

	GESTIÓN DE SERVICIOS ACADÉMICOS Y BIBLIOTECARIOS	CÓDIGO	FO-GS-15
		VERSIÓN	02
	ESQUEMA HOJA DE RESUMEN	FECHA	03/04/2017
		PÁGINA	1 de 1
ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ	
Jefe División de Biblioteca	Equipo Operativo de Calidad	Líder de Calidad	

RESUMEN TRABAJO DE GRADO

AUTOR(ES): NOMBRES Y APELLIDOS COMPLETOS

NOMBRE(S): Martin APELLIDOS: Torres Rueda

NOMBRE(S): Jose David APELLIDOS: Carvajal Rivera

FACULTAD: CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

DIRECTOR:

NOMBRE(S): ANDRES FERNANDO APELLIDOS: BARAJAS SOLANO

TÍTULO DEL TRABAJO (TESIS): ANÁLISIS DE UN SISTEMA FED-BATCH PARA LA PRODUCCIÓN DE FICOERITRINA (PE) EN CIANOBACTERIAS TERMOTOLERANTES

Las cianobacterias son microorganismos procariotas capaces de realizar fotosíntesis oxigénica, por ello, son de gran importancia para el desarrollo de nuevas investigaciones en el campo biotecnológico. En este trabajo se realizó un análisis de la producción de ficoeritrina (PE) en *Potamosiphon sp* por medio de un sistema de operación Fed-batch. La cepa utilizada fue UFPS003, este género de cianobacteria fue recientemente aislada un termal de la región y ha sido poco estudiada para la producción de ficobiliproteínas. En primer lugar, se realizó un análisis cinético durante 25 días de cultivo en medio BG11 modificado, en el cual se obtuvo la tasa máxima de crecimiento celular (0.178 día⁻¹), coeficiente de afinidad (0.062 g*L⁻¹) y el rendimiento de la biomasa respecto al sustrato limitante (0.21). En segundo lugar, se diseñó el sistema Fed-batch que tuvo como factores de crecimiento la concentración de nitrógeno y el tiempo de cultivo. A nivel de resultados, se logró determinar que la producción de biomasa y PE fue mayor a los 20 días de cultivo en los dos sistemas de operación; siendo superior la concentración de biomasa en el Batch (0.45 g/L). Sin embargo, el sistema de operación Fed-batch mostró una importante mejoría en la pureza del extracto. En conclusión, se logró determinar la cinética de producción de biomasa y PE. Así mismo, se demostró que la adicción semicontinua de NO₃ no es la mejor opción para optimizar la producción de biomasa y PE en *Potamosiphon sp* UFPS003.

PALABRAS CLAVES: Ficoeritrina, Potamosiphon sp., Biomasa, Fed-Batch, Nitrato

CARACTERÍSTICAS

PAGINAS: 32 ILUSTRACIONES: 7

**ANÁLISIS DE UN SISTEMA FED-BATCH PARA LA PRODUCCIÓN DE
FICOERITRINA (PE) EN CIANOBACTERIAS TERMOTOLERANTES**

JOSE DAVID CARVAJAL RIVERA

Cod. 1611350

MARTIN TORRES RUEDA

Cod. 1611394

**UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA
CÚCUTA**

2023

**ANÁLISIS DE UN SISTEMA FED-BATCH PARA LA PRODUCCIÓN DE
FICOERITRINA (PE) EN CIANOBACTERIAS TERMOTOLERANTES**

JOSE DAVID CARVAJAL RIVERA

Cod. 1611350

MARTIN TORRES RUEDA

Cod. 1611394

Informe final presentado como requisito para optar el título de

INGENIERO BIOTECNOLÓGICO

Modalidad

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Director:

***Biol, Ph.D.* ANDRES FERNANDO BARAJAS SOLANO**

**UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA
CÚCUTA**

2023



ACTA DE SUSTENTACION DE UN TRABAJO DE GRADO

FECHA: 03 marzo de 2023

HORA: 09:00 A.M.

LUGAR: UFPS - CUCUTA, NORTE DE SANTANDER – SC 302

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

TITULO: “ANÁLISIS DE UN SISTEMA FED-BATCH PARA LA PRODUCCIÓN DE FICOERITRINA (PE) EN CIANOBACTERIAS TERMOTOLERANTES”.

MODALIDAD: INVESTIGACIÓN

JURADO GERMAN RICARDO GELVES ZAMBRANO
HEBERTH MILTON MOJICA SANCHEZ
ALINA KATIL SIGARROA RIECHE

ENTIDAD: UFPS

DIRECTOR: ANDRÉS FERNANDO BARAJAS SOLANO

NOMBRE DE LOS ESTUDIANTE	CODIGO	CALIFICACION
Jose David Carvajal Rivera	1611350	4.4
Martin Torres Rueda	1611394	4.4

OBSERVACIONES: APROBADO.

FIRMA DE LOS JURADOS

German Ricardo Gelves Zambrano Heberth Milton Mojica Sanchez Alina Katil Sigarroa Rieche

Vo. Bo Coordinador Comité Curricular

AGRADECIMIENTOS

No podríamos comenzar esta sesión sin antes agradecer a Dios por habernos dado la oportunidad de llevar a cabo este proyecto de vida y por habernos brindado la fuerza, paciencia y la perseverancia necesaria para lograrlo.

A nuestros padres, Juan Carvajal y Xiomara Rivera, Martín Torres y Claudia Rueda, por su amor incondicional, apoyo constante y sus consejos sabios e indispensables, les agradecemos profundamente. Ellos han sido una fuente de motivación e inspiración para lograr culminar esta etapa. Igualmente, a nuestros hermanos y demás familiares especialmente Mildred Carvajal por su motivación y acompañamiento en todo este proceso.

Asimismo, queremos agradecer a nuestros profesores quienes han compartido sus conocimientos y experiencias con nosotros, y nos han guiado en el camino hacia la formación académica y personal, en especial a nuestro director Andrés Fernando Barajas Solano quien fue de gran ayuda para la elaboración de esta investigación.

Finalmente, agradecemos a todas las personas que de alguna u otra forma han contribuido directa o indirectamente en nuestro crecimiento.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1. EL PROBLEMA.....	4
1.1 TÍTULO:	4
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	4
1.3 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	4
1.4 JUSTIFICACIÓN	5
1.5 OBJETIVOS	5
1.5.1 Objetivo general.....	5
1.5.2 Objetivos específicos.....	6
1.6 ALCANCES Y LIMITACIONES	6
1.6.1 Alcance	6
1.6.2 Limitaciones.....	6
1.7 DELIMITACIONES	6
1.7.1 Espacial	6
1.7.2 Temporal	6
1.7.3 Conceptual.....	6
2. MARCO REFERENCIAL	8
2.1 ANTECEDENTES	8
2.2 MARCO TEÓRICO	11
2.2.1 Cianobacterias	11
2.2.2 Ficobiliproteínas	11
2.2.3 Biomasa	13
2.2.4 Medios y parámetros de cultivo.....	13
2.2.5 Sistema Fed-Batch.....	14
2.3 MARCO CONTEXTUAL	14
2.4 MARCO LEGAL.....	14
3. DISEÑO METODOLÓGICO.....	16
3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN	16
3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA.....	16
3.3 HIPÓTESIS.....	16
3.4 VARIABLES	16
3.4.1 Variables dependientes	16
3.4.2 Variables independientes.....	16
3.5 FASES DE LA INVESTIGACIÓN	17
4. RESULTADOS Y ANÁLISIS	21
5. CONCLUSIONES.....	31

6. RECOMENDACIONES	31
7. REFERENCIAS.....	32

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. PRODUCCIÓN DE BIOMASA INICIAL.....	21
FIGURA 2. CONCENTRACIÓN DE BIOMASA/CONSUMO DE SUSTRATO.....	22
FIGURA 3. CONCENTRACIÓN DE PE/CONSUMO DE NITRÓGENO.....	22
FIGURA 4. PRODUCCIÓN DE BIOMASA/PRODUCCIÓN DE PE.....	23
FIGURA 5. LINEALIZACIÓN DE LOS DATOS.....	24
FIGURA 6. DISTANCIA DE COOK PARA CONCENTRACIÓN DE BIOMASA.....	27
FIGURA 7. DISTANCIA DE COOK PARA PE.....	28
FIGURA 8. A) COMPARACIÓN ENTRE LA PRODUCCIÓN DE PE EN LOS DOS SISTEMAS; B) RELACIÓN DE PUREZA EN LOS DOS SISTEMAS.....	29

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. MEDIO BG11 MODIFICADO.....	17
TABLA 2. DISEÑO EXPERIMENTAL TIPO CENTRAL COMPUESTO	20
TABLA 3. DISEÑO EXPERIMENTAL FED-BATCH	25
TABLA 4. ANOVA PARA CONCENTRACIÓN DE BIOMASA	26
TABLA 5. ANOVA PARA CONCENTRACIÓN DE PE	27

RESUMEN

Las cianobacterias son microorganismos procariotas capaces de realizar fotosíntesis oxigénica, por ello, son de gran importancia para el desarrollo de nuevas investigaciones en el campo biotecnológico. En este trabajo se realizó un análisis de la producción de ficoeritrina (PE) en *Potamosiphon sp* por medio de un sistema de operación Fed-batch. La cepa utilizada fue UFPS003, este género de cianobacteria fue recientemente aislada un termal de la región y ha sido poco estudiada para la producción de ficobiliproteínas. En primer lugar, se realizó un análisis cinético durante 25 días de cultivo en medio BG11 modificado, en el cual se obtuvo la tasa máxima de crecimiento celular (0.178 día^{-1}), coeficiente de afinidad ($0.062 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) y el rendimiento de la biomasa respecto al sustrato limitante (0.21). En segundo lugar, se diseñó el sistema Fed-batch que tuvo como factores de crecimiento la concentración de nitrógeno y el tiempo de cultivo. A nivel de resultados, se logró determinar que la producción de biomasa y PE fue mayor a los 20 días de cultivo en los dos sistemas de operación; siendo superior la concentración de biomasa en el Batch (0.45 g/L). Sin embargo, el sistema de operación Fed-batch mostró una importante mejoría en la pureza del extracto. En conclusión, se logró determinar la cinética de producción de biomasa y PE. Así mismo, se demostró que la adicción semicontinua de NO_3 no es la mejor opción para optimizar la producción de biomasa y PE en *Potamosiphon sp* UFPS003.

Palabras claves: ficoeritrina, *Potamosiphon sp.*, Biomasa, Fed-Batch, Nitrato

ABSTRACT

Cyanobacteria are prokaryotic microorganisms capable of oxygenic photosynthesis; therefore, they are of great importance for the development of new research in the biotechnological field. In this work, an analysis of the production of phycoerythrin (PE) in *Potamosiphon* sp was carried out by means of a Fed-batch operation system. The strain used was UFPS003, this genus of cyanobacterium was recently isolated from a thermal of the region and has been little studied for the production of phycobiliproteins. First, a kinetic analysis was performed during 25 days of culture in a modified BG11 medium, in which the maximum cell growth rate (0.178 day^{-1}), affinity coefficient ($0.062 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), and biomass yield with respect to the limiting substrate (0.21) were obtained. Secondly, the Fed-batch system was designed with nitrogen concentration and cultivation time as growth factors. The results showed that biomass and PE production were higher after 20 days of cultivation in the two operating systems; the biomass concentration was higher in the Batch system (0.45 g/L). However, the Fed-batch system showed a significant improvement in the purity of the extract. In conclusion, it was possible to determine the kinetics of biomass and PE production. Likewise, it was demonstrated that the semi-continuous addition of NO_3 is not the best option to optimize the production of biomass and PE in *Potamosiphon* sp UFPS003.

