calcular con precisión el crecimiento de la biomasa, lo que sugiere una adaptación más ajustada a la complejidad del sistema biológico (Xie et al., 2015). Así mismo, La formulación matemática más integral es Tessier, la cual incorpora la competencia y la limitación de sustrato, proporcionando una representación más precisa de la dinámica del crecimiento de la biomasa. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la eficacia de un modelo puede variar según las condiciones específicas del sistema biológico estudiado, y es fundamental considerar la aplicabilidad y generalización de los resultados. En cuanto a la dinámica del sustrato, el Modelo Tessier ha demostrado una capacidad sobresaliente para modelar la variación en la concentración con precisión a lo largo del tiempo. Esta capacidad puede atribuirse a la formulación bien estructurada de Tessier, que permite una mejor comprensión de las interacciones dentro del sistema. Sin embargo, es importante considerar que la capacidad de modelar la variación en la concentración del sustrato puede depender de la disponibilidad de datos experimentales precisos y de la representatividad del modelo en diferentes contextos (Y. Wang & Witarsa, 2016); Además, la capacidad del Modelo Tessier para modelar la variación en la concentración de sustrato y C-PC con una precisión sobresaliente a lo largo del tiempo respalda su idoneidad para estos factores particulares. Estos resultados sugieren que el Modelo Tessier permite una mejor comprensión de las interacciones dentro del sistema y una representación más precisa de la variación en la concentración de sustrato y C-PC en comparación con otros modelos.

Por otro lado, cuando se aborda la dinámica del sustrato, el Modelo Tessier no solo se destaca por su capacidad para tasar los cambios, sino que también muestra la capacidad de modelar la variación en la concentración con una precisión sobresaliente a lo largo del tiempo (Figura 14b). La formulación bien estructurada de Tessier no solo permite una mejor comprensión de las interacciones dentro del sistema, sino que también se traduce directamente en un porcentaje de error significativamente inferior en comparación con otros modelos (Tabla 23). Al analizar el porcentaje de error en el factor de Sustrato, nuevamente,

el Modelo Tessier demuestra su superioridad con el valor más bajo. Este resultado sugiere que Tessier permite modelar la variación en la concentración de sustrato de manera más precisa. En contraste, el Modelo Contois presenta un porcentaje de error más alto lo que indica una mayor discrepancia en sus predicciones en comparación con los datos experimentales. Finalmente, en lo que respecta a la variación en C-PC, nuevamente, el Modelo Tessier se distingue al tener el porcentaje de error más bajo (Tabla 23). Así mismo, el Modelo Tessier sigue destacándose al demostrar el porcentaje de error más bajo. Este resultado respalda la capacidad del Modelo Tessier para representar de manera precisa la variación en C-PC en comparación con los otros modelos. Aunque los valores de porcentaje de error para los demás modelos son bajos en este caso, la consistencia de Tessier en presentar los errores más mínimos enfatiza su idoneidad para este factor particular.

Tabla 19. Porcentaje de error entre los datos experimentales y los cuatro modelos evaluados.

<b>Respuesta</b>	<b>Error (%)</b>			
	<b>Monod</b>	<b>Contois</b>	<b>Moser</b>	<b>Tessier</b>
Biomasa	0,005436	0,053785	0,002689	0,001614
C-PC	11,994873	46,885991	0,876727	0,175665
NO <sub>3</sub>	0,006509	0,069290	0,000645	0,000061

## **7.5. Simulación de planta de producción de ficocianina (C-PC) a partir de cultivos de *Potamosiphon* sp.**

Utilizando el software SuperPro Designer® software v8.0. (Intelligen, Inc., Scotch Plains, NJ, USA), se llevó a cabo el proceso de simulación, lo que permitió modelar tanto la producción de *Potamosiphon* sp como la producción de C-PC en función del sustrato. El proceso de modelación se dividió en dos etapas distintas: Upstream y Downstream.

### **7.5.1. Proceso upstream**

En la etapa de Upstream, se siguió el protocolo de escalado propuesto por García-Martínez et al. (2022). Este protocolo integral abarcó varios pasos, tales como la preparación del medio de cultivo, la adaptación, escalado y producción de biomasa en reactores. Mediante este proceso el sistema pudo alcanzar una capacidad final de 500 m<sup>3</sup> por lote. Para lograr un crecimiento óptimo, la fase de crecimiento tuvo lugar en un total de 4 reactores, compuestos por 3 fotobiorreactores tipo tubular y un biorreactor tipo raceway (Figura 15 y 16). Los tiempos de residencia en estos reactores se fijaron en 20 días siendo esto el tiempo en el que alcanza la tasa más alta de crecimiento con una concentración final de 1,25 g/L. Al operar estos reactores en paralelo, se asegura una producción constante de biomasa. Para iniciar el proceso de crecimiento, cada reactor fue inoculado con una concentración del 10% (v/v) de Cianobacterias, excepto los reactores finales los cuales recibieron un inóculo del 20% (v/v). en esta fase se implementa las cinéticas previamente establecidas en objetivos anteriores, donde son dependientes del sustrato limitante una vez culminado el periodo calculado de 20 días, alcanzando así una tasa máxima de duplicación de biomasa de 1.2.

