



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA, BIOTECNOLOGÍA
Y MATERIALES

CULTIVO DE HONGOS MARINOS A PARTIR DE RESIDUOS DE LA INDUSTRIA ALGAL RICA EN ALGINATO

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERA CIVIL QUÍMICA E INGENIERA CIVIL EN
BIOTECNOLOGÍA

ROSA DE LOS ANGELES MUÑOZ MUÑOZ

PROFESOR GUÍA:

MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:

ORIANA SALAZAR AGUIRRE

JAVIER GIMPEL HENRIQUEZ

Este proyecto ha sido financiado por:

Centro de Biotecnología y Bioingeniería, CEBIB

Fondo Nacional de Desarrollo Científico y
Tecnológico, Fondecyt 1180794

SANTIAGO DE CHILE

2018

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR AL TITULO DE INGENIERA CIVIL QUÍMICA E INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

POR: Rosa de los Angeles Muñoz Muñoz

FECHA: 05/11/2018

PROFESOR GUIA: María Elena Lienqueo

CULTIVO DE HONGOS MARINOS A PARTIR DE RESIDUOS DE LA INDUSTRIA ALGAL RICA EN ALGINATO

Debido a las extensas costas de Chile, se hace necesario aprovechar por completo el cultivo de algas presente en ellas, es por esto que, en el marco del desarrollo de una biorrefinería, se hace necesario crea la mayor cantidad de productos a partir de esta biomasa. En este contexto surge una creciente industria de las algas pardas, llamadas así por su color, con su consiguiente producción de una creciente cantidad de residuos. Residuos ricos en alginato, azúcar que representa alrededor del 40% de las algas pardas, que se pueden utilizar como sustrato de una variedad de microorganismos.

El hongo *Dendryphiella salina* produce una variedad de enzimas, entre las cuales están celulasas y alginato liasas. En estudios anteriores de la Universidad de Chile se comprobó la capacidad de *D. salina* de crecer usando como sustrato *Macrocystis pyrifera* y un residuo de la industrial algal de algas pardas, a pesar de tener análisis proximales similares ambos sustratos, se encontró una diferencia significativa en la capacidad de asimilación de este hongo. De ahí la necesidad de estudiar un pretratamiento a aplicar al residuo para obtener rendimientos similares a los obtenidos con el alga por sí sola.

En primer lugar, se realizó un estudio de la asimilación de alginato y carboximetil celulosa (CMC) obteniéndose como mejores días de cultivo el día 10 con 1,25 [g/L] y el día 8 con 1,14 [g/L] de concentración de biomasa usando cada fuente de carbono, alginato y CMC, respectivamente. Luego se realizó una selección de un pretratamiento a aplicar, entre rompimiento por ultrasonido, ultrasonido seguido de hidrólisis alcalina y ultrasonido seguido de hidrólisis enzimática. Se eligió el ultrasonido seguido de hidrólisis alcalina como mejor pretratamiento, con un aumento de la proteína total de un 59% al día 8 de cultivo. Para la determinación de proteína total se usó el método del nitrógeno Kjeldahl simplificado por la dificultad de aplicar ensayos colorimétricos, como Bradford y del ácido Bicinconínico (BCA). Este contenido de proteína proviene del medio y de *D. salina*, el objetivo final es utilizar este contenido proteico como proteína unicelular (SCP) para aplicaciones alimenticias. Además, se realiza una exploración comercial de los productos de alto valor comercial que se pueden generar a partir de este residuo (proteína unicelular, proteínas hidrofobinas y alginato liasa) en comparación con el costo que tiene disponer de este desecho para la empresa. Se concluye que es factible obtener productos de alto valor comercial a partir del cultivo de un hongo filamentoso usando como sustrato un residuo industrial.

A mi madre,

Que con su esfuerzo y dedicación me supo formar como persona, a pesar de las dificultades.

A mi familia,

Que me han sabido entender, cobijar y entregar todo el afecto posible.

Agradecimientos

Quiero agradecer a las profesoras María Elena Lienqueo y Oriana Salazar por su constante ayuda en el desarrollo de esta tesis, tanto la parte experimental como escrita. A Catalina Landeta por entregarme las directrices a seguir en los primeros meses y a Stephanie Brain por ayudarme en el final, cuando no estaba obteniendo los resultados necesarios. A la profesora Ana Lucía Prieto y a Viviana Lorca por darme todas las facilidades para usar los equipos necesarios en el laboratorio de Calidad de Aguas del Departamento de Ingeniería Civil, teniendo siempre la mejor disposición y preocupación por los detalles e inconvenientes que surgieron.

Al centro de Biotecnología y Bioingeniería y al FONDECYT “Development of a novel method for utilizing waste algal biomass to grow methionine-enriched *Trichoderma reesei* as high-value protein for feeds” por financiar esta investigación y permitirme desarrollar este trabajo.

A mi madre y a mi familia, tíos, primos y abuelos por formarme, apoyarme y entregarme todo su cariño y comprensión durante estos 25 años.

A mis amigas María Paulina, Victoria y María Paz, estos últimos 4 años no hubieran sido lo mismo sin ustedes, gracias por la comprensión y apañe en todo.

A Juan y Javiera, nuestras interminables conversaciones, idas al gimnasio, tecitos de señora y carrete. Sin ustedes este año hubiera sido mucho más difícil.

A toda la familia del centro en general, gracias por haberme acogido este año, me sentí una más y aprendí a conocer a maravillosas personas.

A mis tres selecciones de facultad, conocí a personas maravillosas durante estos 7 años que me enseñaron a ser una mejor deportista, pero por sobre todo mejor persona. A mis compañeras de futbolito con quienes logramos cosas históricas para esta facultad a base de puro esfuerzo de años, las llevo a cada una en mi corazón y espero seguir jugando con ustedes hasta que las rodillas no den más. A mis compañeras de basquet, fueron varios idas y vueltas a través de los años, pero me llevó en mi corazón la familia del basquet que son y los triunfos que conseguimos. A mis compañeras y compañeros de natación con quienes aprendí que un deporte individual también se puede vivir en equipo.

A mis compañeras de selecciones universitarias, a pesar de la competitividad necesaria de estas instancias conocí a personas maravillosas, acogedoras y que forman otra familia con todo el apañe y cariño.

Finalmente, quiero agradecer a todos mis profesores, tanto universitarios como de educación básica y media, y compañeros que pasaron por mi camino estudiantil, gracias a su formación, dedicación y acompañamiento durante todos estos años.

Tabla de contenido

1	Introducción	1
1.1	Antecedentes Generales	1
1.1.1	Residuos Industriales, Valorización de Residuos y su relación con una economía sustentable	1
1.1.2	Estado actual del uso de hongos en la industria	1
1.1.3	Hongos y sus aplicaciones alimenticias	2
1.1.4	Compuestos Tóxicos en SCP y sus Posibles Efectos	5
1.1.5	Industria Algal	6
1.2	Motivación	7
1.3	Objetivos	7
1.3.1	Objetivo General	7
1.3.2	Objetivos Específicos	7
2	Marco Teórico	8
2.1	Hongo <i>Dendryphiella salina</i>	8
2.2	Crecimiento de Hongos	10
2.3	Medio de Cultivo	11
2.4	Pretratamientos	12
3	Metodología	13
3.1	Metodología General	13
3.2	Materiales	13
3.2.1	Cepa de hongo <i>Dendryphiella salina</i> 100654	13
3.2.2	Insumos y Reactivos	14
3.2.3	Equipos	14
3.3	Medios de Cultivo	15
3.4	Parámetros y propiedades importantes para la evaluación del proceso de crecimiento del hongo	15
3.4.1	pH	15
3.4.2	Actividad enzimática	15
3.4.3	Determinación de la biomasa	15
3.4.4	Determinación de proteínas totales	16
3.5	Pretratamiento Físico-químico	16