Key words: phycoerythrin, *Potamosiphon* sp., Biomass, Fed-Batch, Nitrate

INTRODUCCIÓN

Las cianobacterias, comúnmente conocidas como algas verdes o azules son microorganismos procariotas capaces de realizar fotosíntesis oxigénica en la que el donante primario de electrones es el agua y que, por lo tanto, se libera oxígeno (O₂) como subproducto (Romero *et al.*, 2017). Además, poseen una gran capacidad para la fijación del nitrógeno; este componente estimula el metabolismo de estos microorganismos (Tang *et al.*, 2019). Las mismas han sido aprovechadas para diferentes fines, destacándose su utilidad en la biorremediación de ambientes contaminados, como productora de energía, fertilizantes, metabolitos secundarios de interés farmacológico y muy especialmente como alimento para el consumo humano y animal (Rastogi & Sinha, 2009; Silos Vega, 2021).

Hoy en día, las cianobacterias termófilas se presentan como una alternativa muy interesante para los procesos industriales, ya que poseen un metabolismo con amplia facultad de asimilación, es decir, son capaces de crecer en altas concentraciones de sales inorgánicas, al igual que en fotoperiodos amplios y temperaturas relativamente elevadas (Farrokh, Sheikhpour, Kasaeian, Asadi, & Bavandi, 2019). Entre los géneros más estudiados se encuentran *Thermosynechococcus elongatus TA-1*, *Phormidium sp.*, *S. platensis* y *Galdieria sulphuraria 074G* cuando se habla de producción de ficobiliproteínas (A. Patel, Matsakas, Rova, & Christakopoulos, 2019). Sin embargo, existen otros géneros que reportan una tasa elevada de producción de estas proteínas como es el caso de *Potamosiphon sp.*, una cianobacteria filamentosa con concentraciones elevadas de carbohidratos, lípidos, proteínas y clorofila de interés industrial.

La cianobacteria filamentosa *Potamosiphon australiensis gen. nov.*, sp nov. es un género aislado de un pequeño arroyo costero en el noreste subtropical de Australia, la caracterizaron utilizando atributos filogenéticos combinados y morfológicos, para su caracterización molecular se utilizaron secuencias del gen ARNr 16S los cuales muestran gran similitud entre los miembros del género *Lyngbya* y *Microseira minor sp.*, de acuerdo a

su estudio morfológico se evidencia que los filamentos son isopolares, cilíndricos, ligeramente o no contraídos en las paredes transversales y su reproducción se produjo a través de hormogonias móviles, que se formaron a menudo en serie, después de la aparición de células necríticas (GENG *et al.*, 2021; McGregor & Sendall, 2019).

Las ficobiliproteínas son pigmentos coloreados y altamente fluorescentes de interés en múltiples industrias por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antiplaquetario, anticancerígeno, antifúngico y antiviral (H. M. Patel, Rastogi, Trivedi, & Madamwar, 2018). Entre estas proteínas resaltan, la C-ficocianina (C-PC), Aloficocianina (APC) y C-ficoeritrina (C-PE) por sus capacidades y propiedades pigmentarias (Marx & Adir, 2013; H. M. Patel *et al.*, 2018). Estos compuestos se encuentran en serie y forma los ficobilisomas que son grandes complejos captadores de luz que mejoran la eficiencia de la captura de luz en el espectro visible y ayudan a ampliar los límites donde las especies fototróficas pueden sobrevivir, por ello, el estudio de los factores que afectan esta región es de suma importancia para mejorar la calidad, productividad y rentabilidad de los procesos biotecnológicos (A. Puzorjov & McCormick, 2020).

Por otro lado, para la producción de estas proteínas se deben tener en cuenta múltiples parámetros como: el pH, temperatura, fotoperiodo, disponibilidad de nitrógeno entre otros factores que pueden influir en la estabilidad del proceso biológico (Klepacz-Smółka *et al.*, 2020; N. K. Lee, Oh, Kim, & Ahn, 2017; Zuurro *et al.*, 2021). Diversos estudios reportan posibles mejoras en las diferentes etapas de obtención de estos metabolitos, describen la optimización de las condiciones de crecimiento y la composición de los medios (Lobo de León, 2018; Méndez Rodríguez, 2018; Ramos, 2020). Así mismo, en los procesos de extracción y purificación se han realizado diferentes estudios con la finalidad de reducir costos de operación y lograr minimizar las pérdidas de estas sustancias y el desperdicio de la

biomasa (Ho, Liao, Chen, & Chang, 2018; Li, Zhang, Paciulli, & Abbaspourrad, 2020; Minchev, Petkova, & Milkova-Tomova, 2020; Zuorro *et al.*, 2021).

Con base en lo anterior, los estudios se han centrado en describir la cinética para la producción de ficobiliproteínas y el consumo de cada componente del medio de cultivo con la finalidad de obtener la mayor productividad posible (Çelekli, Topyürek, Markou, & Bozkurt, 2016; S.-H. Lee, Lee, Kim, & Lee, 2016). Así mismo, el nitrógeno es uno de los principales nutrientes a tener en cuenta para optimizar la producción, por ello, los avances en los estudios cinéticos son determinantes para lograr un control sobre las concentraciones necesarias que debe contener el medio de cultivo para conseguir un proceso óptimo en cuestión de productividad y rentabilidad (Kaewdam, Jaturonglumlert, Varith, Nitatwichit, & Narkprasom, 2019; Anton Puzorjov, Dunn, & McCormick, 2021).

El objetivo de este trabajo es analizar la producción de ficoeritrina (PE) en un sistema fed-batch, estableciendo la concentración óptima de nitrógeno para conseguir mejores rendimientos en su producción. En primer lugar, se realizará un estudio cinético del metabolismo de la cianobacteria *Pothamosiphon* sp. proveniente de la región con el fin de conocer la concentración óptima de los sustratos. En segundo lugar, una vez obtenidos los parámetros cinéticos se iniciará con el diseño experimental para la operación fed-batch. Finalmente, se analizarán los resultados obtenidos comparando con otros sistemas de operación.

1. EL PROBLEMA

1.1 TÍTULO

ANÁLISIS DE UN SISTEMA FED-BATCH PARA LA PRODUCCIÓN DE FICOERITRINA (PE) EN CIANOBACTERIAS TERMOTOLERANTES

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las cianobacterias tienen la capacidad metabólica para producir ficobiliproteínas pigmentadas (aloficocianina (APC), la C-ficocianina (CPC), la C-ficoeritrina (C-PE) y la ficoeritrocianina (PEC)) de gran importancia para fines biotecnológicos e industriales (Basheva *et al.*, 2018; Romero *et al.*, 2017). La demanda de estos pigmentos va en aumento, lo que genera una búsqueda continua de nuevas estrategias para mejorar la producción de estos metabolitos y así lograr una reducción en los principales costos de operación (Ho *et al.*, 2018). El problema más desafiante asociado con la producción de ficocianinas es optimizar su acumulación intracelular (Manirafasha *et al.*, 2018). Aunque, se han realizado ensayos en sistemas de operación en modo batch y continuo no se consigue una mejora significativa en relación productividad-costo operacional (Çelekli *et al.*, 2016; da Fontoura Prates, Radmann, Duarte, de Morais, & Costa, 2018; Wang, Zhu, Yang, Li, & Hoffmann, 2020). Por otra parte, los estudios en un modo de operación fed-batch son escasos y no han descrito una metodología adecuada para la puesta en marcha de este modelo en cianobacterias filamentosas, por lo tanto, la importancia de obtener parámetros cinéticos óptimos que permitan aplicar este modo de operación y dar pautas a futuros estudios a gran escala.

1.3 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿La aplicación de un sistema fed-batch favorece en la acumulación de ficoeritrina en cianobacterias termotolerantes?

1.4 JUSTIFICACIÓN

Las ficobiliproteínas en especial las C-Ficocianina están ganando interés comercial debido a su valor nutricional y sanitario, es por consiguiente necesario recolectar las células de cianobacterias en el momento óptimo para asegurar la productividad máxima de esta (Xie *et al.*, 2015). El empleo de biorreactores modernos es una contribución importante para reducir el costo de producción de estos compuestos y hacer más competitiva su producción mediante el uso de microorganismos fotosintéticos como lo son las cianobacterias (Tolosa Martínez, 2019). Con base en lo anterior, las cianobacterias pueden acumular estos metabolitos en diferentes condiciones de estrés nutricional, convirtiéndose en una estrategia para impulsar la acumulación de C-PC en las células de estos microorganismos (Manirafasha *et al.*, 2018). Por otra parte, el proceso de lote alimentado se ha postulado como una de las mejores estrategias para controlar el crecimiento y mejorar la acumulación de C-PC (Kaewdam *et al.*, 2019). Sin embargo, la carencia de estudios que faciliten una metodología para la puesta en marcha de un modelo fed-batch de producción de ficobiliproteínas pigmentadas (APC, C-PC, C-PE y PEC) hace necesario investigar la cinética de las cianobacterias para mejorar la acumulación de estas proteínas y así lograr obtener los parámetros óptimos de crecimiento y estimulación de estos microorganismos para conseguir un aumento en la productividad. Finalmente, esta investigación pretende obtener los factores fisicoquímicos y parámetros biológicos que permitan la aplicación de un sistema de producción en modo fed-batch en cianobacterias.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo general

Analizar la eficiencia de un sistema fed-batch en la producción de ficoeritrina (PE) de cianobacterias termotolerantes

1.5.2 Objetivos específicos

- Determinar la cinética de producción de biomasa y ficoeritrina (PE) en *Potamosiphon* sp UFPS003
- Evaluar el efecto de la adición semicontinua de NO₃ en la producción de biomasa y ficoeritrina (PE) en *Potamosiphon* sp UFPS003

1.6 ALCANCES Y LIMITACIONES

1.6.1 Alcance

El proyecto de investigación pretende analizar la producción de biomasa y ficoeritrina a partir de un sistema fed-batch.

1.6.2 Limitaciones

Una de las limitaciones que genera mayor riesgo en este tipo de investigación es la baja adaptabilidad del microorganismo al medio de cultivo formulado para analizar la producción de ficoeritrina en un sistema fed-batch.

1.7 DELIMITACIONES

1.7.1 Espacial

El proyecto de investigación se desarrollará en el Laboratorio de Investigación INNOValgæ ubicado en el campo experimental Campos Elíseos de la UFPS.

1.7.2 Temporal

El proyecto se realizará en un periodo de 5 meses.

1.7.3 Conceptual

Biomasa: La biomasa puede considerarse como la materia orgánica originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía.