### **7.5.2. Proceso downstream**

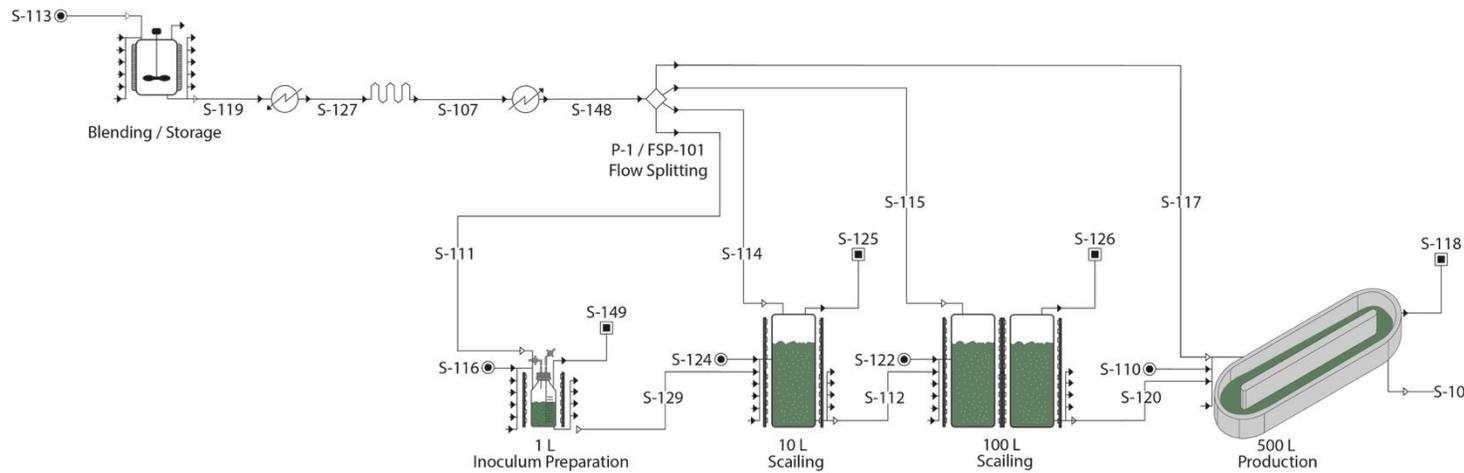
El proceso de Downstream se divide en tres etapas fundamentales. La primera etapa consiste en la extracción de las ficocianinas, siguiendo la metodología de investigación desarrollada por Barajas-Solano (2022). Después del proceso de producción de *Potamosiphon* sp., se lleva a cabo la cosecha del producto para obtener un concentrado. Este concentrado se somete a la destrucción celular mediante un reactor de perlas, considerando parámetros críticos como la relación biomasa/perlas del 14.9% (p/v) y la relación biomasa/tampón del 0.26% (p/v). Estos valores se determinaron como los más efectivos para la extracción de las proteínas de interés, como C-PC. En la siguiente etapa de purificación, se siguió el protocolo establecido por Brião et al. (2020). Después de la

extracción de C-PC, se lleva a cabo un proceso de ultrafiltración y diafiltración. La ultrafiltración se realiza bajo una presión de 150 kPa (1.5 bar) y a una temperatura de  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, el proceso de diafiltración se lleva a cabo en tres ciclos, utilizando una membrana de  $0,2\text{ }\mu\text{m}$ , lo cual permite la máxima recuperación de C-PC en el retentado y permeado, así como la separación eficiente de ambas moléculas, reduciendo las pérdidas hasta un 3% (Balti et al., 2021). Finalmente, para la etapa de secado y disposición final del producto se plantearon dos rutas importantes, la primera tenemos el secado por congelación, este permite preservar en hasta un 30 % más de C-PC en comparación a otros tipos de secados convencionales, dicho proceso se llevó a cabo durante 24 h a  $-80^{\circ}\text{C}$ . (Güroy et al., 2017). No obstante, En términos de economía, el secado por congelación puede resultar más costoso debido a su naturaleza. Es debido a esto que se establece una ruta donde se almacena directamente el producto en ampollas 100 mL/u para su comercialización.

### **7.5.3. Costo de la planta**

El éxito de cualquier instalación productiva se encuentra intrínsecamente ligado a sus costos de producción, comúnmente denominados como DFC (Costos Directos de Fabricación). Estos costos engloban todos los gastos necesarios para asegurar el funcionamiento eficiente y el cumplimiento de las pautas de procesamiento en cada sistema involucrado. Por consiguiente, el DFC desempeña un papel crucial en la evaluación de la viabilidad técnica y económica de todo el proceso. Dentro del ámbito de los DFC, se identifican tres componentes clave: los costos directos (TPDC), que engloban la adquisición, equipamiento y funcionalidad de la planta; los costos indirectos (TPIC), que abarcan variables relacionadas con la construcción; y finalmente, el FCPB, encargado de garantizar la seguridad y la calidad de los proyectos. La Tabla 24 detalla cada uno de los ítems mencionados, teniendo en cuenta cada proceso y las necesidades específicas de los equipos planteados en la simulación. Además, se evidencia que el costo aumenta entre productos, siendo el proceso de liofilizado el de mayor costo, debido al volumen que debe procesar al final del sistema de producción y a la demanda de energía y consumibles que requiere este equipo (Güroy et al., 2017).