3.5.1	Rompimiento por Ultrasonido	16
3.5.2	Ultrasonido e Hidrólisis Termo-Alcalina	16
3.6	Pretratamiento Enzimático	17
3.6.1	Ultrasonido e Hidrólisis con alginato liasa	17
3.7	Fermentación	17
3.8	Diseño del Proceso Experimental	17
3.8.1	Fermentación en medios de cultivo líquido.....	18
3.8.2	Fermentación en medios de cultivo complejo.....	18
3.8.3	Toma de muestras.....	19
4	Resultados y Discusión.....	20
4.1	Estudio del cultivo de <i>Dendryphiella salina</i> en medio líquido	20
4.1.1	Estudio de crecimiento de biomasa, según peso seco	20
4.1.2	Comparación de diferentes fuentes de carbono	25
4.2	Estudio del cultivo de <i>Dendryphiella salina</i> en medio complejo	26
4.2.1	Resultados de pretratamiento seleccionado	27
4.3	Exploración del potencial comercial de los productos generados	29
5	Conclusiones	33
6	Recomendaciones y Proyecciones.....	35
7	Bibliografía.....	36
8	Anexos.....	43
	Anexo A: Biosurfactantes.....	43
	Proteínas Hidrofobinas	44
	Anexo B: Alginato Liasa	45
	Anexo C: Medios de Cultivo	46
	Medio Sólido	46
	Medio Líquido	47
	Medio Complejo.....	47
	Anexo D: Metodología de Determinación de Peso Seco	48
	Anexo E: Metodologías de Determinación de Proteína Total.....	48
	Método del Ácido Bicinconínico (BCA)	48
	Método de Bradford [49]	49
	Método de Nitrógeno Total Kjeldahl Simplificado (Hach).....	49
	Anexo F: Curva de Calibración de Proteína Albumina de Suero Bovino (BSA)	50

Anexo G: Metodología de Determinación de Azúcares Reductores según el método de Miller (DNS).....	50
Anexo H: Curva de Calibración de Glucosa.....	51
Anexo I: Buffer de Degradación AL.....	51
Anexo J: Base de Cálculo	52
Cálculo de Cantidad de Residuo en Medio Complejo.....	52
Calculo de proteína total a partir de nitrógeno total Kjeldahl (NTK)	52
Calculo de proteína total presente en el medio complejo	53
Calculo de escalamiento y proyección económica	54
Calculo de Rendimientos de Fuentes de Carbono	54

Índice de Tablas

Tabla 1: Proteína celular producida a partir de hongo para aplicaciones alimenticias y biotecnológicas. Fuente: Adaptado desde Anupama y Ravindra (2000); Sankaran et. al. (2010); Thrane (2007).	2
Tabla 2: Composición de proteína celular derivada de hongo [36]. Fuente: Anupama and Ravindra (2000), mismo catálogo de hongos presentados en la Tabla 1.....	4
Tabla 3: Comparación de varios parámetros para la producción de SCP de algas, hongos y bacterias. Fuente: Singh, 1998; Anupama y Ravindra, 2000.....	5
Tabla 4: Comparación del análisis proximal entre <i>Macrocystis pyrifera</i> y el residuo a utilizar (3).....	6
Tabla 5: Comparación de la composición (en concentración) que presentaría un medio de cultivo usando a <i>Macrocystis pyrifera</i> y el residuo como fuente de carbono.	7
Tabla 6: Se muestran los valores de los parámetros más importantes de cultivo en D. salina, según indicaciones entregadas por el proveedor.....	13
Tabla 7: Insumos y reactivos utilizados.....	14
Tabla 8: Equipo utilizados durante el desarrollo de las experiencias de laboratorio.	14
Tabla 9: Rendimientos de biomasa según peso seco con diferentes fuentes de carbono al día 10 de cultivo.	25
Tabla 10: Variación de ganancia para la producción de proteína unicelular, según el valor de mercado de la harina de soya y harina de pescado en los últimos 2 años.....	31
Tabla 11: Precio de proteínas de interés producidas por D. salina y de alto valor comercial. Fuente: Sigma-aldrich.	31
Tabla 12: Ventajas de los Bs comparativamente con los surfactantes de origen químico.	43
Tabla 13: Alginato liasas de diferentes fuentes y sus sustratos específicos	46
Tabla 14: Composición medio sólido.....	46
Tabla 15: Composición medio líquido.	47
Tabla 16: Composición medio complejo.....	47
Tabla 17: Compuestos para preparar reactivo A, en el método del Ácido Bicinconínico (BCA).	48
Tabla 18: Compuestos para preparar reactivo B, en el método del ácido bicinconínico (BCA).	49
Tabla 19: Curva de calibración proteína BSA.....	50
Tabla 20: Curva de calibración Glucosa.....	51
Tabla 21: Receta Buffer de Degradación Oligoalginato Liasa (OAL).	51
Tabla 22: Análisis proximal del residuo a trabajar.	52
Tabla 23: Composición de fuente de nitrógeno (YNB) agregado al medio.....	53
Tabla 24: Aporte de nitrógeno de los compuestos que son parte del medio complejo...	53

Índice de Ilustraciones

Figura 1: Dendryphiella salina creciendo en medio sólido. Lente 10X. Fuente: Elaboración propia.	9
Figura 2: Dendryphiella salina creciendo en medio líquido. Lente 100X. Fuente: Elaboración propia.	9
Figura 3: Gráfico de concentración de proteína de Dendryphiella salina en medio de cultivo compuesto por <i>Macrocystis pyrifera</i> y residuo A. Fuente: Landeta, 2017.	10
Figura 4: Crecimiento típico que presentan los hongos filamentosos. <i>Fusarium solani</i> en un medio líquido aireado. Fuente: Moore-Landecker (1990).	11
Figura 5: Metodología general de cultivo de D. salina.	13
Figura 6: Diseño Experimental.	18
Figura 7: Crecimiento de biomasa en medio líquido del hongo Dendryphiella salina, usando como fuente de carbono alginato y carboximetilcelulosa (CMC), determinación mediante peso seco.	21
Figura 8: Variación de pH en el crecimiento de biomasa en medio líquido del hongo Dendryphiella salina, usando como fuente de carbono alginato y CMC.	21
Figura 9: Variación de azúcares reductores en crecimiento en medio de cultivo líquido del hongo Dendryphiella salina, usando como fuente de carbono alginato y CMC.	22
Figura 10: Determinación de proteína total usando el método del ácido bicinonínico en medio de cultivo líquido del hongo Dendryphiella salina, usando como fuente de carbono alginato y carboximetil celulosa.	23
Figura 11: D. salina creciendo en medio líquido, alginato 0,2%. Día 12 de cultivo. Lente 100X.	24
Figura 12: D. salina creciendo en medio líquido, alginato 0,2%. Día 12 de cultivo. Lente 40X.	24
Figura 13: Crecimiento de biomasa en medio líquido del hongo Dendryphiella salina, usando como fuente de carbono los compuestos tampón del medio, alginato y carboximetilcelulosa (CMC).	26
Figura 14: Proteína total en cultivos de Dendryphiella salina suministrados con residuos pretratados con dos condiciones. La proteína total se determinó mediante nitrógeno Kjeldahl.	27
Figura 15: Determinación de proteína total mediante nitrógeno Kjeldahl al cultivo de D. salina con el proceso de pretratamiento de ultrasonido seguido de hidrólisis alcalina.	28
Figura 16: Estado del cultivo de Dendryphiella salina en medio complejo con pretratamiento de ultrasonido seguido de hidrólisis alcalina, al día 0. Fuente: Elaboración propia.	29
Figura 17: Estado del cultivo de Dendryphiella salina en medio complejo con pretratamiento de ultrasonido seguido de hidrólisis alcalina, al día 8. Fuente: Elaboración propia.	30

Figura 18: Evolución de precios (clp / tonelada métrica) de la harina de soya y la harina de pescado durante la última década. Adaptado de: New feed for pigs and poultry. Report May 2018 [55].30

Figura 19: En esta figura se muestran los procesos de desarrollo del hongo en que están involucradas las hidrofobinas. A , B muestra como la proteína disminuye la tensión superficial permitiendo a la hifa penetrar la interface medio-aire. C, auto ensamblaje de las hidrofobinas a la superficie de la pared celular permiten hifas aéreas. D, cuerpos fructíferos y la capa de aire en la cavidad de los cuerpos fructíferos. E, y las esporas. F, hidrofobinas y el resultado de cómo es su ensamblaje en la hifa a superficies hidrofóbicas. Fuente: Wösten et. al., 201545

1 Introducción

1.1 Antecedentes Generales

1.1.1 Residuos Industriales, Valorización de Residuos y su relación con una economía sustentable.

La industria chilena recién comienza a aplicar medidas con relación a disminuir la generación de residuos y/o incorporarlos como materia prima en otros procesos, esto último constituye lo que se denomina valorización de residuos, obteniéndose finalmente productos de alto valor comercial [1].

Al aplicarse estos conceptos a industrias que trabajan con biomasa, como es la industria de las macroalgas, se obtienen residuos ricos en ciertos nutrientes que pueden ser aprovechados siguiendo la idea de una biorrefinería [2].