Cianobacterias: Las cianobacterias fueron designadas durante mucho tiempo como algas azules, cuando se descubrió la distinción entre célula procariota y eucariota se contactó

que son un filo del dominio bacteria capaces de realizar fotosíntesis oxigénica. Son los únicos procariontes que llevan a cabo ese tipo de fotosíntesis.

Ficobiliproteínas (PBP): Son holoproteínas con grupos prostéticos tetrapirrólicos lineales (ficobilinas) que se encuentran unidos covalentemente a residuos de cisteína específicos de la apoproteína. Están presentes en cianobacterias y en los cloroplastos de ciertas algas. Capturan la energía lumínica que será luego transferida a la clorofila durante el proceso de fotosíntesis.

Ficobilisoma: Son complejos supramoleculares de pigmentos solubles en agua que sirven principalmente como antenas recolectoras de luz en cianobacterias y algas rojas encontrados en la superficie de la membrana tilacoidal de estos microorganismos dispuestos en filas a menudo paralelos entre sí. Los ficobilisomas se componen en gran parte de ficobiliproteínas.

Ficoeritrina (PE): Es un pigmento ficobilínico de color rojo que funciona como sustancia que absorbe la luz. Es un pigmento accesorio que actúa en conjunción con la clorofila.

Medio BG11: Especialmente recomendado para el cultivo de cianobacterias, debido a su alta concentración de Nitrato de Sodio y otras sales.

Potamosiphon Sp UFPS003: Es la cepa una nueva cianobacteria filamentosa aislada de un termal del Departamento de Norte de Santander.

Sistema Fed-Batch: Es un fermentador alimentado discontinuo utilizado como método biotecnológico de producción basado en la administración del sustrato limitante del crecimiento del cultivo. Suele emplearse para conseguir elevadas concentraciones celulares en el biorreactor.

2. MARCO REFERENCIAL

2.1 ANTECEDENTES

Antecedentes Internacionales:

De acuerdo con Kaewdam *et al.* (2019) demostró en su investigación que el nitrógeno es uno de los factores más importantes en el crecimiento celular y la productividad de pigmentos. El cultivo de *Spirulina platensis* demostró que el aumento de la concentración de la fuente de nitrógeno condujo a una mayor acumulación de C-ficocianina (C-PC), siendo más factible y económico las sales de amonio como bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3) cloruro de amonio (NH_4Cl) y sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) que en comparación con otras fuentes de nitrógeno como las sales de nitrato, por lo tanto, se puede determinar que los modelos cinéticos para la producción de ficobiliproteínas como las aloficocianina (APC), la C-ficocianina (C-PC), la C-ficoeritrina (C-PE) y la ficoeritrocianina (PEC) mediante cultivos Fed-Batch o cultivo por lote alimentado se han postulado como una estrategia para controlar el crecimiento y mejorar la acumulación de ficobiliproteínas.

Otra investigación realizada por Manirafasha *et al.* (2018) tenía como objetivo principal optimizar la acumulación de ficocianina a nivel intracelular en *Arthrospira*, en esta investigación se demuestra que el rango efectivo de concentración de nitrato bajo cultivo fototróficos combinados con condiciones de estrés metabólico mejoran significativamente el crecimiento de biomasa y la acumulación de ficocianina después de solo 7 días del periodo del cultivo. Igualmente, Xie *et al.* (2015) realizó un estudio para optimizar la intensidad de la luz y la concentración de biomasa inicial para la producción de CPC de *A. platensis*, demostrando que la baja intensidad de luz y la alta concentración inicial de biomasa condujeron a una mayor acumulación de esta ficobiliproteína, estos resultados indican que para favorecer la acumulación de CPC se requiere controlar un nivel más bajo de nitrógeno en cultivo por lotes. Asimismo, estos estudios nos sirven como base para determinar parámetros que ayuden a obtener resultados significativos en la acumulación de ficocianina.

Finalmente, la investigación realizada por Romero *et al.* (2017) cuyo objetivo era la extracción de pigmentos ficobiliproteínas evaluando por triplicado cuatro métodos para la cuantificación de ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina, mediante espectrofotometría UV-Visible, midiendo la absorbancia de los extractos a los máximo de absorbancia de 650, 620 y 565 nm, demostró que para la obtener mayor contenido de estos pigmentos es recomendable utilizar fotobiorreactores cilíndrico y no helicoidal, realizando la cosecha en fase estacionaria y utilizando como extracción el método con regulador de fosfato tratado con hielo seco.

Antecedentes Nacionales:

El estudio realizado por Toloza Martínez (2019) demuestra que factores como la cantidad de biomasa, temperatura y pH influyen en la estabilidad de la ficocianina. También, se evidencia que el método de extracción utilizando buffer fosfato 1M con un pH 7 y la precipitación con sulfato de amonio al 20% de saturación para la purificación, logra separar completamente la ficocianina de la biomasa. Igualmente, brinda información para determinar las propiedades fisicoquímicas de la ficocianina usando espectrofotometría UV-VIS y los análisis cualitativos de la química orgánica para caracterizar el compuesto y evidenciar que sea la sustancia de interés.

Por otra parte, Mosquera Torrado (2017) en su investigación estableció por medio de la metodología propuesta que el extracto de levadura, glucosa y sulfato de amonio son concentraciones de variables en el medio de cultivo que tiene una mayor relevancia en la producción de biomasa y ficocianina. Asimismo, se realizó en el estudio una fotoinducción a partir de una siembra en heterotrofia a una siembra en autotrofia con condiciones establecidas de luz, demostrando que a mayor incidencia de luz la microalga producía mayor concentración del pigmento.

Por último, (Torres & Camacho Kurmen, 2022) realizaron un estudio con el objetivo de conocer los modelos de crecimiento que mejor expliquen el proceso de la microalga *H.*

pluvialis, como lo son los propuestos por Baranyi-Roberts, Gompertz, logístico y Monod, teniendo en cuenta parámetros cinéticos como velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$), el tiempo de duplicación (td), la biomasa inicial (X_0), la biomasa final (X_f) y la productividad del carotenoide (Y_p/Y_s), llegando a tener como resultado parámetros cinéticos capaces de llevar una buena producción de pigmentos, igualmente, es significativo contar con fotoperiodos, temperatura y composición de medio de cultivo controlados. Lo anterior nos permite establecer parámetros para las condiciones óptimas de cultivo y producción de pigmentos, utilizando coeficientes de correlación necesarios para el modelo matemático de nuestra investigación.

Antecedentes Regionales:

De acuerdo con Mogollón Londoño (2019) las cianobacterias termotolerantes tienen una alta capacidad de producir ficocianina, se demuestra que en Norte de Santander hay una gran diversidad de este tipo de cianobacterias capaces de producir ficocianina y otros tipos de ficobiliproteínas, teniendo en cuenta las condiciones del medio de cultivo y condiciones de crecimiento se puede mejorar para obtener una mayor producción de biomasa y de estos pigmentos de interés.

Por otra parte, el estudio realizado por Leal Medina *et al.* (2017) para evaluar la producción de ácidos grasos poliinsaturados de un cultivo de microalgas en condiciones de heterotrofia, en el cual se realizó la cinética en un Biorreactor a escala de 10L, se obtuvo que la cinética de 10L de *Chlorella* sp. permitió una concentración máxima del producto de interés con condiciones heterotróficas en comparación con condiciones de autotrofia. Con base en lo anterior, cabe la importancia de realizar un estudio para la cinética de cianobacteria en cultivo fed-batch para obtener ficobiliproteínas de interés comercial.

2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1 Cianobacterias

Las cianobacterias son un grupo diverso de bacterias gram-negativas fotosintéticas que pueden encontrarse en diferentes cuerpos de agua (lagos, ríos y mares), montañas y desiertos (Carpine & Sieber, 2021). Estos microorganismos procariotas son los únicos capaces de desarrollar fotosíntesis oxigénica, es decir, pueden utilizar el CO₂ como fuente de carbono y reducirlo por medio de un proceso endergónico impulsado por energía lumínica; se estima que tienen una edad de 3.500 millones de años y han estado implicadas directamente en el desarrollo bioquímico de la tierra (Jaiswal, Sahasrabudhe, & Wangikar, 2022; Sánchez-Baracaldo, Bianchini, Wilson, & Knoll, 2021). Hoy en día, se conocen alrededor de 150 géneros y más de 2000 especies que van desde microorganismos simples unicelulares hasta colonias complejas filamentosas, esta evolución es la que les permite crecer en condiciones extremas; gracias a esta adaptabilidad se pueden obtener una amplia gama de metabolitos secundarios de interés industrial (Almuhtaram et al., 2021; Nowruzi, Sarvari, & Blanco, 2020).

2.2.2 Ficobiliproteínas

Las ficobiliproteínas pigmentadas (PBP) son proteínas receptoras de luz que se activan por la energía lumínica, estas se encuentran ensambladas a la superficie externa de los tilacoides formando el ficobilisoma o complejo pigmento-proteína de las cianobacterias; el rango espectral para la excitación de estas se ubica entre 500 y 660 nm (Sonani *et al.*, 2020). Existen variaciones a nivel estructural y lugar de origen de estas proteínas que ocasiona subdivisiones de las mismas; entre las más importantes se encuentran la C-ficocianina (C-PC), aloficocianina (APC) y C-ficoeritrina (C-PE) (Maltsev, Maltseva, Kulikovskiy, & Maltseva, 2021).

2.2.2.1. C- Ficocianina

La C-PC es una ficobiliproteína de tonalidad azul oscuro que se constituye principalmente de dos polipéptidos; una subunidad α (18,2 kDa) y una β (19,3 kDa) cada una contiene enlaces covalentes cromóforos lineales de tetrapirrol ficocianobilina, la asociación de estas formas forma una unidad heterodimérica que se une para formar un trímero (Sui, 2021). El cromóforo de esta proteína se excita bajo luz roja y su rango de absorbancia va desde 600 hasta 640 nm (Ferraro *et al.*, 2020; Sonani *et al.*, 2020). En la actualidad, la C-ficocianina se presenta como un metabolito de interés industrial por su alta gama de aplicabilidad en diversos sectores, ya que tiene la capacidad de reaccionar contra especies oxígeno, como los radicales hidroxilos (-OH), alcoxilo (RO-) y peroxilo (ROO-), es decir, se considera un potente antioxidante, antiinflamatorio, anticancerígeno y colorante por nombrar algunos de sus usos más relevantes (Adjali, Clarot, Chen, Marchioni, & Boudier, 2021; Jiang *et al.*, 2017).

2.2.2.2. Aloficocianina

La aloficocianina es una ficobiliproteína de color verde azulado que se encuentra ubicada entre los fotosistemas y los bastones de C-PC y C-PE (Jaeschke, Teixeira, Marczak, & Mercali, 2021). Esta proteína es un núcleo cilíndrico y se encarga en conectar los cromóforos con los tilacoides permitiendo que la energía lumínica recolecta interactúe con la clorofila A (Chl A) e inicie el proceso de fotosíntesis (Jaeschke *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2021). La mayor tasa de absorbancia de esta proteína es en una longitud de onda de 650nm y bajo diferentes colores de luces LED (Ferraro *et al.*, 2020).