UPSTREAM



DOWNSTREAM

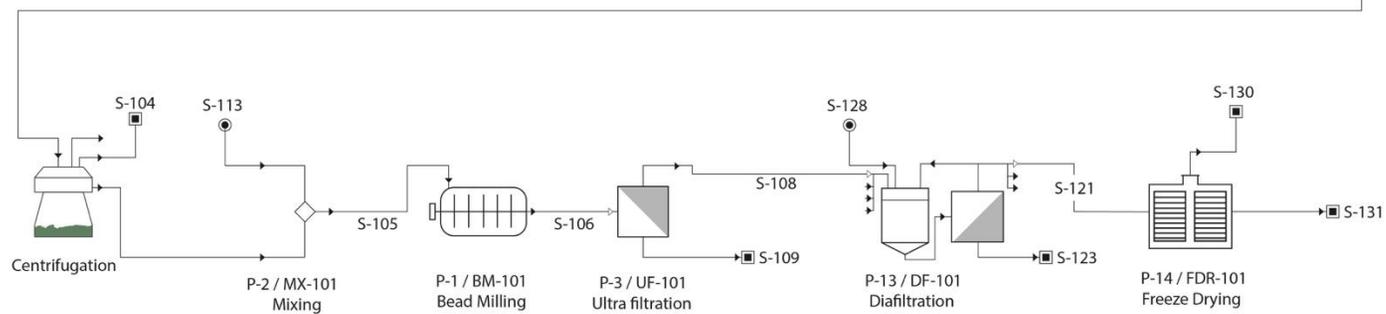
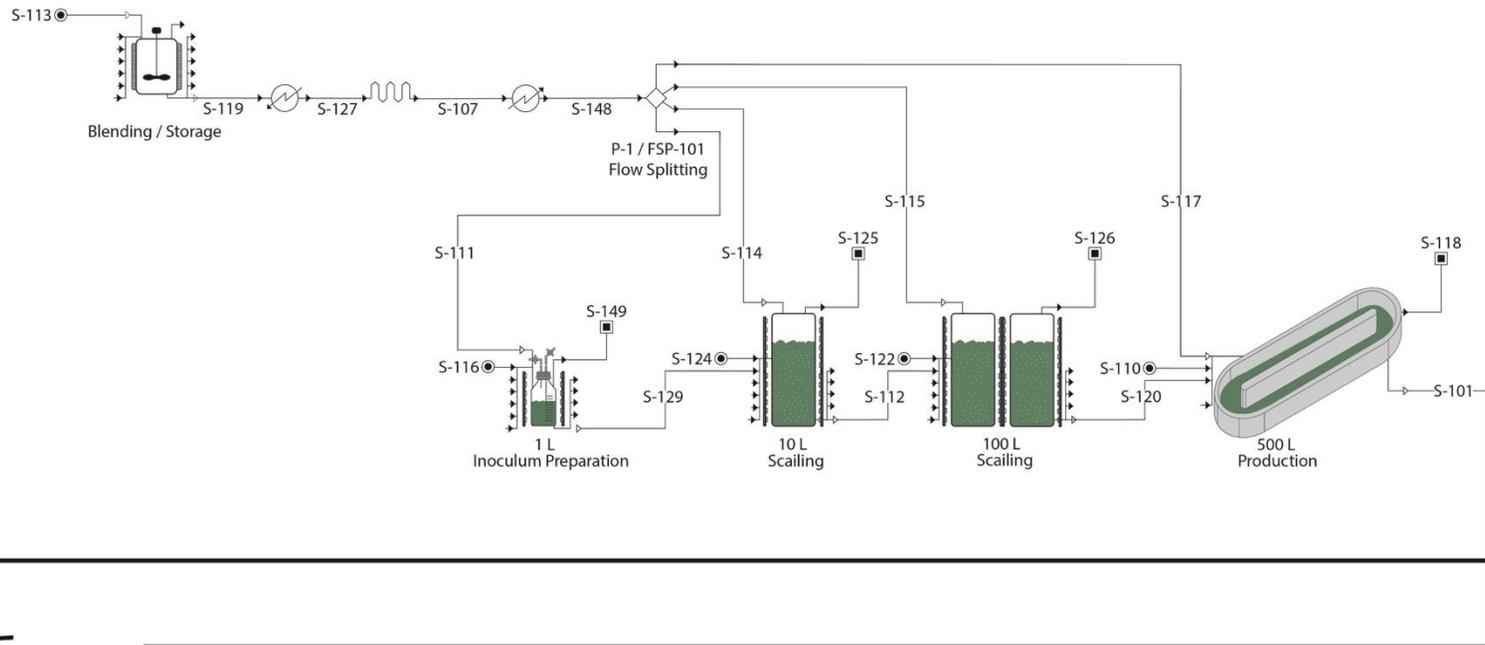


Figura 17. Diagrama de la simulación del proceso para la obtención de C-PC liofilizado en polvo.

UPSTREAM



DOWNSTREAM

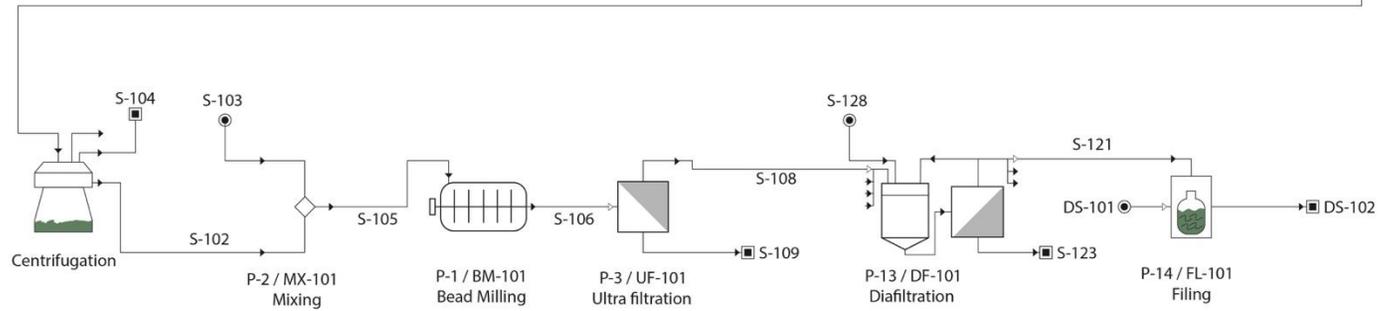


Figura 18. Diagrama de la simulación del proceso para la obtención de C-PC líquido.