Todo esto se enmarca en la búsqueda de la disminución de la cantidad de residuos emitidos por las industrias que utilizan biomasa y el máximo aprovechamiento de estos recursos, que siempre compiten con la alimentación humana, logrando una bioeconomía sustentable [3].

1.1.2 Estado actual del uso de hongos en la industria

Para disminuir la cantidad de residuos producidos por la industria actualmente, es necesario incorporar organismos que sean capaz de degradar azúcares de difícil composición, como son xilanos, alginatos, lignocelulosa, etc. En este contexto surgen los hongos filamentosos como una alternativa real a este problema.

Los hongos filamentosos del grupo de *Zigomicetos* y *Ascomicetos*, han hecho una gran contribución en una diversidad de sectores industriales. Los *Ascomicetos* han sido ampliamente estudiados (*Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus spp.*), ya que están involucrados en la producción de muchos productos con valor agregado, incluyendo enzimas como amilasas, proteasas, lipasas, lactasas y catalasas. También se pueden usar para la producción de celulasa y xilanas donde es usada *Trichoderma spp* [4].

En las últimas investigaciones, hay un creciente interés en usar otros sustratos más económicos, cómo puede ser basura industrial, obtenidos a partir de residuos industriales y lignocelulósicos. En este ámbito, *Ascomicetos* pueden jugar un rol crucial como biocatalizador en estos residuos de las biorrefinerías aprovechando su habilidad para producir enzimas que pueden romper estas estructuras recalcitrantes. A través del uso de *Ascomicetos* filamentosos, su biomasa, usualmente rica en proteínas y lípidos, puede representar otro producto de valor agregado en la biorrefinería [4].

- (1) Residuo industrial es todo aquel residuo sólido o líquido, o combinación de éstos, provenientes de los procesos industriales y que por sus características físicas, químicas o microbiológicas no pueden asimilarse a los residuos sólidos domésticos [78].
- (2) Biorrefinería es una misma instalación que consiste en la integración de distintos procesos que pueden ser físicos, químicos, termoquímicos o biotecnológicos para obtener nuevos productos finales.

1.1.3 Hongos y sus aplicaciones alimenticias

La biomasa fúngica tiene un contenido de proteína que va entre un 30 a 70% (Tabla 2), por lo que uno de los propósitos del cultivo de este tipo de microorganismos ha sido para producir proteína celular (en inglés: single cell protein (SCP)) para aplicaciones alimenticias. En la literatura se puede encontrar evidencia que sugiere el uso de numerosas especies de hongos, incluidos los de tipo filamentoso y las levaduras para la producción de proteína celular en aplicaciones alimenticias (Tabla 1).

Tabla 1: Proteína celular producida a partir de hongo para aplicaciones alimenticias y biotecnológicas.

Fuente: Adaptado desde Anupama y Ravindra (2000); Sankaran et. al. (2010); Thrane (2007).

Especie de Hongo	Sustrato	Referencia
<i>Actinomucor elegans</i>	Residuos de remolacha	[5]
<i>Aspergillus awamori</i>	Residuos de destilería de manzana	[6]
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Mandioca	[7]
<i>Aspergillus niger</i>	Residuos de almidón provenientes de molienda de trigo, residuos de la industria de papas fritas, mandioca (harina), elote, tallo de maíz y algodón.	[8] [9] [10] [5] [11] [12] [7]
<i>Aspergillus oryzae</i>	Residuos del procesamiento de almidón de yuca.	[5] [13] [14]
<i>Candida lipolytica</i>	Glucosa, fracción de parafina de petróleo crudo, n-alcanos C:7-C:17	[15]
<i>Candida tropicalis</i>	Glucosa, fracción de parafina de petróleo crudo, n-alcanos C:7-C:17, residuos del licor de sulfito.	[10] [15] [16]
<i>Candida utilis</i>	Pulpa de manzana	[17]
<i>Chaetomium cellulolyticum</i>	Residuos celulósicos	[18]
<i>Chaetomium globosum</i>	Residuos de remolacha	[5]
<i>Chrysonilia sitophilia</i>	Lignina	[19]
<i>Fusarium graminearum</i>	Hidrolizados de almidón	[18]
<i>Fusarium moniliforme</i>	Carbohidrato (extracto acuoso de algarroba)	[10] [20]
<i>Fusarium oxysporum</i>	Almidón de mandioca	[21]
<i>Fusarium venenatum</i>	Carbohidrato (glucosa)	[22] [23]
<i>Geotrichum candidum</i>	Extracto de piel de naranja	[24] [25]
<i>Paecilomyces variolii</i>	Licor de sulfito	[18]
<i>Penicillium cyclopium</i>	Suero	[26]
<i>Pestalotiopsis westerdijkii</i>	Residuos de remolacha	[5]
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Vinaza	[27]
<i>Rhizopus oligosporus</i>	Almidón de mandioca, residuos de comida procesada.	[21] [28]
<i>Saccharomyces cereviceae</i>	Melaza, vinaza.	[18]

<i>Thielavia terrestris</i>	Azúcares de pulpa de remolacha, residuos del procesamiento de papas.	[29]
<i>Trichoerma reesei</i>	Residuos de destilería de manzana.	[6]
<i>Trichoerma viride</i>	Residuos de remolacha, paja de arroz.	[5] [30]

En la actualidad, la biomasa fúngica para consumo humano ya se está comercializando. El producto de proteína fúngica Quorn®, obtenido de las especies, *Fusarium venenatum* (formalmente conocido como *Fusarium graminearum*), está disponible en el mercado y es usado como un análogo a la carne, este contiene 45% proteína, 14% grasa y 26% de fibra (basado en el peso seco) con aminoácidos esenciales comparables a los contenidos en huevos y una asimilación de proteínas similar a la que poseen la carne y la proteína de soya ([22], [31], [32], [33]).

Por otra parte, uno de los parámetros críticos en la alimentación animal es el contenido de proteína necesario a suplementar para cada especie (peces, aves o bovinos). La proteína de soya y la harina de pescado han sido comercializados para suplementar un mayor contenido de proteína en la alimentación animal. Con la creciente demanda por productos de carne y pescado, el rápido incremento en el precio de los ingredientes de los productos usados para alimentación animal ha afectado la viabilidad económica de esta industria. Al considerar particularmente la industria acuícola, el sector con más rápido crecimiento a nivel mundial, con una tasa de crecimiento anual de 8-10% [34], esto empujaría la demanda por estos ingredientes. Se espera la mantención del crecimiento de la producción de alimento acuático global a una tasa similar (8-10%), alcanzando los 71 millones de toneladas al año 2020, siendo la mayor fuente de proteína para incorporar a la dieta harina de pescado, la cual depende en gran parte de la pesca por arrastre.

La comida para pescado es costosa (actualmente ~ \$1.395-\$1.450 por tonelada seca (US) ([35]) y continúa creciendo con un significativo aumento de su demanda. Esto resulta en un aumento del costo del alimento y en el último tiempo incrementa el costo de los productos de carne y de pescado. Por consiguiente, hay una mayor necesidad de una fuente sustentable de alimento. El uso de un suplemento proteico más económico en el alimento para pescado se hace necesario y puede ser reemplazado con la proteína celular (SCP) obtenida desde una materia prima de bajo costo o a partir de residuos, ha ganado especial atención. Entre las SCP para aplicaciones alimenticias, la proveniente de hongos es más favorable que la de origen bacteriana [36]. Por ejemplo, los hongos pueden producir aminoácidos que contiene sulfuros en su estructura, como cisteína y metionina, los cuales son frecuentemente los aminoácidos limitantes en el alimento, por el contrario, las bacterias no poseen esta habilidad. Metionina es considerado un aminoácido esencial, que no puede ser sintetizado en el cuerpo del animal y debe ser suplementado en la dieta. Sin embargo, algunas precauciones a tomar en cuenta con la SCP de hongo es que poseen micotoxinas y el alto contenido de nitrógeno no proteico.

El uso de SCP para aplicaciones alimentarias no es nuevo. Los hongos crecen rápidamente bajo condiciones óptimas de crecimiento y tienen la capacidad de usar diversos sustratos orgánicos [37]. Stevens y Gregory (1997) sugieren que el tratamiento de residuos líquidos con hongos es un proceso simple y de bajo costo para la producción

de alimentación animal. La biomasa de hongo tiene un alto contenido proteico, con el potencial para reemplazar el uso de los principales suplementos en la alimentación animal, como son la proteína de soya y la harina de pescado ([36], [37], [38]). Además, los requerimientos nutricionales dietarios por animal difieren dependiendo del tipo de animal, su etapa de crecimiento y el medioambiente en el que están.