2.2.2.3. C- Ficoeritrina

La C-PE es una proteína en forma de bastones que se encuentra en la parte superior del ficobilisoma y su cromóforo es de color rojo-rosado y está compuesta principalmente por una subunidad α y una β , y además cuentan con una tercera subunidad llamada γ

(Kannaujiya, Kumar, Singh, & Sinha, 2021). Esta proteína absorbe luz a una longitud de onda que va desde 540-570 nm y emite una fuerte fluorescencia amarilla siendo la principal ficobiliproteína soluble (Ferraro et al., 2020; Jaeschke et al., 2021; Kannaujiya et al., 2021).

2.2.3 Biomasa

La biomasa es un material orgánico que se puede clasificar de acuerdo a su origen ya sea microbiano, vegetal o animal; este material contiene compuestos y elementos de interés para múltiples industrias ya que se puede usar como fuente de energía (Vassilev, Baxter, Andersen, Vassileva, & Morgan, 2012).

2.2.4 Medios y parámetros de cultivo

Para la proliferación de cianobacterias existen diferentes medios de cultivo como el BG11, ASN III, Z8, Gromov no.6, Zarrouk entre otros que se modifican según la necesidad de la investigación (Temraleeva, Dronova, Moskalenko, & Didovich, 2016). Estudios recientes sugieren que uno de los mejores medios de cultivo es el BG11, ya que es un medio líquido con pH de 6.9 a 7.4 y esto facilita su suplementación con nitrógeno y otros nutrientes (Basheva *et al.*, 2018; Demirel & Sukatar, 2019; Temraleeva *et al.*, 2016). Los principales parámetros fisicoquímicos más relevantes para el establecimiento y producción de metabolitos de interés industrial a partir de cianobacterias son el pH, temperatura, fotoperiodo e intensidad y color de luz. Con base en lo anterior, estudios se han centrado en optimizar la intensidad lumínica y el tiempo de exposición a esta; algunos describen que las lámparas LEDs de 20W y un fotoperiodo de 16:8 horas estimulan la producción de ficobiliproteínas, otro especifica que se debe emplear lámparas de 40W con variedad de colores como azul, verde, rojo y blanco, y con un fotoperiodo de 12 horas luz/oscuridad. Además, se menciona que el rango de temperatura puede variar entre 10 a 40°C y que esto ayuda a la síntesis de proteínas más estables (da Fontoura Prates *et al.*, 2018; Ho *et al.*, 2018; George N. Hotos & Antoniadis, 2022; Kumar, Nehra, Saxena, & Dhar, 2019; Schipper *et al.*, 2020).

2.2.5 Sistema Fed-Batch

El modo de operación por lote alimentado consiste en proporcionar todos los nutrientes necesarios para el desarrollo del microorganismo antes de la inoculación; a medida que transcurre el proceso se van suministrando uno o más nutrientes hasta obtener la mayor producción. Este tipo de operación ha mostrado grandes beneficios en procesos donde el cambio en las concentraciones de los nutrientes afecta la productividad y el rendimiento del producto deseado. Sin embargo, para obtener el mayor rendimiento de este proceso se deben tener estrategias que permitan controlar los principales parámetros cinéticos como la disponibilidad de nutrientes y la densidad celular, ya que esta relación consumo-generación es la que permite determinar la rentabilidad de un proceso biológico (J. Lee, Lee, Park, & Middelberg, 1999; Minihane & Brown, 1986).

2.3 MARCO CONTEXTUAL

La sede de Campos Elíseos de la Universidad Francisco de Paula Santander está ubicada en el Km 1 vía municipio de los Patios, Cúcuta, Norte de Santander, es un centro experimental equipado con laboratorios que fortalecen los procesos de docencia, investigación y extensión de los diferentes programas académicos adscritos a los departamentos del medio ambiente y ciencias agrícolas y pecuarias de la Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente.

2.4 MARCO LEGAL

Ley 9 de 1919 (Congreso de la República) Por la cual se dictan Medidas Sanitarias, a considerar el artículo 103. Cuando se procesen, manejen, o investiguen agentes biológicos o materiales que habitualmente los contengan se adoptarán todas las medidas de control necesarias para prevenir alteraciones de la salud derivados de éstos.

Ley 740 de 2019 (Congreso de la República) Por medio de la cual se aprueba el "Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la

Diversidad Biológica", hecho en Montreal, el veintinueve (29) de enero de dos mil (2000). En consideración con artículo 2 numeral 2 Las Partes velarán porque el desarrollo, la manipulación, el transporte, la utilización, la transferencia y la liberación de cualesquiera organismos vivos modificados se realicen de forma que se eviten o se reduzcan los riesgos para la diversidad biológica, teniendo también en cuenta los riesgos para la salud humana

La Decisión 562 de la Comunidad Andina señala las directrices para la elaboración, adopción y aplicación de Reglamentos Técnicos en los Países Miembros de la Comunidad Andina y en el nivel comunitario, estableciendo en el artículo 4° que el reglamento técnico de emergencia, es un documento adoptado para hacer frente a problemas o amenazas de problemas que pudieran afectar la seguridad, sanidad, protección del medio ambiente o seguridad nacional.

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

La presente investigación de acuerdo con los objetivos trazados se considera según su estrategia de tipo experimental, debido a que esta investigación científica se encarga de estudios en laboratorio para comprobar una hipótesis por medio del cambio de condiciones o variables que afectan directamente el proceso para obtener las ficobiliproteínas de interés.

3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

Cepa de *Potamosiphon* sp UFPS003 aislada de un termal del Departamento de Norte de Santander. La cepa se mantiene en el laboratorio INNOValgae de la Universidad Francisco de Paula Santander.

3.3 HIPÓTESIS

¿Se puede mejorar la producción de ficoeritrina si se aplica un sistema de operación por lote alimentado o fed-batch?

3.4 VARIABLES

3.4.1 *Variables dependientes*

Las variables dependientes corresponden a la cuantificación de biomasa, ficoeritrina, NO₃ consumido.

3.4.2 *Variables independientes*

Las variables independientes corresponden a la concentración de nutrientes y la adición semi continua de NO₃.

3.5 FASES DE LA INVESTIGACIÓN

❖ Mantenimiento de *Potamosiphon* sp UFPS003

Potamosiphon sp UFPS003 se mantuvo en medio BG11 modificado sólido a 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y una temperatura de 26°C. Para su conservación, una vez cada 35 días las cepas serán reinoculadas en tubos de 10 mL con 4 mL de medio BG11 modificado sólido fresco.

Tabla 1. Medio BG11 modificado

COMPONENTE	SOLUCIÓN STOCK ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ dH}_2\text{O}$)	CANTIDAD UTILIZADA	Concentración final en el medio (M)
<i>Amonio citrato férrico</i>	6	0.4 mL	3×10^{-5}
<i>NaNO₃</i>	--	0.4 g	1.76×10^{-2}
<i>K₂HPO₄</i>	40	1 mL	1.75×10^{-4}
<i>MgSO₄</i>	75	0.2 mL	3.04×10^{-4}
<i>CaCl₂.2H₂O</i>	36	1.5 mL	2.45×10^{-4}
<i>Na₂CO₃</i>	20	0.4 mL	1.89×10^{-4}
<i>MgNa2EDTA</i>	1	0.5 mL	2.79×10^{-6}
<i>Solución de metales</i>		0.4 mL	
<i>H₃BO₃</i>	--	2.86 g	4.63×10^{-5}
<i>MnCl₂.4H₂O</i>	--	1.81 g	9.15×10^{-6}
<i>ZnSO₄.7H₂O</i>	--	0.22 g	7.65×10^{-7}
<i>CuSO₄.5H₂O</i>	79	1 mL	3.16×10^{-7}
<i>Na₂MoO₄.2H₂O</i>	--	0.93 g	1.61×10^{-6}
<i>Co (NO₃)₂.6H₂O</i>	49.9	1 mL	1.70×10^{-7}

❖ Producción de biomasa inicial

Potamosiphon sp UFPS003 se cultivó en frascos de borosilicato transparente de 500 mL con un volumen de trabajo de 300 mL de medio BG11 modificado (Andersen *et al.*, 2005). El medio se agitó mediante la inyección de aire a un flujo de aproximadamente 180

mL_{aire}/min, una radiación de 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un ciclo de luz oscuridad de 12:12 horas durante 20 días. Al finalizar el tiempo de cultivo, los frascos se desconectaron del flujo del aire y se dejaron decantar por 30 minutos. El medio se centrifugo a 3500 rpm durante 20 minutos (20°C).

❖ **Análisis de cinética de producción de biomasa y ficoeritrina**

Debido a la naturaleza filamentosa de *Potamosiphon* sp UFPS003 se realizó un sistema de cultivo segmentado previamente empleado en el laboratorio INNOValgae. Para determinar la velocidad de crecimiento, producción de ficoeritrina (PE) y consumo de NO_3 se preparó un reactor de 2 litros de volumen (1.2 litros de trabajo) y se dejó crecer a un flujo de aproximadamente 0.7 mL_{aire}/min, una radiación de 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un ciclo de luz oscuridad de 12:12 horas durante 15 días. Finalizado el tiempo se empleó la biomasa producida para inocular 18 reactores de 500 mL (15 experimentos y 3 controles). Los cuales crecieron a un flujo de aproximadamente 180 mL_{aire}/min, una radiación de 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un ciclo de luz oscuridad de 12:12 horas durante 20 días.

Una vez cada 5 días se removieron de la aireación 3 frascos (original y dos replicas) y se dejaron decantar durante 30 minutos. Las células precipitadas se reconcentraron por centrifuga (3500 rpm, 20°C, 20 min) y se deshidrataron (24 horas, 50°C). La biomasa recuperada se pesó y el valor se reportó como biomasa producida de acuerdo con tiempo de cultivo.

Para la cuantificación de ficoeritrina se empleó la metodología descrita por Barajas-Solano (2022), 10 mg de biomasa se disolvieron en 10 mL de buffer de extracción (buffer fosfato 0,05M, pH 6.8) y se adicionaron 50 mg de perlas de vidrio. La muestra se destruyó empleado un vortex automático (30 min, 3000 rpm). Finalizado el proceso, las muestras se

almacenaron en nevera a 4°C durante 24 horas. El extracto obtenido se separó de la biomasa por centrifugación (3500 rpm, 20 min, 20°C)

El sobrenadante de color rosa se recuperó y se determinó su concentración empleando diferentes longitudes de onda (280, 562, 620 y 652 nm) mediante un espectrofotómetro UV-VIS. El cálculo de la concentración final de PE se determinó empleando las ecuaciones (Eq 1, 2 y 3) descrita por (Bennett & Bogorad, 1973).

$$C - PC (g/L) = \frac{OD_{620} - 0.474(OD_{652})}{5.34} \quad (1)$$

$$APC (g/L) = \frac{OD_{652} - 0.208(OD_{620})}{5.09} \quad (2)$$

$$PE (g/L) = \frac{(OD_{562} - 2.41(C - PC) - 0.849(APC))}{9.62} \quad (3)$$

El medio libre de células se empleó para cuantificar NO₃ mediante kit espectrofotométrico de acuerdo con las especificaciones de la empresa (HANNA).