Tabla 20. Estimación del capital fijo para dos escenarios de producción de C-PC utilizando Potamosiphon sp.

Estimación de capital fijo	Polvo liofilizado	Viales líquidos
<i>Coste directo total de la planta (tpdc) (coste físico)</i>	367,639	171,577
<i>Coste indirecto total de la planta (tpic)</i>	65,895	57,894
<i>Coste total de la planta (tpc = tpdc + tpic)</i>	433,534	229,471
<i>Honorarios e imprevistos del contratista (cfc)</i>	9,078	7,680
<i>Coste fijo directo del capital (cfd = tpc + cfc)</i>	442,612	237,151

Las simulaciones han demostrado ser un método muy eficaz para optimizar y modelar rutas específicas dentro de procesos industriales. Estas técnicas se basan en el cálculo del balance de masa para cada sección del sistema con el fin de predecir el comportamiento deseado del proceso (Petrides et al., 2014). Así mismo, es posible ver la influencia de la capacidad instalada de producción vs el costo de producto tiene una relación inversamente proporcional, esto se debe a que el tamaño del sistema juega un papel crucial a la hora de determinar la rentabilidad de los productos elaborados a partir de organismos fotosintéticos (Ruiz et al. 2016). La Figura 17 proporciona una descripción general del costo por Mg de producto procesado. Se evidencia como a medida que aumenta la capacidad instalada de producción disminuye los costos alcanzando valores de 0.26 USD/mg de C-PC de la línea de viales frente a 0.56 USD/mg del producto liofilizado, todo esto con un índice de pureza de 2.66 (Balti et al., 2021).

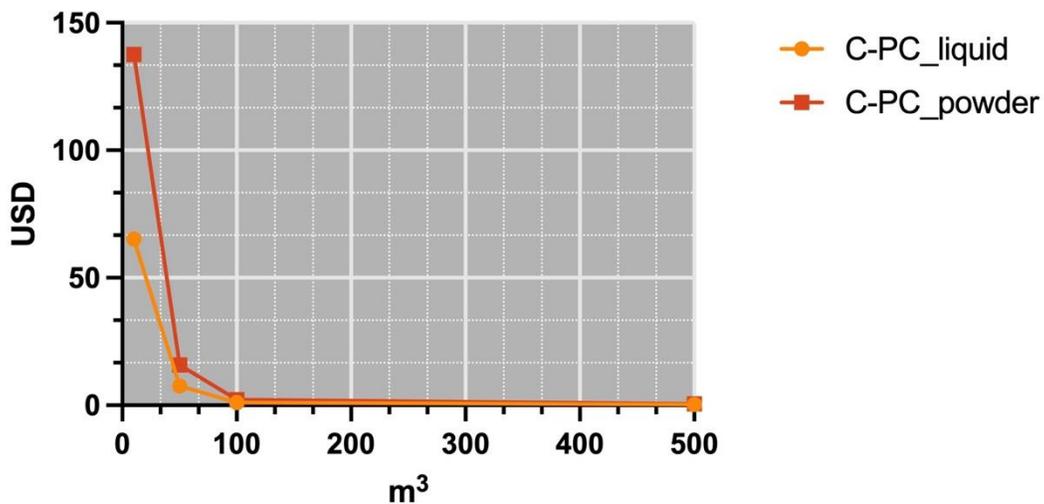


Figura 19. Evolución del valor de producción para las dos alternativas (líquido y liofilizado) en función del volumen del sistema de cultivo

## 8. Conclusiones

- Se Confirmando que la producción de biomasa, C-PC y la pureza de las proteínas fotosintéticas se ven directamente afectadas por los parámetros lumínicos, como la longitud de onda, el fotoperiodo y la intensidad lumínica. La combinación precisa de luz Roja Azul 3\_1, junto con una intensidad de  $283 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y un fotoperiodo de hasta 17.8 horas, resulta crucial para maximizar la producción, superando significativamente los rendimientos obtenidos con luz verde hasta en cuatro veces.
- Se evidenció que el fosfato ejerce una mayor influencia en la producción de C-PC, con una relación de 1,083 g/g, mientras que los nitratos tienen un mayor impacto en la biomasa, con un rendimiento de 0,805 g/g. Esta relación entre los nutrientes y la producción resalta la importancia de una adecuada gestión nutricional para obtener rendimientos óptimos.
- La creación de un modelo matemático representativo para la producción de biomasa y C-PC en función del sustrato limitante se reveló como una contribución esencial. Asimismo, la simulación de la planta de producción de C-PC permitió identificar costos mínimos en volúmenes más altos de producción, subrayando la relevancia de considerar el tamaño del sistema para garantizar la rentabilidad del proceso. Estas herramientas son cruciales para planificar estrategias de cultivo eficientes y optimizar los recursos utilizados en la producción de C-PC.