La selección de un microorganismo para ser usado como proteína celular, dependerá de la cantidad de proteína que este tenga con relación a su biomasa, de la calidad de esta, su tasa de crecimiento y los demás parámetros presentados en la Tabla 3. Al observar el porcentaje proteico de los hongos (Tabla 2) y la posibilidad de que estos crezcan usando como sustrato, material orgánico económico (residuos), mostrando la factibilidad en el uso de estos organismos como fuente de suplemento proteico para la alimentación animal [39].

Tabla 2: Composición de proteína celular derivada de hongo [36]. Fuente: Anupama and Ravindra (2000), mismo catálogo de hongos presentados en la Tabla 1.

Parámetros	Composición porcentual (en base a peso seco)
Proteína real	30-70
Nitrógeno total (proteína + ácidos nucleicos)	35-50
Lisina	6,5-7,8
Metionina	1,5-1,8
Grasas/Lípidos	5-13
Carbohidratos	No disponible
Pigmentos y clorofila	No disponible
Ácidos Nucleicos	9,7
Sales Minerales	6,6
Aminoácidos	54
Ceniza	No disponible
Humedad	4,5-6,0
Fibra	No disponible

Tabla 3: Comparación de varios parámetros para la producción de SCP de algas, hongos y bacterias.

Fuente: Singh, 1998; Anupama y Ravindra, 2000.

Parámetro	Alga	Bacteria	Hongo (Levadura)	Hongo (Filamentoso)
Velocidad de Crecimiento	Baja	Muy Alta	Alta	Menor a bacterias y levaduras
Sustrato	Luz, dióxido de carbono o muestras inorgánicas	Un amplio rango de compuestos	Un amplio rango de compuestos, excepto dióxido de carbono	Mayormente compuestos lignocelulósicos
Rango de pH	Mayor a 11	5 - 7	5 - 7	3 – 8
Cultivo	Estanques y biorreactores	Biorreactores	Biorreactores	Biorreactores
Riesgos de Contaminación	Altos y serios	Se necesitan precauciones	Bajos	Más bajos riesgos si el pH es menor a 5
Contenido de aminoácidos con S	Bajo	Deficiente	Deficiente	Bajo
Remoción de ácidos nucleicos	-	Requiere	Requiere	Requiere
Toxinas	-	Endotoxinas de bacterias gram-negativas	-	Micotoxinas en muchas especies

1.1.4 Compuestos Tóxicos en SCP y sus Posibles Efectos

El grado con el cual SCP es extraído y purificado cuando son usados como suplemento alimenticio debe ser comparado con los estándares globales de la industria. El producto final no debe ser solo nutritivo, si no también pasar todas las pruebas de toxicidad para ser comercializable como un producto alimenticio. Además, del contenido de ácido nucleico, varias toxinas y productos no buscados se acumulan durante el crecimiento del cultivo [36].

Las toxinas, si están presentes en SCP, se consideran como un contaminante. Las toxinas son metabolitos secundarios producidos por ciertos hongos y bacterias durante su período de crecimiento. La toxicidad de las SCP debe ser determinada antes de su comercialización. Cuando se usan como suplemento proteico para alimentación animal los niveles de toxicidad permitidos son generalmente más altos que cuando son usado para consumo humano [36].

1.1.5 Industria Algal

Debido a la escasez del recurso suelo en los últimos años se ha visto el cultivo de macroalgas como una fuente alternativa de materia prima para las industrias de los biocombustibles y de la alimentación animal, sin embargo, actualmente es la industria de los espesantes (alginato, agar y carragenina) la que se lleva la mayor extracción de algas marinas a nivel mundial. Al año 2014 la producción de la industria algal alcanzó 28,5 millones de toneladas, con una tasa de crecimiento de 6,6% anual [40].

Durante los últimos años, más del 90% de la biomasa de alginofitas se ha extraído en Chile. Con una producción de alginatos que no alcanza a cubrir las demandas internas de los países sudamericanos. Al año 2014 la producción de la industria algal en Chile alcanzó 12,8 millones de toneladas [41], siendo principalmente de extracción de algas pardas.

La mayor parte de las algas pardas se exportan, algunas como el huiro negro, huiro palo y sargazo siendo muy preciadas en Japón, China y Francia, donde las emplean para producir espesantes alimenticios, cosméticos, fármacos y comida para animales, quedando una pequeña parte en Chile, además el cochayuyo, que se comercializa como alimento humano [42].

Actualmente existe una empresa chilena dedicada a la elaboración de insumos agrícolas usando como materia prima algas pardas. Esta compañía se halla interesada en la valorización de sus residuos. En trabajos anteriores (Landeta, 2017), se encontró que los residuos tienen un alto contenido de alginato, similar al alga parda *Macrocystis pyrifera*, como se puede observar en la Tabla 4. A partir de la comparación del contenido de alginato se estima que se pueden usar estos residuos como materia prima para algún proceso que requiera este compuesto como principal fuente de carbono.

Tabla 4: Comparación del análisis proximal entre *Macrocystis pyrifera* y el residuo a utilizar (3).

	Ceniza (%)	Proteína (%)	Extracto No Nitrogenado (%)	Alginato (%)	Celulosa (%)
<i>M. pyrifera</i>	10,8	13,2	36,0	21,8	7,6
Residuo	23,5	15,8	47,8	31,4	11,7

En la Tabla 5 se presentan los mismos componentes del análisis proximal que muestra la Tabla 4, pero haciendo una comparación de cuanto sería la concentración de cada componente al producir un litro de cultivo. Se considera una concentración de 2% p/p de fuente de carbono en el medio y se usa como referencia el extracto no nitrogenado presente en cada sustrato.

(3) Este porcentaje se expresa en base a la materia seca de cada compuesto. Para *M. pyrifera* los datos se obtuvieron según Ravanal et. al. 2016 y estudios realizados por el Laboratorio de Química y Análisis de los Alimentos, Universidad de Chile, 2011. Para el residuo se utilizaron resultados emitidos por el Laboratorio de Nutrición Animal y Medio Ambiente, INIA, Osorno, 2018.

Tabla 5: Comparación de la composición (en concentración) que presentaría un medio de cultivo usando a *Macrocystis pyrifera* y el residuo como fuente de carbono.

	Ceniza [g/L]	Proteína [g/L]	Extracto No Nitrogenado [g/L]	Alginato [g/L]	Celulosa [g/L]
<i>M. pyrifera</i>	6,0	7,3	20,0	12,1	4,2
Residuo	9,8	6,6	20,0	13,1	4,9

1.2 Motivación

La búsqueda de conseguir el máximo provecho de los recursos naturales y disminuir al mínimo la cantidad de residuos producidos ha sido el objetivo de la industria mundial en los últimos 20 años, así es como surge el concepto de biorrefinería aplicando estos objetivos a los procesos que usan biomasa como materia prima.

Considerando la superficie de costa que tiene Chile y la emergente industria algal presente en nuestro país. Esta tesis se enmarca en la búsqueda del aprovechamiento de los residuos ricos en alginato de una industria algal, mediante la producción de proteína unicelular (SCP) a partir de un hongo marino, como una alternativa sustentable a la creciente demanda de alimentos a nivel mundial.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Mejorar la producción de proteína unicelular (SCP) en el hongo marino *Dendryphiella salina* usando como sustrato residuos de la industria algal.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Estudiar la asimilación de diferentes fuentes de carbono compleja por *Dendryphiella salina*.
- Estudiar y seleccionar pretratamientos para usar en residuos de la industria de macroalga parda.
- Evaluar el nivel de proteína unicelular (SCP) producida en el hongo usando el residuo industrial.
- Explorar el potencial comercial de los productos generados.

2 Marco Teórico

A continuación, se expondrán los factores más importantes a considerar para la construcción de la metodología y el diseño experimental.

2.1 Hongo *Dendryphiella salina*

Dendryphiella salina es un hongo de origen marino, de la clase de los *Hyphomycetes* (Figura 1 y Figura 2), cuya característica es que han perdido sus cuerpos de fructificación. *D. salina* crece óptimamente en medio de cultivo con adición de sales marinas, a valores de pH entre 5 y 7 y a una temperatura de 25 °C [43]. En su ambiente natural *D. salina* requiere acumular altas concentraciones de solutos intracelulares, para permitir que el agua que ingresa a la célula no la deje por diferencia de concentraciones. Para mantener este potencial celular negativo, con respecto al agua y su medioambiente externo puede aumentar su citoplasma y el volumen de sus vacuolas, pero el ajuste osmótico en el citoplasma se logra mantener a través de la síntesis de solutos orgánicos como manitos, glicerol y arbutol. Además, se ha confirmado que *D. salina* es capaz de sintetizar polisacáridos algales, tales como laminarina y alginato [44].