❖ Adición semi-continua de NO₃

Una vez determinado la velocidad de consumo de NO₃, se realizó la adición semicontinua de NO₃. Para lograr lo anterior, se inocularon 10 frascos de borosilicato transparente de 500 mL con un volumen de trabajo de 300 mL de medio BG11 modificado (Andersen *et al.*, 2005). El medio se agitó mediante la inyección de aire a un flujo de aproximadamente 180 mL_{aire}/min, una radiación de 100 μmol m⁻² s⁻¹ y un ciclo de luz oscuridad de 12:12 horas durante 20 días. Una vez se consuma el NO₃ se adicionó nuevamente la fuente de nitrato de acuerdo a un diseño de experimentos tipo central compuesto (CCD) con 2 factores (concentración de NO₃ y tiempo de adición) (tabla 2).

Tabla 2. *Diseño experimental tipo central compuesto*

Std	Block	Run	Factor 1	Factor 2
			A:NO ₃ g/L	B: Tiempo días
2	Block 1	1	1	-1
6	Block 1	2	0	0
1	Block 1	3	-1	-1
4	Block 1	4	1	1
5	Block 1	5	0	0
7	Block 1	6	0	0
3	Block 1	7	-1	1
13	Block 2	8	0	0
8	Block 2	9	-1.41421	0
14	Block 2	10	0	0
12	Block 2	11	0	0
9	Block 2	12	1.41421	0
10	Block 2	13	0	-1.41421
11	Block 2	14	0	1.41421

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Como resultado de la investigación realizada en *Potamosiphon* sp UFPS003 se obtuvo la producción de biomasa inicial, la cinética de crecimiento celular del microorganismo y se analizó la adición semicontinua de NO_3 . En primer lugar, después de transcurrir el tiempo de cultivo para la producción de biomasa inicial (ver figura 1), el valor alcanzado en la producción de biomasa fue igual a $0.45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

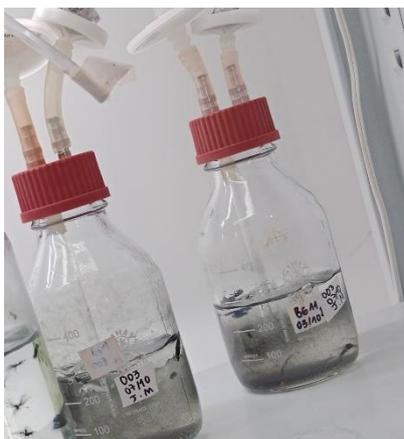


Figura 1. Producción de biomasa inicial

Para el análisis de la cinética de crecimiento celular de la cepa UFPS003 en el modo de operación Batch, se logró cuantificar la producción de biomasa, consumo de nitrógeno y síntesis de PE, y así establecer las principales constantes cinéticas del microorganismo. Luego de retirar el último grupo de experimentos se realizó el análisis estadístico de los datos, donde se obtuvo las relaciones entre la producción de biomasa y el consumo de nitrógeno (ver Figura 2), el consumo de nitrógeno y la producción de la PE (ver Figura 3), al igual que, la relación entre la biomasa y el almacenamiento de la ficobiliproteína de interés (ver Figura 4).

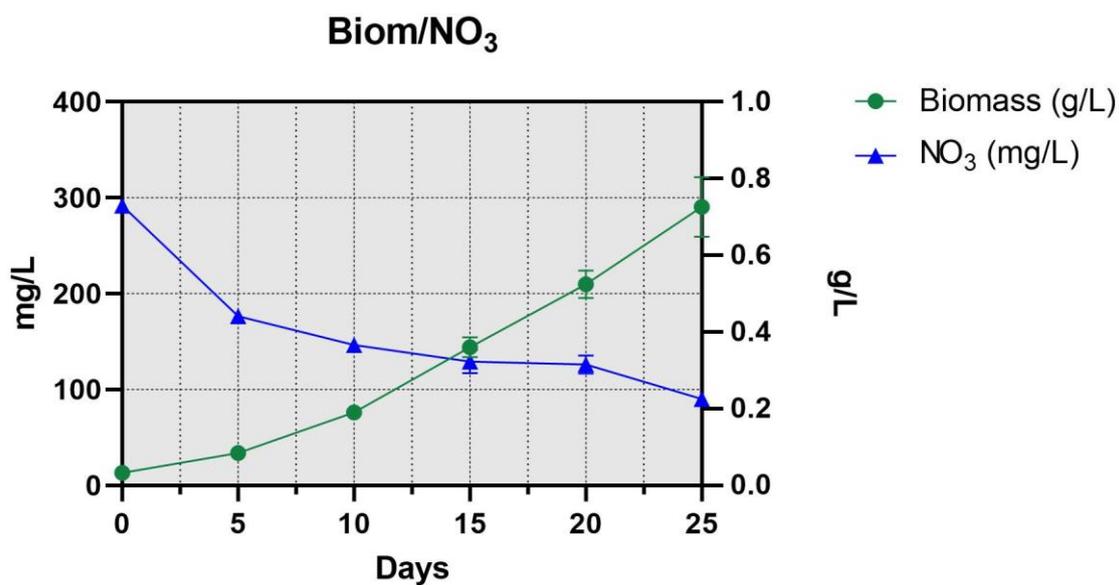


Figura 2. Concentración de biomasa/Consumo de sustrato

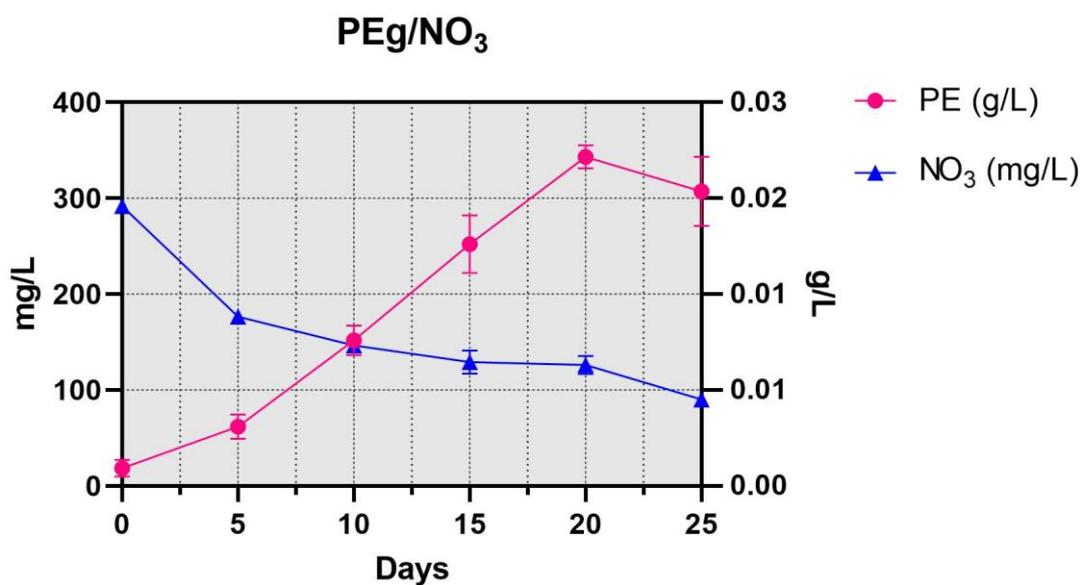


Figura 3. Concentración de PE/Consumo de nitrógeno

En la Figura 2 se puede observar que durante los primeros 5 días de cultivo se consume la mayor parte del nitrógeno suministrado al medio. Sin embargo, la producción máxima de biomasa se alcanza al día 25 llegando a un valor de 0.72 g/L, esto sucede principalmente por el metabolismo del microorganismo para asimilar y utilizar el nitrógeno para el desarrollo de las principales funciones de supervivencia. Por otra parte, la producción

maxima de PE se obtuvo en el día 20 llegando a un valor de $0.022 \text{ g/L} \pm 0.001$ (ver Figura 3), en comparación con el consumo de nitrógeno se observa que después de los primeros 5 días, sigue el consumo de sustrato de una forma paulatina hasta llegar a una concentración de 90 mg/L en el medio de cultivo (ver Figura 3). Asimismo, el análisis cinético permitió observar después de cuanto tiempo de cultivo hay mayor acumulación intracelular de PE, lo cual se evidenció en el día 10 de cultivo. Posterior a los 20 días, se observa una disminución en la concentración de PE en la biomasa producida por la cianobacteria (ver Figura 4), este fenómeno biológico es producido por la interacción entre los centros fotosintéticos (PSI y PSII) de estos microorganismos y la adaptación cromatida complementaria (CCA), ya que estas son las que regulan la captación de luz e impulsan o disminuyen la fotoquímica del ficobilisoma generando un cambio por la sobreexcitación del cromoforo de interés.

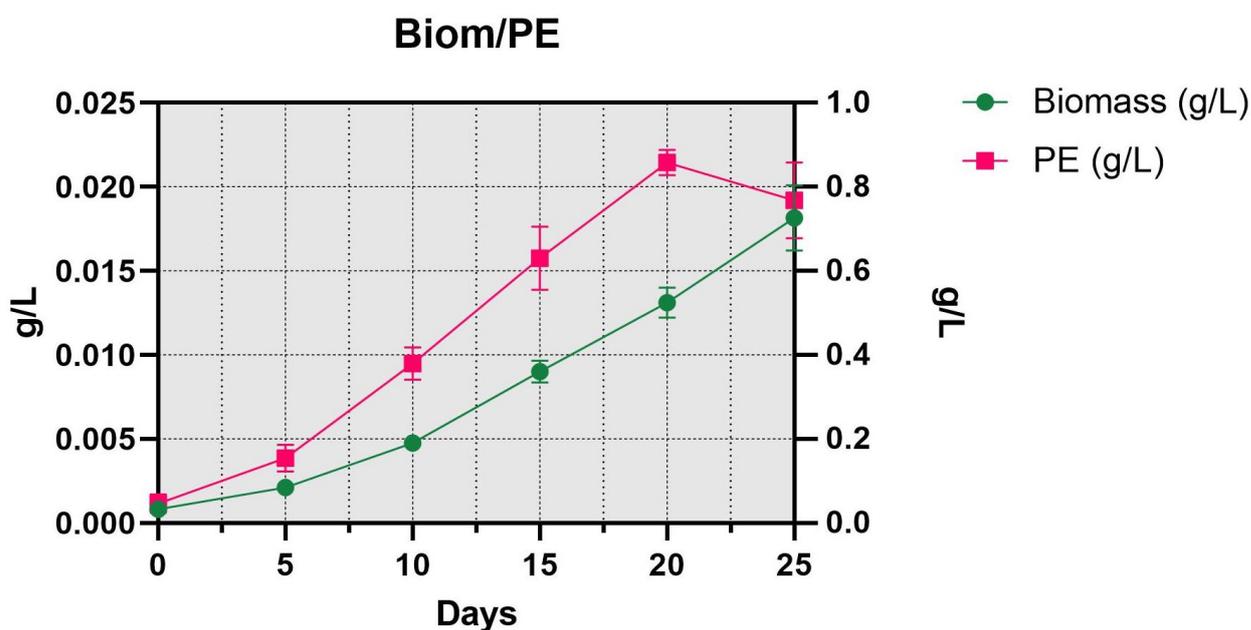


Figura 4. Producción de biomasa/Producción de PE

Por otra parte, se conoce que R^2 es una herramienta estadística que se utiliza en modelos estadísticos como en una regresión para predecir futuros resultados, y se mide en una escala de 0 a 1. Un valor de 1 indica un modelo que predice perfectamente los valores en el campo de

destino. Un valor de 0 indica un modelo que no tiene ningún valor predictivo (Kramer, 2005). Con base en lo anterior, se puede decir que los datos obtenidos del análisis cinético muestran una regresión lineal aceptable, ya que el valor de R^2 es cercano a 1 tanto en la producción de biomasa como en la síntesis de PE (ver Figura 5).