## 9. Recomendaciones.

- Los datos recopilados ofrecen un panorama prometedor para la obtención de ficocianinas de grado industrial a partir de *Potamosiphon* sp. Se sugiere explorar más a fondo el potencial de esta especie y sus condiciones de cultivo para optimizar la producción de ficocianinas y mejorar la viabilidad comercial del proceso.
- Además del costo de la planta, es fundamental realizar un análisis económico integral que considere no solo los costos de producción, sino también los precios de mercado, la demanda del producto, los costos de comercialización y distribución, entre otros factores. Esto proporcionará una visión más completa de la rentabilidad y viabilidad económica del proceso de producción de ficocianinas.
- Es importante tener en cuenta que el análisis de la simulación debe contextualizarse en el entorno específico donde se llevará a cabo la producción. Si bien se ha realizado un análisis en Cúcuta, es necesario adaptar estos resultados a otras ubicaciones geográficas para comprender mejor su aplicabilidad y hacer proyecciones más precisas en diferentes contextos regionales o internacionales.
- Además de considerar el costo actual en Cúcuta, se recomienda explorar otras regiones o mercados potenciales donde el producto pueda tener una mayor demanda o un precio más favorable. Esto puede implicar investigar las tendencias del mercado global, identificar nichos específicos o establecer asociaciones estratégicas para la comercialización del producto a nivel nacional e internacional.

## 10. Referencias

- Abeysiriwardana-Arachchige, I. S. & Nirmalakhandan, N. (2019). Predicting removal kinetics of biochemical oxygen demand (BOD) and nutrients in a pilot scale fed-batch algal wastewater treatment system. *Algal Research*, 43, 101643. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101643>
- Adir, N., Bar-Zvi, S., & Harris, D. (2020). The amazing phycobilisome. In *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* (Vol. 1861, Issue 4). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2019.07.002>
- Alonso-Santos, E., Trujillo-Tapia, M. N., Cervantes-Hernández, P., & Ramírez-Fuentes, E. (2021). Bioencapsulado de *Fischerella* Sp.: crecimiento, metabolismo y concentración del inóculo. *Tip revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 24. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2021.342>
- Alvarez, P. (2018). Influencia de la luz sobre la producción y la composición de la biomasa microalgal de *Spirulina platensis* LMPA55. <https://ria.utn.edu.ar/xmlui/handle/20.500.12272/3901>
- Andersen R.A., Berges J.A., Harrison P.J. Watanabe M.M., 2005, Appendix A— Recipes for Freshwater and Seawater Media In Andersen R.A.(Ed). *Algal Culturing Techniques* (pp 429-538). Burlington, MA: Elsevier Academic Press.
- Arias, D. M., Rueda, E., García-Galán, M. J., Uggetti, E., & García, J. M. B. (2019). Selection of cyanobacteria over green algae in a photo-sequencing batch bioreactor fed with wastewater. *Science of The Total Environment*, 653, 485-495. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.342>
- Assunção, J., Pagels, F., Tavares, T., Malcata, F. X., & Guedes, A. C. (2022). Light Modulation for Bioactive Pigment Production in *Synechocystis salina*. *Bioengineering*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/bioengineering9070331>
- Balti, R., Zayoud, N., Hubert, F., Beaulieu, L., & Massé, A. (2021). Fractionation of *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) water soluble proteins by membrane diafiltration. *Separation and Purification Technology*, 256, 117756. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117756>
- Barajas-Solano, A. F. (2022). Optimization of Phycobiliprotein Solubilization from a Thermotolerant *Oscillatoria* sp. *Processes*, 10(5).

- Barajas-Solano, A. F. (2022). Optimization of phycobiliprotein solubilization from a thermotolerant *oscillatoria* SP. *Processes*, 10(5), 836. <https://doi.org/10.3390/pr10050836>
- Bennett A., Bogorad, L., 1973, Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *J. Cell Biol.* 58, 419–435.
- Brião, V. B., Sbeghen, A. L., Colla, L. M., Castoldi, V., Seguenka, B., De Oliveira Schimidt, G., & Costa, J. A. V. (2020). Is downstream ultrafiltration enough for production of food-grade phycocyanin from *Arthrospira platensis*? *Journal of Applied Phycology*, 32(2), 1129-1140. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-02006-1>
- Brock, T.D. (1978). *Thermophilic microorganisms and life at high temperatures*. SpringerVerlag, Berlin.
- Carlozzi, P. & Touloupakis, E. (2021). Bioplastic production by feeding the marine *Rhodovulum sulfidophilum* DSM-1374 with four different carbon sources under batch, fed-batch and semi-continuous growth regimes. *New Biotechnology*, 62, 10-17. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.12.002>
- Castenholz, R.W. (1969). Thermophilic blue green algae and the thermal environment. *Bacteriol. Rev.* 33: 476504.
- Chen, C. Y., Kao, P. C., Tan, C. H., Show, P. L., Cheah, W. Y., Lee, W. L., Chang, J. S. (2016). Using an innovative pH-stat CO<sub>2</sub> feeding strategy to enhance cell growth and C-phycocyanin production from *Spirulina platensis*. *Biochemical Engineering Journal*, 112, 78–85.
- Dasgupta, C. N. (2015). Algae as a source of phycocyanin and other industrially important pigments. In *Algal Biorefinery: An Integrated Approach* (pp. 253-276). Springer, Cham.
- De Marsac, N. T., & Cohen-bazire, G. (1977). Molecular composition of cyanobacterial phycobilisomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(4), 1635 LP-1639.
- del Rio-Chanona, E. A., Zhang, D., Xie, Y., Manirafasha, E. & Jing, K. (2015). Dynamic Simulation and Optimization for *Arthrospira platensis* Growth and C-Phycocyanin Production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 54(43), 10606-10614. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.5b03102>
- Derner, R. B., Ohse, S., Villela, M., Matos De Carvalho, S., & Fett, R. (2006). *Microalgas, produtos e aplicações*. 36(6).