La ubicación de este hongo en diferentes aguas marinas permite realizar varios estudios, haciendo énfasis en su potencial para utilizar o degradar compuestos orgánicos. *D. salina* es capaz de sintetizar numerosas enzimas degradativas, entre ellas están celulasa, amilasa, lipasa, β -glucosidasa y xilanasas. Kirk and Gordon (1988) encontraron que *D. salina* además es capaz de degradar hidrocarburos, entre ellos, hexadecano, 1-hexadecano y tetradecano. También se ha explorado la degradación de componentes algales, los resultados obtenidos sugieren que este hongo está envuelto en la degradación y no sólo utiliza el alga como soporte. *D. salina* puede sintetizar laminarinasas extracelular y poli- β -D-1,4-manuronida liasa, además de una enzima extracelular hidrolítica de alginato en alga parda [43].

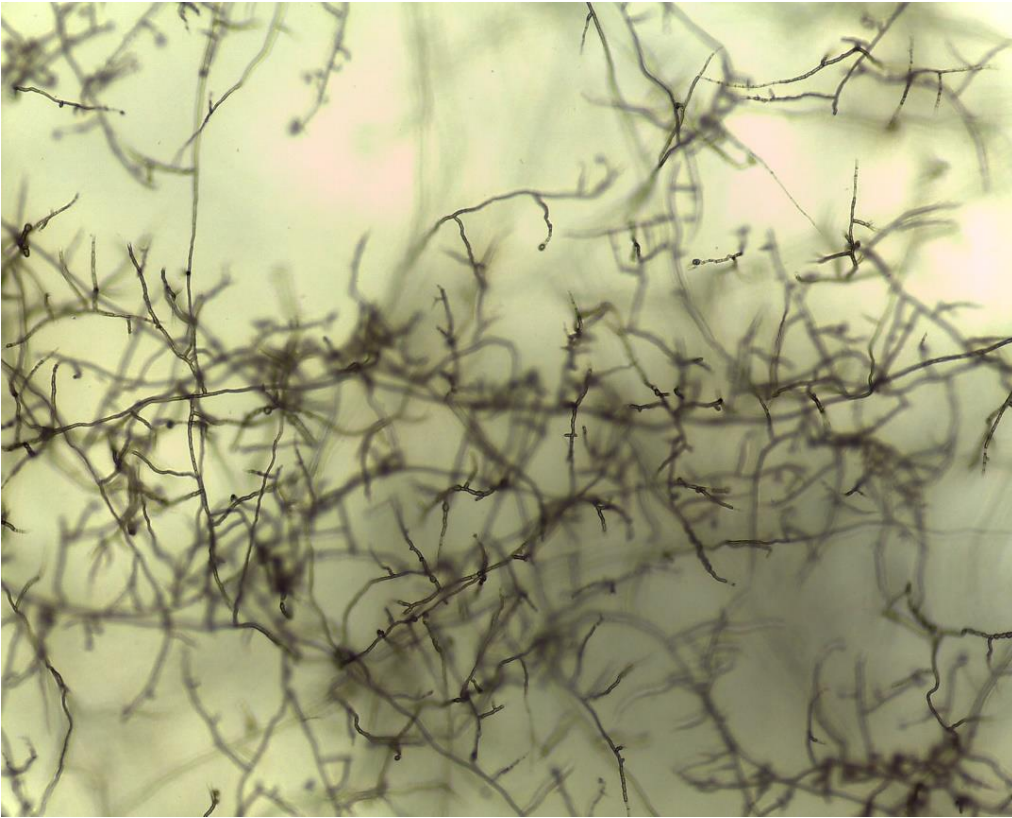


Figura 1: *Dendryphiella salina* creciendo en medio sólido. Lente 10X.
Fuente: Elaboración propia.

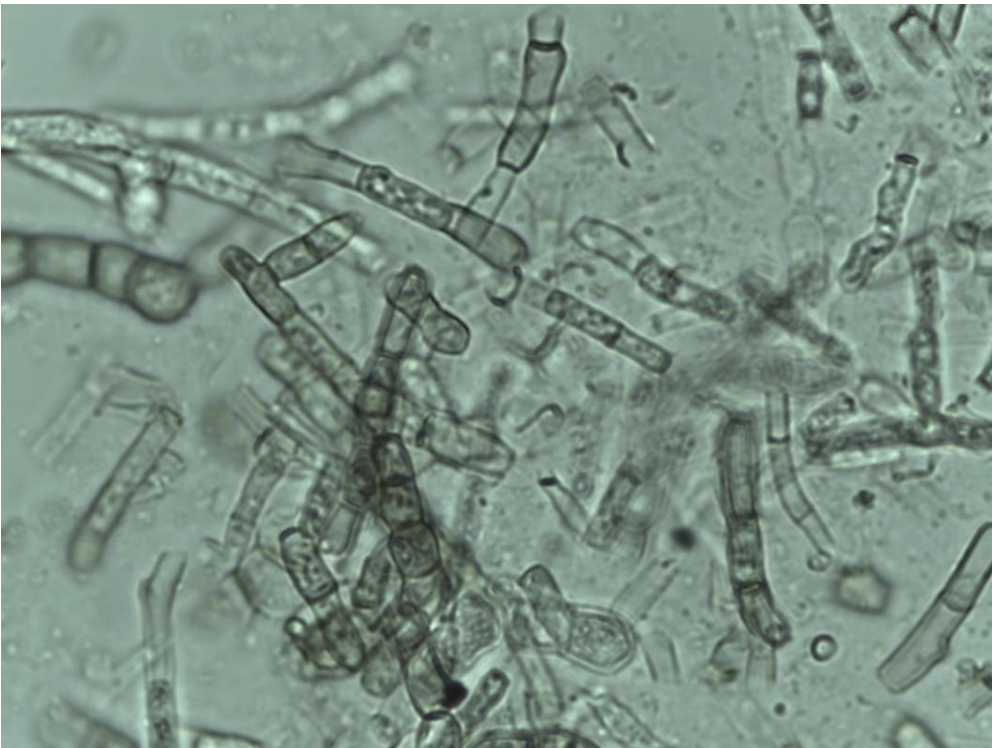


Figura 2: *Dendryphiella salina* creciendo en medio líquido. Lente 100X.
Fuente: Elaboración propia.

A partir de este hongo se puede obtener proteína unicelular (en inglés SCP), la cual consiste en el contenido proteico de microorganismos tales como, levaduras, bacterias y hongos. Su principal uso es en la suplementación proteica de la alimentación animal. Además, *Dendryphiella salina* produce hidrofobinas y alginato liasas, estas proteínas tienen un alto valor comercial.

En trabajos anteriores (Landeta, 2017) obtuvo resultados positivos en el aumento de proteínas, siendo de un 1,7% y 1,5% para los hongos *Asteromyces cruciatus* y *Dendryphiella salina*, respectivamente, creciendo en un medio compuesto por un residuo de una industria que procesa macroalgas pardas. En la Figura 3 se muestran los resultados obtenidos para *D. salina* en el medio compuesto por el residuo y en un medio sólo con *M. pyrifera*, a pesar de los porcentajes similares de alginato que tienen ambos sustratos se puede apreciar una diferencia significativa en la concentración de proteínas alcanzadas con cada medio [45].