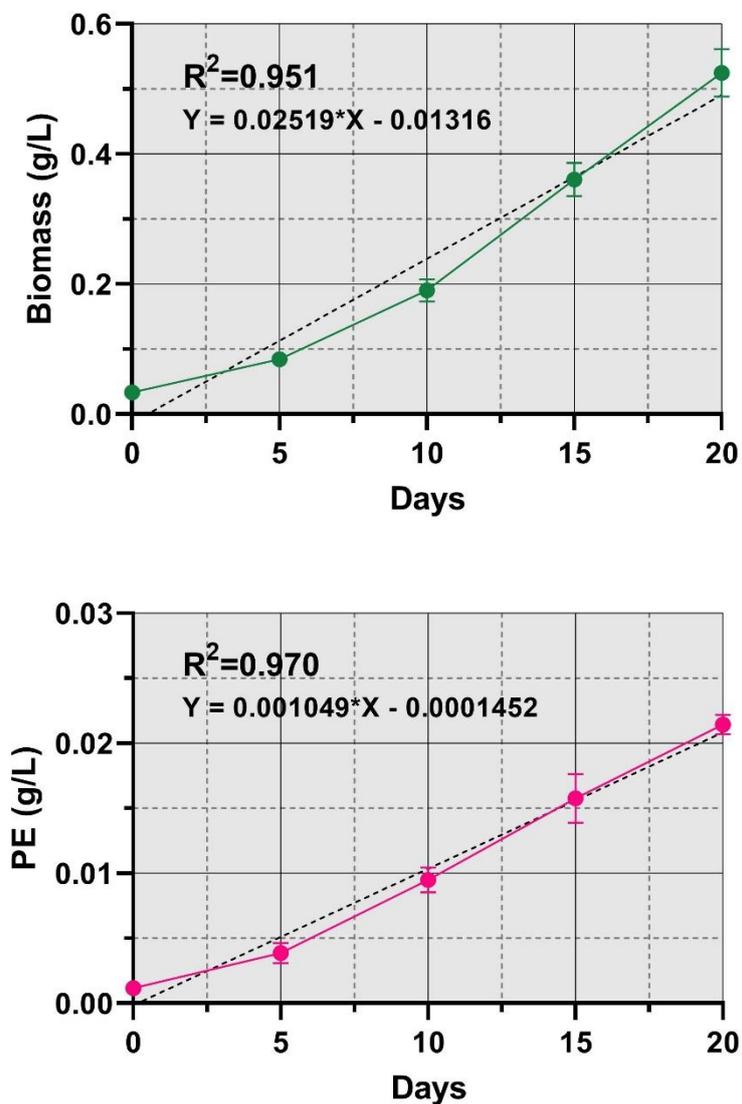


Figura 5. Linealización de los datos

Luego de estudiar el crecimiento celular de la cepa *Potamosiphon sp* UFPS003 durante 25 días, se logró calcular la tasa máxima de crecimiento celular (μ_{max}), el coeficiente de afinidad al sustrato (k_s) y el rendimiento celular respecto al sustrato limitante utilizado (y_{xs}); los valores obtenidos para cada constante fueron 0.178 d^{-1} , $0.062 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ y 0.21 respectivamente.

Una vez finalizado el análisis cinético se obtuvo los datos necesarios para alimentar el software Design Expert® 13 (herramienta utilizada para el diseño de experimentos con gran poder estadístico) y así obtener el diseño experimental de tipo central compuesto resulto (ver Tabla 3).

Tabla 3. *Diseño experimental Fed-Batch*

Std	Block	Run	FACTOR 1	FACTOR 2
			A: NaNO ₃ g/L	B: Time Days
3	Block 1	1	0.400	15
7	Block 1	2	0.800	10
4	Block 1	3	1.2	15
6	Block 1	4	0.800	10
5	Block 1	5	0.800	10
2	Block 1	6	1.2	5
1	Block 1	7	0.400	5
8	Block 2	8	0.234	10
11	Block 2	9	0.800	17.071067811866
12	Block 2	10	0.800	10
10	Block 2	11	0.800	2.9289321881345
13	Block 2	12	0.800	10
14	Block 2	13	0.800	10
9	Block 2	14	1.366	10

De acuerdo con el diseño experimental, se llevó a cabo la adición semicontinua de NO₃, con el fin de evaluar si los factores descriptos anteriormente influyen de forma directa en la acumulación de PE a nivel intracelular. Una vez finalizado los 20 días de cultivo, se

realizó el proceso de extracción y cuantificación de la ficobiliproteína de interés de acuerdo con el protocolo descrito por Barajas-Solano (2022).

De acuerdo con el análisis de ANOVA (tabla 4) para la concentración de biomasa producida, se encontró que el modelo no es significativo con un R^2 de 0.0. Normalmente este tipo de resultados pueden ocurrir debido a problemas experimentales; sin embargo, de acuerdo con el valor de “Lack of Fit”, el F-value obtenido fue de 0.73, lo cual implica que, aunque el modelo no es significativo, los valores no se vieron afectador por el error inherente a la experimentación.

Tabla 4. ANOVA para concentración de biomasa

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Block	4,829E-07	1	4,829E-07			
Model	0,0000	0				
Residual	0,0271	12	0,0023			
Lack of Fit	0,0161	8	0,0020	0,7316	0,6733	not significant
Pure Error	0,0110	4	0,0028			
Cor Total	0,0271	13				
Std. Dev.	0,0475		R²	0,0000		
Mean	0,2443		Adjusted R²	0,0000		
C.V. %	19,45		Predicted R²	-0,3611		
			Adeq Precision	0,0207		

Una forma gráfica para determinar la calidad de los resultados es la distribución de los datos mediante la distancia de Cook (figura 6). De acuerdo con esto, mientras los datos experimentales se encuentren más cercanos al “cero”, menor será su desviación; de forma

opuesta, entre más cercanos se encuentren al límite estadístico (línea roja superior), mayor será su desviación estadística por errores experimentales.

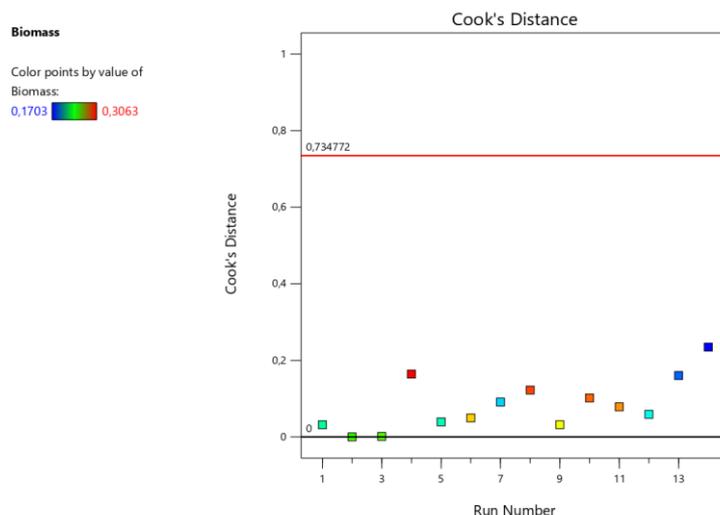


Figura 6. Distancia de Cook para concentración de biomasa

De igual forma, el análisis ANOVA (tabla 5) para la concentración de PE obtuvo resultados similares al de biomasa, con R^2 de 0.0; sin embargo, también se obtuvo un “Lack of Fit”, de 0.9544, lo cual implica que, aunque el modelo no es significativo, los valores no se vieron afectador por el error inherente a la experimentación.

Tabla 5. ANOVA para concentración de PE

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value
Block	0,3260	1	0,3260		
Model	0,0000	0			
Residual	2,22	12	0,1851		
Lack of Fit	0,7419	8	0,0927	0,2506	0,9544 not significant
Pure Error	1,48	4	0,3700		
Cor Total	2,55	13			
Std. Dev.	0,4303		R²	0,0000	
Mean	0,9035		Adjusted R²	0,0000	
C.V. %	47,63		Predicted R²	-0,3611	

La distancia de cook para los datos de PE muestra un buen comportamiento (figura 7), por lo tanto, el R^2 obtenido no se debe a problemas experimentales, sino al comportamiento inherente de la cepa estudiada. Por lo tanto, la concentración de NO_3 y el tiempo de adición en días no afectan (positivamente o negativamente) la producción de biomasa y PE en *Potamosiphon sp.*

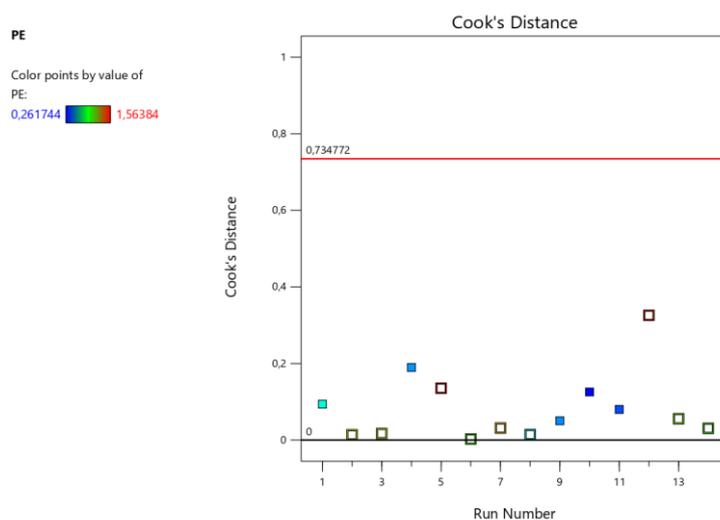


Figura 7. Distancia de Cook para PE

Luego de producir la cepa bajo los dos sistemas de operación, se obtuvo que la concentración de PE alcanzada mediante el proceso Fed-batch son inferiores a las logradas en el sistema en Batch (figura 8). Sin embargo, la pureza de PE aumento en el Fed-batch, lo cual abre la puerta a futuras investigaciones donde se estudie otras variables abióticas como la longitud de onda (color de la luz), intensidad y fotoperiodo, con la finalidad de obtener mayor producción de PE en la cianobacteria analizada.