- Dobson, Z., Ahad, S., Vanlandingham, J., Toporik, H., Vaughn, N., Vaughn, M., Williams, D., Reppert, M., Fromme, P., & Mazor, Y. (2021). The structure of photosystem I from a high-light-tolerant cyanobacteria. <https://doi.org/10.7554/eLife>
- Eriksen, N. T. (2008). Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Applied microbiology and biotechnology*, 80(1), 1-14.
- Felipe, M. A. (2006). Obtención de biliproteínas de interés biotecnológico industrial mediante cromatografía de adsorción en lecho expandido. Dialnet. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5406779>
- Fernández-Juárez, V., Bennasar-Figueras, A., Sureda-Gomila, A., Ramis-Munar, G., & Agawin, N. S. R. (2020). Differential Effects of Varying Concentrations of Phosphorus, Iron, and Nitrogen in N<sub>2</sub>-Fixing Cyanobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 11.
- Fernández-Rojas, B., Hernández-Juárez, J., & Pedraza-Chaverri, J. (2014). Nutraceutical properties of phycocyanin. *Journal of Functional Foods*, 11(C), 375–392.
- Finore I, Lama L, Poli A, Donato P, and Nicolaus B. Biotechnology Implications of Extremophiles as Life Pioneers and Wellspring of Valuable Biomolecules. In V.C. Kalia (ed.), *Microbial Factories*, 2015.
- Fuenmayor, G., Jonte, L., Rosales-Loaiza, N., & Morales, E. (2009). Crecimiento de la cianobacteria marina *oscillatoria* SP. MOF-06 en relación al pH en cultivos discontinuos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29(1), 21-25. <http://www.redalyc.org/pdf/1994/199416353005.pdf>
- García-Martínez, J. B., Contreras-Roper, J. E., Urbina-Suarez, N. A., López-Barrera, G. L., Barajas-Solano, A. F., Kafarov, V., Barajas-Ferreira, C., Ibarra-Mojica, D. M., & Zuurro, A. (2022). A simulation analysis of a Microalgal-Production plant for the transformation of Inland-Fisheries wastewater in sustainable feed. *Water*, 14(2), 250. <https://doi.org/10.3390/w14020250>
- Gardini, A., Trivisano, C., & Fabrizi, E. (2021). Bayesian analysis of ANOVA and mixed models on the Log-Transformed Response Variable. *Psychometrika*, 86(2), 619-641. <https://doi.org/10.1007/s11336-021-09769-y>
- Gong, Z. (2010). A multistage system of microbial fed-batch fermentation and its parameter identification. *Mathematics and Computers in Simulation*, 80(9), 1903-1910. <https://doi.org/10.1016/j.matcom.2009.12.011>

- Hsieh-Lo, M., Castillo, G., Ochoa-Becerra, M. A. & Mojica, L. (2019). Phycocyanin and phycoerythrin: Strategies to improve production yield and chemical stability. *Algal Research*, 42, 101600. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101600>.
- İtler, I., Akyıl, S., Demirel, Z., Koç, M., Conk-Dalay, M., & Kaymak-Ertekin, F. (2018). Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using different techniques. *Journal of Food Composition and Analysis*, 70, 78–88.
- Junique, L., Watier, L., Lejeune, H., Viudes, F., Deblieck, M., & Watier, D. (2021). Determination by response surface methodology of optimal protein and phycocyanin productivity conditions in *Arthrospira (Spirulina) platensis* under different combinations of photoperiod variation and lighting intensity. *Bioresource Technology Reports*, 15, 100763. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100763>
- Kim, N.N., Shin, H. S., Park, H. G., Lee, J., Kil, G. S., & Choi, C. Y. (2014). Profiles of photosynthetic pigment accumulation and expression of photosynthesis-related genes in the marine cyanobacteria *Synechococcus* sp.: Effects of LED wavelengths. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 19(2), 250-256.
- Kim, O. D., Rocha, M., & Maia, P. (2018). A review of dynamic modeling approaches and their application in computational strain optimization for metabolic engineering. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01690>
- Kotoula, D., Iliopoulou, A., Irakleous-Palaiologou, E., Gatidou, G., Aloupi, M., Antonopoulou, P., Fountoulakis, M. S., & Stasinakis, A. S. (2020). Municipal wastewater treatment by combining in series microalgae *Chlorella sorokiniana* and macrophyte *Lemna minor*: Preliminary results. *Journal of Cleaner Production*, 271.
- Kumar, D., Dhar, D.W., Pabbi, S., Kumar, N., Walia, S., 2014. Extraction and purification of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* (CCC540). *Indian J. Plant Physiol.* 19, 184–188.
- Li, W., Su, H.-N., Pu, Y., Chen, J., Liu, L.-N., Liu, Q., & Qin, S. (2019). Phycobiliproteins: Molecular structure, production, applications, and prospects. *Biotechnology advances*, 37(2), 340-353.
- Liu, H., Zhang, M. M., Weisz, D. A., Cheng, M., Pakrasi, H. B. & Blankenship, R. E. (2021). Structure of cyanobacterial phycobilisome core revealed by structural modeling and chemical cross-linking. *Science Advances*, 7(2). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba5743>.
- Loreto, C., Rosales, N., Bermúdez, J. L., & Morales, E. (2003). PRODUCCION DE PIGMENTOS y PROTEINAS DE LA CIANOBACTERIA ANABAENA PCC 7120 EN