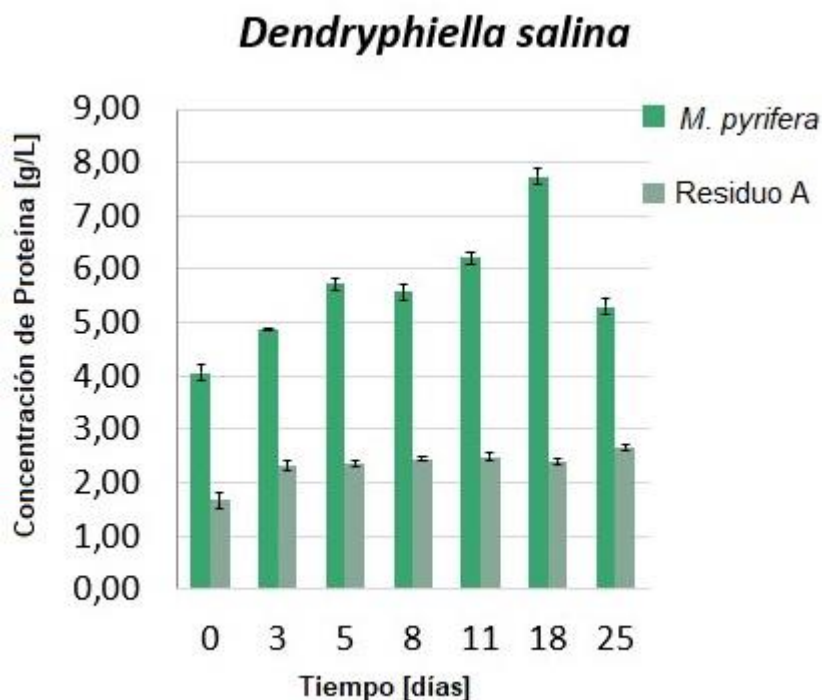


Figura 3: Gráfico de concentración de proteína de *Dendryphiella salina* en medio de cultivo compuesto por *Macrocystis pyrifera* y residuo A. Fuente: Landeta, 2017.

2.2 Crecimiento de Hongos

El crecimiento celular de los hongos filamentosos en un medio acuoso es distinto al típico crecimiento bacteriano. A diferencia de otros microorganismos, los hongos filamentosos presentan la ausencia de una división celular típica, donde se pasa de una célula a dos células. El crecimiento del hongo filamento está restringido sólo por la punta de la hifa, cuyo crecimiento sigue una tasa lineal constante [46]. Sin embargo, si se considera

completamente la ramificación del micelio, se puede observar un crecimiento exponencial en los estados iniciales. En los estados siguientes, el centro de la colonia presenta un decline de éste, mientras que las hifas de la periferia mantienen la tasa lineal de crecimiento. Generalmente, el crecimiento de los hongos filamentosos puede ser clasificado en tres etapas: Fase 1 (fase de adaptación) no se aprecia crecimiento; Fase 2 (fase lineal) crecimiento rápido y aproximadamente lineal; y Fase 3 (fase de decline) se observa un decline en el peso seco celular producido por la autólisis (Figura 4).

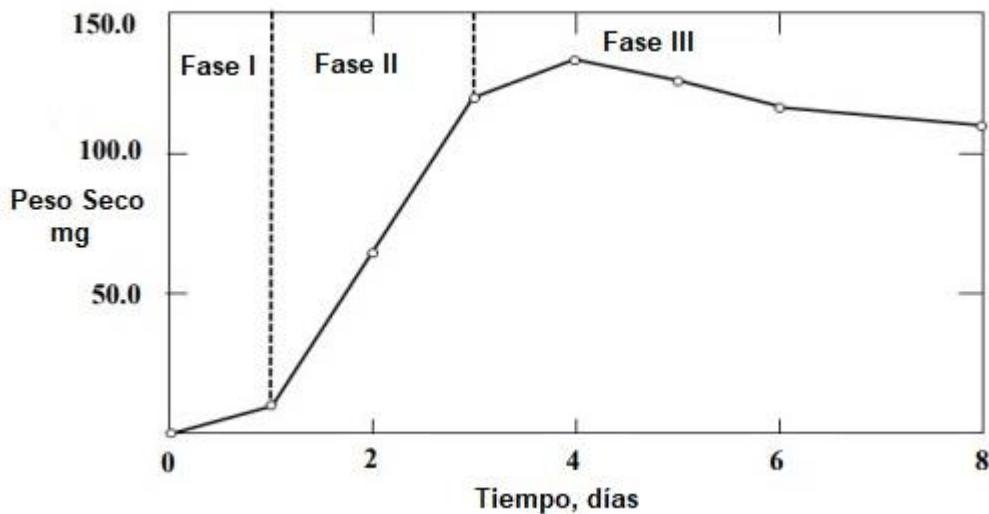


Figura 4: Crecimiento típico que presentan los hongos filamentosos. *Fusarium solani* en un medio líquido aireado. Fuente: Moore-Landecker (1990).

2.3 Medio de Cultivo

El medio de cultivo es una sustancia líquida o sólida que contiene todos los elementos nutritivos necesarios que facilitan el crecimiento del microorganismo cultivado. Los medios deben formularse cuidadosamente ya que tienen grandes efectos sobre la biomasa y los niveles de producción de enzimas.

Dendryphiella salina es un hongo filamentosos de origen marino, por lo que es necesario que su medio de cultivo tenga una alta concentración de sales que simule su medio ambiente natural. En trabajos anteriores (Landeta, 2017) definió los tipos de sales y concentraciones necesarias para otorgarle el medio mínimo de supervivencia. Promoviendo de esta manera la producción de proteínas extracelulares por parte del hongo. Además, se le agrega una fuente de nitrógeno que no contiene carbono y está diseñada para el estudio de fuentes de carbono en levaduras y hongos. La fuente de carbono se le agrega de forma separada.

2.4 Pretratamientos

A partir de la Figura 3 se puede suponer que es necesario aplicar un pretratamiento al residuo para que el crecimiento alcanzado por *D. salina* sea similar al obtenido usando como sustrato *M. pyrifera*.

Existe una amplia variedad de tratamientos que se le pueden aplicar a una materia prima para mejorar su biodisponibilidad de nutrientes, entre ellas están hidrólisis con ácido diluido, hidrólisis ácida, hidrólisis alcalina, hidrólisis con agua a alta presión y temperatura e hidrólisis enzimática [47]. Dado el pH ácido que posee el residuo (pH=3,7) se plantean tres tipos de pretratamiento, el primero consiste en romper este mediante sonicación, el segundo en una hidrólisis alcalina y el último a una hidrólisis enzimática. Todos buscan aumentar la liberación de azúcares simples que puede tener el medio antes de iniciado el cultivo del hongo.

Se encuentran ampliamente estudiado los diferentes tipos de hidrólisis para biomasa que tiene un alto porcentaje de celulosa, hemicelulosa y lignina [47]. La biomasa que se quiere pretratar presenta un alto contenido de celulosa y al ser de origen algal no presenta lignina, por lo que es posible aplicar alguna de estos pretratamientos.

En estudios realizados en el alga verde *Ulva rigida* para la producción de biogás, se analizó la hidrólisis ácida con H_2SO_4 al 98%, la hidrólisis termo-alcalina con NaOH 5N, a diferentes temperaturas y tiempos de tratamientos, un pretratamiento de ultrasonido por 5min a una frecuencia de 40 kHz y una potencia de 120 Watt y una hidrólisis enzimática usando el filtrado de un cultivo de *Aspergillus niger* [48]. Se determinó la liberación de azúcares reductores al medio y los resultados se obtuvieron en el siguiente orden: hidrólisis enzimática, hidrólisis ácida, hidrólisis termo-alcalina e hidrólisis por sonicación [48].

3 Metodología

3.1 Metodología General

La producción de proteína unicelular a partir de biomasa fúngica a bajo costo depende directamente de que el hongo sea capaz de asimilar los azúcares provenientes de un medio de cultivo cuya fuente de carbono sea un residuo de una industria algal, que en este caso es el alginato. En la Figura 5 se observan las etapas necesarias de llevar a cabo para inocular al hongo es su etapa de crecimiento exponencial (día 8) desde el medio líquido al medio complejo. Para esto es necesario que el medio líquido (que se usará para hacer el inóculo) tenga como fuente de carbono alginato, en este caso se usó una concentración de 0,2% p/p de este azúcar.



Figura 5: Metodología general de cultivo de *D. salina*.

3.2 Materiales

3.2.1 Cepa de hongo *Dendryphiella salina* 100654

El hongo por estudiar es *Dendryphiella salina*, obtenido a partir del National Institute of Technology and Evaluation Biological Resource Center (NBRC), cuyo número de cepa asociado es 100654. Se entregan los parámetros (Tabla 6) que debe tener el medio sólido para entregarle las condiciones óptimas de cultivo a *D. salina*.

Tabla 6: Se muestran los valores de los parámetros más importantes de cultivo en *D. salina*, según indicaciones entregadas por el proveedor.

Número de Medio	16
Medio	Agar de agua de mar y harina de maíz (en inglés: CMSWA)
Composición (para 1 L de medio)	
Extracto de harina de maiz	2 g
Agar	15 g
pH	7,0-7,5
Temperatura	25 °C
Agitación	200 rpm

3.2.2 Insumos y Reactivos

En la Tabla 7 se pueden observar los reactivos utilizados durante las experiencias de laboratorio.