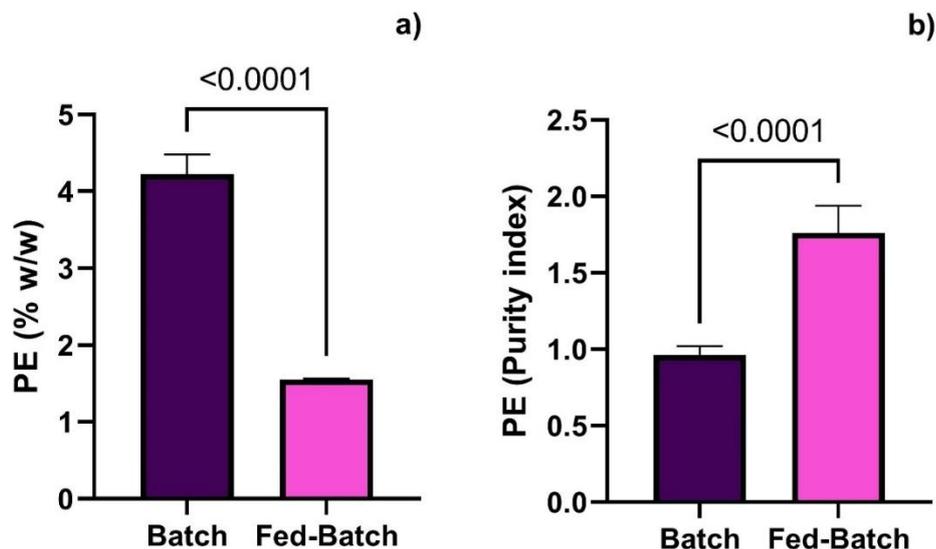


Figura 8. a) Comparación entre la producción de PE en los dos sistemas; b) Relación de Pureza en los dos sistemas

La naturaleza de las cianobacterias para producir compuestos de valor agregado en industrias como la farmacéutica, cosmética y alimentos, además de tener una rápida tasa de crecimiento y capacidad de fijar CO_2 . Esto gracias a su membrana tilacoide que se ensambla complejos supramoleculares más conocidos como ficobilisomas (PBS) formados por proteínas coloradas llamadas ficobiliproteínas, que les permiten captar luz un rango de absorbancia de 500 a 660 nm (Manirafasha, Ndikubwimana, Zeng, Lu, & Jing, 2016). Adicionalmente, son proteínas que poseen la capacidad de almacenar N para su aprovechamiento posterior en diferentes funciones de crecimiento y así evitar procesos de lisis celular por falta de nutrientes en el ambiente (Samardzic *et al.*, 2021; Zinicovscaia, Safonov, Zelenina, Ershova, & Boldyrev, 2020). En el estudio realizado en *Potamosiphon sp.* para la síntesis de PE en un sistema Fed-Batch, la concentración de NO_3 disponible en el medio de cultivos se mantuvo alta para la mayoría de experimentos; teniendo como límites de concentración 0.4 g/L y 5.4 g/L respectivamente, por lo tanto, es posible que la célula aprovechara a necesidad el NO_3 presente evitando así un estrés nutricional.

De acuerdo con investigaciones recientes el N es uno de los principales sustratos limitantes para la producción y acumulación de ficobiliproteínas en cianobacterias (Ali, El-fayoumy, Rasmy, Soliman, & Abdullah, 2021; Minhas, Hodgson, Barrow, & Adholeya, 2016; Rivera, Niño, & Gelves, 2021; Song, Liu, Kong, Ren, & Ren, 2022). Sin embargo, estudios resaltan la importancia de otros factores bióticos como la concentración de sales en el medio de cultivo, la solución de metales y el pH, al igual que factores abióticos como la intensidad de la luz, la longitud de onda y el ciclo luz-oscuridad al que se expone el microorganismo (Derbel *et al.*, 2022; Ghedifa *et al.*, 2021; Klepacz-Smółka *et al.*, 2020; Mishra *et al.*, 2012; Zuurro *et al.*, 2021). Estas variables pueden generar un balance energético positivo promoviendo una mayor síntesis de proteínas pigmentadas. En el caso de algunas microalgas y cianobacterias se necesitan intensidades de luz bajas, como se ha demostrado en ciertas cepas de *Porphyridium spp* que acumulan más PE cuando se cultivan con luz verde, en este estado los microorganismos están sobreexcitando el PSII por lo que en el estado de transición II, se produce una alta transferencia de energía del ficobilisoma/PSII al PSI, lo que permite que la luz verde sea captada por la PE para impulsar la fotoquímica tanto del PSI como del PSII. Además, el ciclo luz-oscuridad estimula la síntesis de estas proteínas y así mismo la acumulación de compuestos necesarios para la supervivencia del microorganismo (George N Hotos, 2021; George N. Hotos & Antoniadis, 2022; Hsieh-Lo, Castillo, Ochoa-Becerra, & Mojica, 2019; Mata *et al.*, 2020).

5. CONCLUSIONES

En conclusión, los resultados obtenidos bajo las condiciones estudiadas en el sistema Fed-batch muestran que para la producción de biomasa y acumulación intracelular de PE el modo de operación no es la mejor opción, ya que no aumenta la concentración de dichos compuestos en comparación con los niveles de producción obtenidos por el modo batch. Sin embargo, el modo de operación por lote alimentado mostró un aumento significativo en el radio de pureza de la ficobiliproteína de interés, por lo tanto, en futuras investigaciones se debe tomar como punto de partida la inferencia de otros factores abióticos con el fin de mejorar la concentración de PE manteniendo el grado de pureza alcanzado.

6. RECOMENDACIONES

Finalmente, como recomendaciones se deberían estudiar la capacidad de *Potamosiphon sp.* UFPS003 para fijar nitrógeno. Potencialmente, para futuros estudios se recomienda tomar como punto de partida la inferencia de otros factores abióticos con el fin de mejorar la concentración de PE manteniendo el grado de pureza alcanzado.

7. REFERENCIAS

- Andersen, R. A. (Ed.). (2005). *Algal culturing techniques*. Elsevier.
- Adjali, A., Clarot, I., Chen, Z., Marchioni, E., & Boudier, A. (2021). Physicochemical degradation of phycocyanin and means to improve its stability: A short review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*.
- Ali, H. E. A., El-fayoumy, E. A., Rasmy, W. E., Soliman, R. M., & Abdullah, M. A. (2021). Two-stage cultivation of *Chlorella vulgaris* using light and salt stress conditions for simultaneous production of lipid, carotenoids, and antioxidants. *Journal of Applied Phycology*, 33(1), 227-239.
- Almuhtaram, H., Kibuye, F. A., Ajjampur, S., Glover, C. M., Hofmann, R., Gaget, V., . . . Zamyadi, A. (2021). State of knowledge on early warning tools for cyanobacteria detection. *Ecological Indicators*, 133, 108442.
- Barajas-Solano, A. F. (2022). Optimization of Phycobiliprotein Solubilization from a Thermotolerant *Oscillatoria* sp. *Processes*, 10(5), 836.
- Basheva, D., Moten, D., Stoyanov, P., Belkinova, D., Mladenov, R., & Teneva, I. (2018). Content of phycoerythrin, phycocyanin, allophycocyanin and phycoerythrocyanin in some cyanobacterial strains: Applications. *Engineering in Life Sciences*, 18(11), 861-866.
- Bennett, A., & Bogorad, L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *The Journal of cell biology*, 58(2), 419-435.
- Carpine, R., & Sieber, S. (2021). Antibacterial and antiviral metabolites from cyanobacteria: their application and their impact on human health. *Current Research in Biotechnology*, 3, 65-81.
- Çelekli, A., Topyürek, A., Markou, G., & Bozkurt, H. (2016). A multivariate approach to evaluate biomass production, biochemical composition and stress compounds of *spirulina platensis* cultivated in wastewater. *Applied biochemistry and biotechnology*, 180(4), 728-739.
- da Fontoura Prates, D., Radmann, E. M., Duarte, J. H., de Morais, M. G., & Costa, J. A. V. (2018). *Spirulina* cultivated under different light emitting diodes: Enhanced cell growth and phycocyanin production. *Bioresource Technology*, 256, 38-43.
- Demirel, Z., & Sukatar, A. (2019). Purification of phycocyanin from isolated and identified hot spring cyanobacteria.
- Derbel, H., Elleuch, J., Tounsi, L., Nicolo, M. S., Rizzo, M. G., Michaud, P., . . . Abdelkafi, S. (2022). Improvement of biomass and phycoerythrin production by a strain of *Rhodomonas* sp. isolated from the Tunisian coast of Sidi Mansour. *Biomolecules*, 12(7), 885.
- Farrokh, P., Sheikhpour, M., Kasaeian, A., Asadi, H., & Bavandi, R. (2019). Cyanobacteria as an eco-friendly resource for biofuel production: a critical review. *Biotechnology Progress*, 35(5), e2835.
- Ferraro, G., Imbimbo, P., Marseglia, A., Lucignano, R., Monti, D. M., & Merlino, A. (2020). X-ray structure of C-phycocyanin from *Galdieria phlegrea*: determinants of thermostability and comparison with a C-phycocyanin in the entire phycobilisome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1861(9), 148236.
- GENG, R., WEN, Q., WANG, Y., YANG, P., DAI, G., LI, R., & YU, G. (2021). A novel filamentous cyanobacterium *Microseira minor* sp. nov. (Oscillatoriaceae, Cyanobacteria) from the Ganfu Channel, Jiangxi, China. *Phytotaxa*, 524(3), 178-190.
- Ghedifa, A. B., Vega, J., Korbee, N., Mensi, F., Figueroa, F. L., & Sadok, S. (2021). Effects of light quality on the photosynthetic activity and biochemical composition of *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 33(5), 3413-3425.