RELACION a LA CONCENTRACION DE NITROGENO e IRRADIANCIA. *Gayana Botanica*, 60(2). <https://doi.org/10.4067/s0717-66432003000200001>

- Ma, Y., Noreña-Caro, D. A., Adams, A. J., Brentzel, T. B., Romagnoli, J. A. & Benton, M. G. (2020). Machine-learning-based simulation and fed-batch control of cyanobacterial-phycoerythrin production in *Plectonema* by artificial neural network and deep reinforcement learning. *Computers & Chemical Engineering*, 142, 107016. <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2020.107016>
- Maintinguer, S. I., Sakamoto, I. K., Adorno, M. Â. T., & Varesche, M. B. A. (2013). Evaluation of the microbial diversity of denitrifying bacteria in batch reactor. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 30(3), 457-465. <https://doi.org/10.1590/s0104-66322013000300004>
- Manirafasha, E., Murwanashyaka, T., Ndikubwimana, T., Rashid Ahmed, N., Liu, J., Lu, Y., Zeng, X., Ling, X. & Jing, K. (2018). Enhancement of cell growth and phycoerythrin production in *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* by metabolic stress and nitrate fed-batch. *Bioresource Technology*, 255, 293-301. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.068>
- Manirafasha, E., Ndikubwimana, T., Zeng, X., Lu, Y., Jing, K., (2016). Phycobiliprotein: potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. *Biochem. Eng. J.* 109, 282–296.
- Maroneze, M.M.; Siqueira, S.F.; Vendruscolo, R.G.; Wagner, R.; de Menezes, C.R.; Zepka, L.Q.; Jacob-Lopes, E. The role of photoperiods on photobioreactors—A potential strategy to reduce costs. *Bioresource technology*. 2016; 219: 493-499.
- Martelli, G., Folli, C., Visai, L., Daglia, M., Ferrari, D., 2014. Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* for food industry applications. *Process Biochem.* 49, 154–159.
- Moheimani, N.R.; Borowitzka, M.A.; Isdepsky, A.; Sing, S.F. Standard methods for measuring growth of algae and their composition. In Borowitzka MA, Moheimani, NR (eds) *Algae for biofuels and energy*. Springer, Dordrecht. 2013, pp. 265–284.
- Moro I, Rascio N, La Rocca N, Sciuto K, Albertano P, Bruno L, Andreoli C. (2010). Polyphasic characterization of a thermotolerant filamentous cyanobacterium isolated from the Euganean thermal muds (Padua, Italy), *European Journal of Phycology*, 45:2, 143-154.
- Ortez, L., Rovira, M. D., & Alarcón, L. C. M. (2022). Distribución espacio-temporal de cianobacterias planctónicas y factores ambientales asociados a sus

proliferaciones en el embalse Cerrón Grande, El Salvador. *Revista De Biología Tropical*, 70(1). <https://doi.org/10.15517/rev.biol.trop..v70i1.47625>

- Ortiz-Moreno, M. L., Solarte-Murillo, L. V., & Sandoval-Parra, K. X. (2020). Analysis of *Nostoc muscorum* biomass production in a hydroponic system. *Orinoquia*, 24(1), 23-31. <https://doi.org/10.22579/20112629.599>
- Pagels, F., Guedes, A. C., Amaro, H. M., Kijjoa, A., & Vasconcelos, V. (2019). Phycobiliproteins from cyanobacteria: Chemistry and biotechnological applications. *Biotechnology advances*. IN PRESS.
- Patel, H. M., Rastogi, R. P., Trivedi, U., & Madamwar, D. (2018). Structural characterization and antioxidant potential of phycocyanin from the cyanobacterium *Geitlerinema* sp. H8DM. *Algal research*, 32, 372-383.
- Pavlov, Y., & Vassilev, P. (2012). Preferences and determination of the nominal growth rate of a Fed-Batch process: Control design of complex processes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 26(5), 3254-3259. <https://doi.org/10.5504/bbeq.2012.0064>
- Pelea, L. P. (2018). ¿Cómo proceder ante el incumplimiento de las premisas de los métodos paramétricos? o ¿cómo trabajar con variables biológicas no normales? - How do we proceed to violations of parametric methods assumptions? or how to work with non-normal biological variables? *Revista Del Jardín Botánico Nacional*, 39, 1–12. <https://www.jstor.org/stable/26600674>
- Perin, G.; Cimetta, E.; Monetti, F.; Morosinotto, T.; Bezzo, F. Novel microphotobioreactor design and monitoring method for assessing microalgae response to light intensity. *Algal research*. 2016; 19: 69-76.
- Prates, D. da F., Radmann, E. M., Duarte, J. H., Morais, M. G. de, & Costa, J. A. V. (2018). *Spirulina* cultivated under different light emitting diodes: Enhanced cell growth and phycocyanin production. *Bioresource Technology*, 256, 38–43.
- Puzorjov, A. & McCormick, A. J. (2020). Phycobiliproteins from extreme environments and their potential applications. *Journal of Experimental Botany*, 71(13), 3827-3842. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa139>
- Quintana, W. H. S., García-Rico, R. O., García-Martínez, J. B., Urbina-Suarez, N. A., López-Barrera, G. L., Barajas-Solano, A. F., & Zuurro, A. (2022). Enhancement of metabolite production in High-Altitude microalgal strains by optimized C/N/P ratio. *Applied sciences*, 12(13), 6779. <https://doi.org/10.3390/app12136779>