Tabla 7: Insumos y reactivos utilizados.

Insumo o Reactivo	Proveedor
Cloruro de Sodio	Merck
Cloruro de Magnesio Hexahidratado	Merck
Sulfato de Magnesio	Merck
Cloruro de Potasio	Merck
Carbonato de Sodio	Merck
Cloruro de Calcio	Winkler
Base de Nitrógeno de Levadura (YNB)	BD (Cat N°: 239210)
Tris Hidroximetil	Sigma Aldrich
Ácido Maleico	Sigma Aldrich
Carboxi metil celulosa	Sigma Aldrich
Alginato de Sodio	Sigma Aldrich
Hidróxido de Sodio	Merck
DNS	Anexo G: Metodología de Determinación de Azúcares Reductores según el método de Miller (DNS)
Agar	BD
Reactivos del ácido bicinconínico	Método del Ácido Bicinconínico (BCA)
Reactivo de Bradford	Método de Bradford
Kit Simplified TKN	Hach
Residuo	Biogram
Extracto de malta	BD

3.2.3 Equipos

En la Tabla 8 se detallan los equipos utilizados durante las experiencias de laboratorio.

Tabla 8: Equipo utilizados durante el desarrollo de las experiencias de laboratorio.

Equipo	Fabricante y modelo
Balanza	OHAUS Analytical Plus
Medidor de pH	Corning pH meter 320
Incubadora	MM Group venticell
Espectrofotómetro de placas	ASYS UVM 340
Espectrofotómetro	Hach DR5000
Calefactor de tubos de 20mm	Hach 16500-10
Centrífuga	Eppendorf Centrifuge 5804R
Sonicador	Qsonica Sonicators XL2010 Q500 500 watts
Calefactor de placas	Lab-Line Multi blok Heater
Bomba de filtro de vacío	Vacuubrand Diaphragm vacumm pump
Esterilizador	JBiomedic C
Baño de agua	Julabo SW20

3.3 Medios de Cultivo

Se utilizaron 3 tipos de medios de cultivo, uno sólido y dos líquidos. Las condiciones estándar de cultivo que mantuvieron fueron la salinidad del medio, la temperatura a 25°C y la agitación a 200 rpm (en el caso de los medios líquidos), la composición de estos medios se describe en el Anexo C: Medios de Cultivo.

Se estudio la asimilación de *D. salina* de alginato y carboximetil celulosa (CMC), para esto se realizaron medios líquidos usando estos compuestos al 0,2% m/v como única fuente de carbono.

Al pasar al medio complejo, cuya fuente carbono proviene del residuo, se usaron inóculos provenientes de cultivos del medio líquido con alginato en el día 8 de crecimiento.

3.4 Parámetros y propiedades importantes para la evaluación del proceso de crecimiento del hongo

3.4.1 pH

A medida que la biomasa de *D. salina* va aumentando se van liberando metabolitos al medio, las cuáles hacen aumentar el pH de este, por lo que la medición del pH es un buen indicador del correcto crecimiento de este hongo [50].

3.4.2 Actividad enzimática

D. salina produce enzimas celulasas y alginato liasas, que libera al medio. La actividad de las enzimas se mide usando ensayos de Miller, también llamado DNS (ácido dinitrosalicílico) [51], el cual consiste en medir los azúcares liberados en una reacción entre las enzimas y la fuente de carbono de cada medio en específico, a partir de variaciones en la absorbancia medida a 570 nm. Para establecer una curva de calibración se utilizan concentraciones variables de glucosa entre 0 y 5,56 mM. En el Anexo H: Curva de Calibración de Glucosa, se puede ver en detalle las concentraciones de glucosa utilizadas. Este ensayo es aplicado al filtrado del medio usado para medir peso seco.

3.4.3 Determinación de la biomasa

Visualmente es posible apreciar el aumento de la biomasa en el medio, la cual lleva el consiguiente aumento de proteínas. Para determinar el crecimiento de la biomasa se realiza la medición del peso seco, se trabaja por duplicado tomando muestras cada 2 días. Se mide el pH del medio y se lleva a baño de agua a 100 °C por 10 min, luego la biomasa del cultivo se recoge mediante filtración usando papel Whatman N° 1, con un filtro de vacío. Las muestras se dejan secando en estufa a 60 °C por 24 horas, se dejan enfriar en desecador y se mide su masa en la balanza. Se toman muestras hasta el día 12.

3.4.4 Determinación de proteínas totales

Previo a la medición de proteína total, es necesario homogeneizar las muestras y romper la célula del hongo para liberar al medio las proteínas intracelulares. Con el sonicador se puede homogeneizar por ultrasonido y romper las células. Se utilizan pulsos de 30 segundos de sonication por 30 segundos de pausa por 10 minutos usando el 40% de la potencia del equipo, con la punta de menor diámetro. Esto se realiza dos veces con cada muestra, manteniendo siempre la muestra en hielo y controlando que ésta no se caliente.

Se utilizaron 3 metodologías de determinación de proteína total, usando el método del BCA (ácido bicinónico), método de Bradford y el nitrógeno Kjeldahl. Los primeros dos métodos mencionados son colorimétricos y se usan en las muestras de los medios líquidos para determinar el porcentaje de proteína que se corresponde con la biomasa colectada en la medición de peso seco de la biomasa, estos métodos son incompatibles con el medio líquido complejo (compuesto por el residuo), por lo que a las muestras de este tipo de medio se les aplica el método simplificado de Nitrógeno Kjeldahl Total (Método de Nitrógeno Total Kjeldahl Simplificado (Hach)).

Para los métodos del BCA y Bradford es necesario hacer una curva de calibración de proteína, se usa la proteína Albumina Suero Bovina (BSA) y va en concentraciones de 0 a 1,5 [mg/ml]. Más detalles de la curva de calibración y del procedimiento de determinación de proteínas en el Anexo E: Metodologías de Determinación de Proteína Total y el Anexo F: Curva de Calibración de Proteína Albumina de Suero Bovino (BSA).

En el caso del Nitrógeno Total Kjeldahl se utiliza el método simplificado elaborado por Hach® [52], cuyo rango de detección es 0 a 16 mg/L de nitrógeno orgánico en la muestra. Para estar en el rango de medición del kit es necesario diluir las muestras, en este caso fueron necesarias diluciones de 200 y 400 veces (Método de Nitrógeno Total Kjeldahl Simplificado (Hach)).

3.5 Pretratamiento Físico-químico

Se estudiarán 3 tipos de tratamientos a realizar al residuo. El objetivo de aplicar este proceso es reducir el tiempo de bioconversión de los compuestos complejos del alga y aumentar la biodisponibilidad de azúcares simples en el medio.

3.5.1 Rompimiento por Ultrasonido

Para preparar 1 L de medio de cultivo complejo es necesario agregar 89,9 g de residuo húmedo, previo a la preparación de este medio se rompe mecánicamente por ultrasonido una concentración 2X de residuo, es decir, para preparar 100 mL de medio es necesario tratar una solución de 50 ml con 8,99 g de residuo. Esta se trata por 10 min con ciclos de 30 s de sonication y 30 s de pausa, con el equipo Sonicators XL2010 al 40% de su potencia (potencia: 500 watts, frecuencia: 20 kHz), usando la punta 0,5-50ml.

3.5.2 Ultrasonido e Hidrólisis Termo-Alcalina

Para este tipo de tratamiento se aplica el proceso de sonication señalado anteriormente antes de realizar la hidrólisis termo-alcalina. Se agrega hidróxido de sodio 0,5 N. Luego se lleva a una presión de 2 atm y una temperatura de 121 °C por 20 min.

3.6 Pretratamiento Enzimático

3.6.1 Ultrasonido e Hidrólisis con alginato liasa

Posterior al rompimiento por ultrasonido descrito anteriormente se realiza una hidrólisis enzimática usando una enzima alginato liasa (AL). Se prepara el buffer de degradación AL (Anexo I: Buffer de Degradación AL) y se agrega en proporción 1:1 con la solución de residuo sonicado. Se deja incubando por 24 hr a 37 °C sin agitación.

3.7 Fermentación

Las condiciones actuales de fermentación, según lo obtenido en trabajos anteriores (Landeta, 2017), son a pH 5,5, durante un tiempo de 12 días, a una temperatura de 25 °C y con una agitación de 200 r.p.m.