- Ho, S.-H., Liao, J.-F., Chen, C.-Y., & Chang, J.-S. (2018). Combining light strategies with recycled medium to enhance the economic feasibility of phycocyanin production with *Spirulina platensis*. *Bioresource Technology*, 247, 669-675.
- Hotos, G. N. (2021). Culture growth of the cyanobacterium *Phormidium* sp. in various salinity and light regimes and their influence on its phycocyanin and other pigments content. *Journal of Marine Science and Engineering*, 9(8), 798.
- Hotos, G. N., & Antoniadis, T. I. (2022). The Effect of Colored and White Light on Growth and Phycobiliproteins, Chlorophyll and Carotenoids Content of the Marine Cyanobacteria *Phormidium* sp. and *Cyanothece* sp. in Batch Cultures. *Life*, 12(6), 837. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2075-1729/12/6/837>
- 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.
- Jaeschke, D. P., Teixeira, I. R., Marczak, L. D. F., & Mercali, G. D. (2021). Phycocyanin from *Spirulina*: A review of extraction methods and stability. *Food Research International*, 143, 110314.
- Jaiswal, D., Sahasrabudde, D., & Wangikar, P. P. (2022). Cyanobacteria as cell factories: the roles of host and pathway engineering and translational research. *Current Opinion in Biotechnology*, 73, 314-322.
- Jiang, L., Wang, Y., Yin, Q., Liu, G., Liu, H., Huang, Y., & Li, B. (2017). Phycocyanin: a potential drug for cancer treatment. *Journal of Cancer*, 8(17), 3416.
- Kaewdam, S., Jaturonglumlert, S., Varith, J., Nitatwichit, C., & Narkprasom, K. (2019). KINETIC MODELS FOR PHYCOCYANIN PRODUCTION BY FED BATCH CULTIVATION OF THE *SPIRULINA PLATENSIS*. *GEOMATE Journal*, 17(61), 187-194.
- Kannaujiya, V. K., Kumar, D., Singh, V., & Sinha, R. P. (2021). Advances in phycobiliproteins research: innovations and commercialization. In *Natural Bioactive Compounds* (pp. 57-81): Elsevier.
- Klepacz-Smółka, A., Pietrzyk, D., Szelağ, R., Głuszczyk, P., Daroch, M., Tang, J., & Ledakowicz, S. (2020). Effect of light colour and photoperiod on biomass growth and phycocyanin production by *Synechococcus* PCC 6715. *Bioresource Technology*, 313, 123700.
- Kramer, M. (2005). *R2 statistics for mixed models*. Paper presented at the Proceedings of the conference on applied statistics in agriculture.
- Kumar, D., Nehra, P., Saxena, S., & Dhar, D. W. (2019). Quantification and purification of C-phycocyanin from cyanobacterial strains *Anabaena* and *Phormidium*.
- Leal Medina, G. I., Abril Bonett, J. E., Martínez Gélvez, S. J., Muñoz Peñaloza, Y. A., Peñaranda Lizarazo, E. M., & Urbina Suárez, N. A. (2017). Producción de ácidos grasos poliinsaturados a partir de biomasa microalgal en un cultivo heterotrófico. *Revista Ion*, 30(1), 91-103.
- Lee, J., Lee, S. Y., Park, S., & Middelberg, A. P. (1999). Control of fed-batch fermentations. *Biotechnology advances*, 17(1), 29-48.
- Lee, N. K., Oh, H.-M., Kim, H.-S., & Ahn, C.-Y. (2017). Higher production of C-phycocyanin by nitrogen-free (diazotrophic) cultivation of *Nostoc* sp. NK and simplified extraction by dark-cold shock. *Bioresource Technology*, 227, 164-170.
- Lee, S.-H., Lee, J. E., Kim, Y., & Lee, S.-Y. (2016). The production of high purity phycocyanin by *Spirulina platensis* using light-emitting diodes based two-stage cultivation. *Applied biochemistry and biotechnology*, 178(2), 382-395.

- Li, Y., Zhang, Z., Paciulli, M., & Abbaspourrad, A. (2020). Extraction of phycocyanin—A natural blue colorant from dried spirulina biomass: Influence of processing parameters and extraction techniques. *Journal of Food Science*, 85(3), 727-735.
- Liu, Y., Zhou, Y., Lv, W., Huang, H., Zhang, G., Tu, M., & Huang, L. (2021). Design and experiment of hydraulic scouring system of wide-width lotus root digging machine. *Agriculture*, 11(11), 1110.
- Lobo de León, J. A. (2018). *Diseño y optimización de un medio de cultivo para el crecimiento de Arthrospira platensis en condiciones de laboratorio*. Universidad del Valle de Guatemala,
- Maltsev, Y., Maltseva, K., Kulikovskiy, M., & Maltseva, S. (2021). Influence of Light Conditions on Microalgae Growth and Content of Lipids, Carotenoids, and Fatty Acid Composition. *Biology*, 10(10), 1060.
- Manirafasha, E., Murwanashyaka, T., Ndikubwimana, T., Rashid Ahmed, N., Liu, J., Lu, Y., . . . Jing, K. (2018). Enhancement of cell growth and phycocyanin production in *Arthrospira (Spirulina) platensis* by metabolic stress and nitrate fed-batch. *Bioresource Technology*, 255, 293-301. doi:<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. *Biochemical Engineering Journal*, 109, 282-296. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.01.025>
- Marx, A., & Adir, N. (2013). Allophycocyanin and phycocyanin crystal structures reveal facets of phycobilisome assembly. *Biochim Biophys Acta*, 1827(3), 311-318. doi:10.1016/j.bbabi.2012.11.006
- Mata, S. N., de Souza Santos, T., Cardoso, L. G., Andrade, B. B., Duarte, J. H., Costa, J. A. V., . . . Druzian, J. I. (2020). *Spirulina* sp. LEB 18 cultivation in a raceway-type bioreactor using wastewater from desalination process: Production of carbohydrate-rich biomass. *Bioresource Technology*, 311, 123495.
- McGregor, G. B., & Sendall, B. C. (2019). *Potamosiphon australiensis* gen. nov., sp nov.(Oscillatoriales), a new filamentous cyanobacterium from subtropical north-eastern Australia. *Phytotaxa*, 387(2), 77–93-77–93.
- Méndez Rodríguez, L. (2018). Optimización de la digestión anaerobia de microorganismos fotosintéticos: pretratamiento térmico y uso de cianobacterias.
- Minchev, I., Petkova, N., & Milkova-Tomova, I. (2020). Ultrasound-Assisted Extraction of Chlorophylls and Phycocyanin from *Spirulina platensis*.
- Minhas, A. K., Hodgson, P., Barrow, C. J., & Adholeya, A. (2016). A Review on the Assessment of Stress Conditions for Simultaneous Production of Microalgal Lipids and Carotenoids. *Front Microbiol*, 7, 546. doi:10.3389/fmicb.2016.00546
- Minihane, B., & Brown, D. (1986). Fed-batch culture technology. *Biotechnology advances*, 4(2), 207-218.
- Mishra, S. K., Shrivastav, A., Maurya, R. R., Patidar, S. K., Haldar, S., & Mishra, S. (2012). Effect of light quality on the C-phycoerythrin production in marine cyanobacteria *Pseudanabaena* sp. isolated from Gujarat coast, India. *Protein Expression and Purification*, 81(1), 5-10.
- Mogollón Londoño, S. O. (2019). Potencial biotecnológico de cianobacterias termotolerantes para la producción de ficocianina.
- Mosquera Torrado, K. S. (2017). Evaluación de la producción del pigmento azul ficocianina de la microalga *Galdieria* sp. cepa USBA-GBX-832.
- Nowruzzi, B., Sarvari, G., & Blanco, S. (2020). The cosmetic application of cyanobacterial secondary metabolites. *Algal research*, 49, 101959.

- Patel, A., Matsakas, L., Rova, U., & Christakopoulos, P. (2019). A perspective on biotechnological applications of thermophilic microalgae and cyanobacteria. *Bioresour Technol*, 278, 424-434. doi:10.1016/j.biortech.2019.01.063
- 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.
- Puzorjov, A., Dunn, K. E., & McCormick, A. J. (2021). Production of thermostable phycocyanin in a mesophilic cyanobacterium. *Metabolic engineering communications*, 13, e00175.
- Puzorjov, A., & McCormick, A. J. (2020). Phycobiliproteins from extreme environments and their potential applications. *J Exp Bot*, 71(13), 3827-3842. doi:10.1093/jxb/eraa139
- Ramos, B. R. (2020). *Identificación de cianobacterias y optimización de su cultivo para restaurar la biocostra en suelos semiáridos degradados* (Vol. 367): Universidad Almería.
- Rastogi, R. P., & Sinha, R. P. (2009). Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. *Biotechnology advances*, 27(4), 521-539.
- Rivera, C., Niño, L., & Gelves, G. (2021). Modeling of phycocyanin production from *Spirulina platensis* using different light-emitting diodes. *South African Journal of Chemical Engineering*, 37, 167-178. doi:<https://doi.org/10.1016/j.sajce.2021.05.005>
- 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.
- Samardzic, K., Steele, J. R., Violi, J. P., Colville, A., Mitrovic, S. M., & Rodgers, K. J. (2021). Toxicity and bioaccumulation of two non-protein amino acids synthesised by cyanobacteria, β -N-Methylamino-L-alanine (BMAA) and 2, 4-diaminobutyric acid (DAB), on a crop plant. *Ecotoxicology and environmental safety*, 208, 111515.
- Sánchez-Baracaldo, P., Bianchini, G., Wilson, J. D., & Knoll, A. H. (2021). Cyanobacteria and biogeochemical cycles through Earth history. *Trends in Microbiology*.
- Schipper, K., Fortunati, F., Oostlander, P. C., Al Muraikhi, M., Al Jabri, H. M. S., Wijffels, R. H., & Barbosa, M. J. (2020). Production of phycocyanin by *Leptolyngbya* sp. in desert environments. *Algal research*, 47, 101875.
- Silos Vega, C. A. (2021). Efecto del medio de cultivo sobre el crecimiento y valor nutricional de *Arthrospira maxima*. *REPOSITORIO NACIONAL CONACYT*.
- Sonani, R. R., Roszak, A. W., Liu, H., Gross, M. L., Blankenship, R. E., Madamwar, D., & Cogdell, R. J. (2020). Revisiting high-resolution crystal structure of *Phormidium rubidum* phycocyanin. *Photosynthesis research*, 144(3), 349-360.
- Song, X., Liu, B.-F., Kong, F., Ren, N.-Q., & Ren, H.-Y. (2022). Overview on stress-induced strategies for enhanced microalgae lipid production: Application, mechanisms and challenges. *Resources, Conservation and Recycling*, 183, 106355.
- Sui, S.-F. (2021). Structure of phycobilisomes. *Annual review of biophysics*, 50, 53-72.
- Tang, W., Wang, S., Fonseca-Batista, D., Dehairs, F., Gifford, S., Gonzalez, A. G., . . . Cassar, N. (2019). Revisiting the distribution of oceanic N₂ fixation and estimating diazotrophic contribution to marine production. *Nature communications*, 10(1), 1-10.
- Temraleeva, A., Dronova, S., Moskalenko, S., & Didovich, S. (2016). Modern methods for isolation, purification, and cultivation of soil cyanobacteria. *Microbiology*, 85(4), 389-399.
- Tolosa Martínez, G. C. (2019). Producción de ficocianina a partir de *Spirulina maxima* en biorreactor PBR tubular para la industria de alimentos.

- Torres, T., & Camacho Kurmen, J. E. (2022). Modelos matemáticos y parámetros cinéticos relacionados con la producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis*. *Revista Mutis*, 12(1). doi:10.21789/22561498.1743
- Vassilev, S. V., Baxter, D., Andersen, L. K., Vassileva, C. G., & Morgan, T. J. (2012). An overview of the organic and inorganic phase composition of biomass. *Fuel*, 94, 1-33. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.09.030>
- Wang, S., Zhu, Y., Yang, Y., Li, J., & Hoffmann, M. R. (2020). Electrochemical cell lysis of gram-positive and gram-negative bacteria: DNA extraction from environmental water samples. *Electrochim Acta*, 338, 135864. doi:10.1016/j.electacta.2020.135864
- 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. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.073>
- Zinicovscaia, I., Safonov, A., Zelenina, D., Ershova, Y., & Boldyrev, K. (2020). Evaluation of biosorption and bioaccumulation capacity of cyanobacteria *Arthrospira* (*Spirulina*) *Platensis* for radionuclides. *Algal research*, 51, 102075.
- Zuorro, A., Leal-Jerez, A. G., Morales-Rivas, L. K., Mogollón-Londoño, S. O., Sanchez-Galvis, E. M., García-Martínez, J. B., & Barajas-Solano, A. F. (2021). Enhancement of Phycobiliprotein Accumulation in Thermotolerant *Oscillatoria* sp. through Media Optimization. *ACS omega*, 6(16), 10527-10536.