- Ren, L., Wang, P., Wang, C., Paerl, H. W., & Wang, H. (2020). Effects of phosphorus availability and phosphorus utilization behavior of *Microcystis aeruginosa* on its adaptation capability to ultraviolet radiation. *Environmental Pollution*, 256.
- Restrepo B, L. F., (2007). Tipos de suma de cuadrados en el análisis de la varianza. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 20(2),209-215.[fecha de Consulta 19 de Noviembre de 2023]. ISSN: 0120-0690. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=295023034013>
- Reysenbach A. L. and Cady S. L. 2001. Microbiology of ancient and modern hydrothermal systems. *Trends Microbiol.* 9:7986.
- Rizzo, R., Santos, B. D. N. C. D., Da Silva De Castro, G. F. P., Passos, T. S., De Abreu Nascimento, M., Guerra, H. D., Da Silva, C. G., Da Silva Dias, D., Domingues, J. R., & De Lima-Araújo, K. G. (2015c). Production of phycobiliproteins by *Arthrospira platensis* under different light conditions for application in food products. *Food Science and Technology*, 35(2), 247-252. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.6463>
- Rodrigues, M. R., Ferreira, L. S., Converti, A., Sato, S., & De Carvalho, J. C. M. (2010). Fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis*: potassium nitrate and ammonium chloride as simultaneous nitrogen sources. *Bioresource Technology*, 101(12), 4491-4498. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.054>
- Romero, L., Guevara, M., Gómez, B., Arredondo-Vega, B., Cortez, R., & Licet, B. (2017). Production of pigments from *Arthrospira maxima* cultivated in photobioreactors. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(1), 108-114.
- Rosales-Loaiza, N., Guevara, M., Lodeiros, C., & Morales, E. (2007). Crecimiento y producción de metabolitos de la cianobacteria marina *Synechococcus* sp. (Chroococcales) en función de la irradiancia. *Revista De Biología Tropical*. <https://doi.org/10.15517/rbt.v56i2.5596>
- Samsonoff, W. A., & MacColl, R. (2001). Biliproteins and phycobilisomes from cyanobacteria and red algae at the extremes of habitat. *Archives of microbiology*, 176(6), 400-405.
- Santos-Merino, M., Torrado, A., Davis, G. A., Röttig, A., Bibby, T. S., Kramer, D. M., & Ducat, D. C. (2021). Improved photosynthetic capacity and photosystem I oxidation via heterologous metabolism engineering in cyanobacteria. 118(11). <https://doi.org/10.1073/pnas.2021523118/-/DCSupplemental>
- Silos Vega, C. A. (2021). Efecto del medio de cultivo sobre el crecimiento y valor nutricional de *Arthrospira maxima*. REPOSITORIO NACIONAL CONACYT.

- Solimeno, A.; Acien, F. G.; García, J. Mechanistic model for design, analysis, operation and control of microalgae cultures: calibration and application to tubular photobioreactors. *Algal research*. 2017; 21: 236-246.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87–96.
- Wang, Y., & Witarsa, F. (2016). Application of Contois, Tessier, and first-order kinetics for modeling and simulation of a composting decomposition process. *Bioresource Technology*, 220, 384-393. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.099>
- Wood, J. L., Miller, C. D., Sims, R. C., & Takemoto, J. Y. (2015). Biomass and phycocyanin production from cyanobacteria dominated biofilm reactors cultured using oilfield and natural gas extraction produced water. *Algal Research*, 11, 165-168. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.06.015>
- Wu, H.L., Wang, G.H., Xiang, W.Z., Li, T., He, H., (2016). Stability and antioxidant activity of food grade phycocyanin isolated from *Spirulina platensis*. *Int. J. Food Prop.* 19, 10942912.
- Xie, Y., Jin, Y., Zeng, X., Chen, J., Lu, Y., & Jing, K. (2015). Fed-Batch strategy for enhancing cell growth and C-phycocyanin production of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* under phototrophic cultivation. *Bioresource Technology*, 180, 281-287. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.073>
- Yen, H. W.; Hu, I.; Chen, C.; Nagarajan, D.; Chang, J. Design of photobioreactors for algal cultivation. In *Biofuels from algae*, 2nd ed.; Elsevier; 2014, pp. 23-43.
- Zhang, Z., Cho, S., Dadmohammadi, Y., Li, Y. & Abbaspourrad, A. (2021). Improvement of the storage stability of C-phycocyanin in beverages by high-pressure processing. *Food Hydrocolloids*, 110, 106055. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106055>.
- Zittelli, G.; Biondi, N.; Rodolfi, L.; Tredici, M. Photobioreactors for mass production of microalgae. In *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology*, 2nd ed.; Eds. Richmond, A., Hu, Q., Publisher: Italy; 2013; Volume 2, pp. 225-266.