3.8 Diseño del Proceso Experimental

El estudio involucra, en primera instancia, la evaluación del crecimiento del hongo *D. salina*, usando como única fuente de carbono alginato y CMC. Para esto se trabajará con volúmenes de 10 ml de medio de cultivo líquido (Medio Líquido) en tubos cónicos de 50 mL, éstos se inoculan con discos de 50 mm de medio sólido (Medio Sólido). Para evaluar el crecimiento se mide la biomasa mediante peso seco analizando tubos cada dos días por duplicado hasta alcanzar los 12 días. A estas muestras también se les mide el pH y los azúcares libres (mediante el método del DNS). Se determina el o los días de mejor crecimiento para cada fuente de carbono.

Una vez determinada la capacidad del hongo de alimentarse de alginato y CMC, se inicia el estudio del pretratamiento a aplicar al residuo para confeccionar el cultivo en medio complejo (fuente de carbono: residuo). Se comparan el medio complejo crudo (sin aplicar ningún pretratamiento), sonicado, sonicado + hidrólisis alcalina y sonicado + hidrólisis enzimática. Se estudian los días 0, 8 y 12 de cada caso. Se trabaja con 10 mL de medio de cultivo complejo en tubos cónicos de 50 mL (cada tubo es una muestra), es necesario usar un inóculo tomando una esfera de hongo de aproximadamente 0,7 mm de diámetro de un cultivo en medio líquido (usando alginato como fuente de carbono) en su día 8 de crecimiento.

A los estudios realizados a los pretratamientos y en medio complejo se les aplica la determinación de proteína total usando el método simplificado descrito por Hach [52] para cuantificar el Nitrógeno Total Kjeldahl (Método de Nitrógeno Total Kjeldahl Simplificado (Hach)).

A partir de los resultados obtenidos en la evaluación de los pretratamientos, se elige el que obtiene mejor rendimiento y se realiza nuevamente el cultivo por duplicado, tomando muestras cada 4 días hasta el día 12. Siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente y aplicando los mismos análisis.

La Figura 6 muestra gráficamente el flujo de razonamiento utilizado en este diseño experimental.



Figura 6: Diseño Experimental.

3.8.1 Fermentación en medios de cultivo líquido

3.8.1.1 Preparación de medio de cultivo

El medio de cultivo líquido es preparado bajo un protocolo que mezcla una variedad de sales simulando la condición de salinidad del mar, un buffer, una fuente de nitrógeno que no contenga carbono y la fuente de carbono a estudiar (ver Anexo C: Medios de Cultivo).

Se prepara medio usando únicamente como fuente de carbono alginato y, por separado, CMC. Se desea evaluar la capacidad de asimilación de estos azúcares complejos por parte del hongo midiendo biomasa (a través de peso seco) y proteína (método de Bradford, método de BCA). Para esto se siembra en tubos cónicos de 50 mL, con 10 mL de medio. Se cosechan las muestras desde los tubos cada dos días, por duplicado.

3.8.1.2 Inoculación

Se inocula un disco de agar de 50 mm de una placa con medio sólido, en el día 11 de crecimiento.

3.8.1.3 Fermentación

Una vez inoculados los medios, los tubos cónicos son puestos en agitadores termorregulados LabTech LSI-150M a 25°C y 200 rpm.

3.8.2 Fermentación en medios de cultivo complejo

3.8.2.1 Pretratamientos

Se aplican 3 pretratamientos al residuo antes de agregarlo al medio, los cuáles son rotura por ultrasonido (sonicado), hidrólisis termo-alkalina e hidrólisis enzimática.

3.8.2.2 *Preparación del medio de cultivo complejo*

El medio de cultivo complejo es preparado bajo un protocolo que mezcla una variedad de sales simulando la condición de salinidad del mar, un buffer, una fuente de nitrógeno que no contenga carbono y como fuente de carbono se agrega residuo rico en alginato pretratado (ver Anexo C: Medios de Cultivo). El medio es esterilizado antes de inocular.

Se desea evaluar la capacidad de asimilación de los azúcares complejos presentes en el residuo por parte del hongo midiendo biomasa indirectamente a través de la determinación de proteína total, usando el valor de nitrógeno Kjeldahl. Para esto se siembra en tubos cónicos de 50 mL, con 10 mL de medio. Se cosechan las muestras desde los tubos cada 4 días, por duplicado.

3.8.2.3 *Inoculación*

Se inocula 1 esfera de hongo creciendo en medio líquido (10 mL de cultivo en tubos Falcon de 50 mL) con alginato al 0,2% como fuente de carbono, se realiza la cosecha en el día 8 de cultivo.

3.8.2.4 *Fermentación*

Una vez inoculados los medios, los tubos cónicos son puestos en agitadores termorregulados LabTech LSI-150M a 25°C y 200 rpm.

3.8.3 Toma de muestras

3.8.3.1 *Evaluación de crecimiento*

Cada tubo Falcon constituye una muestra, se toma un punto cada dos días por duplicado, es decir, se cosechan 2 tubos cónicos por día.

3.8.3.1.1 *Medición de Biomasa mediante peso seco*

Para cada fuente de carbono se toman muestras cada dos días por duplicado y se realiza el protocolo detallado en el Anexo D: Metodología de Determinación de Peso Seco. Además, se mide pH y azúcares libres (Anexo G: Metodología de Determinación de Azúcares Reductores según el método de Miller (DNS)).

3.8.3.1.2 *Medición de Biomasa mediante proteína total*

Antes de realizar los ensayos de determinación de proteína (método de Bradford, método del BCA y nitrógeno Kjeldahl) se homogeneizan las muestras y rompen las células mediante ultrasonido, realizando ciclos de 30 segundos de ultrasonido por 30 segundos de pausa por 10 minutos.

Para el análisis de proteína total usando el método de Bradford y del BCA no fue necesario realizar diluciones a las muestras. Por otra parte, para el caso del método simplificado de nitrógeno Kjeldahl fue necesario diluir las muestras 400 veces por el rango de sensibilidad de este ensayo.

4 Resultados y Discusión

4.1 Estudio del cultivo de *Dendryphiella salina* en medio líquido

Se estudió el crecimiento del hongo *Dendryphiella salina* usando como fuentes de carbono alginato y CMC, de manera separada. Los parámetros por considerar fueron el aumento de masa mediante peso seco, el cambio en el pH del medio a través de los días, los azúcares reductores presentes en el medio y finalmente el contenido de proteínas del medio.

Antes de establecer el medio de cultivo descrito en el Anexo C (Medio Líquido) se cambió la fuente de nitrógeno a utilizar, en estudios previos se utilizó extracto de levadura (en igual concentración que la explicitada en el Anexo C), pero dado el aporte de carbono que posee esta última y el desconocimiento del tipo de azúcar que tiene se cambió por YNB (base de nitrógeno de levadura), que contiene sulfato de amonio, aminoácidos (triptófano, metionina e histidina) y vitaminas necesarias para el crecimiento de levaduras y hongos, sin aportar carbono al medio.

4.1.1 Estudio de crecimiento de biomasa, según peso seco

En la Figura 7 se puede observar la curva correspondiente al crecimiento de la biomasa, determinada mediante peso seco. Al comparar esta curva con la presentada en la Figura 4 para hongos del tipo filamentoso, se pueden apreciar de manera aproximada las 3 etapas de crecimiento obtenidas en la literatura (2.2 Crecimiento de Hongos). La Fase I no se observa en las curvas presentadas en la Figura 7, esto podría deberse a que el hongo es inoculado desde el medio sólido en su fase de mayor crecimiento y el medio líquido le aporta las condiciones mínimas de cultivo. Por otra parte, la Fase II es claramente visible y se prolonga hasta el día 4 para CMC y 6 para alginato. Por último, la Fase III abarca la mayor parte del tiempo de cultivo, siendo desde el día 4 al 12 en el caso de CMC y desde el día 6 al 12 para al alginato.

D. salina es capaz de producir, entre otras, enzimas celulasas y alginato liasas, es por esto que antes de realizar el estudio de crecimiento de este microorganismo en un medio complejo, cuya fuente de carbono es un residuo de una industria algal, se intentó determinar los mejores días de muestreo en medios cuyo único azúcar complejo a degradar fueran alginato o CMC.

A partir de la Figura 7 se determinó que los mejores días de muestreo corresponden al día 8 para el medio con alginato y el día 10 para el medio con CMC. Además, al observar la curva se puede elegir el día 4 como final de la fase lineal de crecimiento. Con esto se decide que tomar muestras cada 4 días, hasta el día 12 de cultivo es un período razonable de tiempo para obtener los puntos claves de cada fase de la curva.

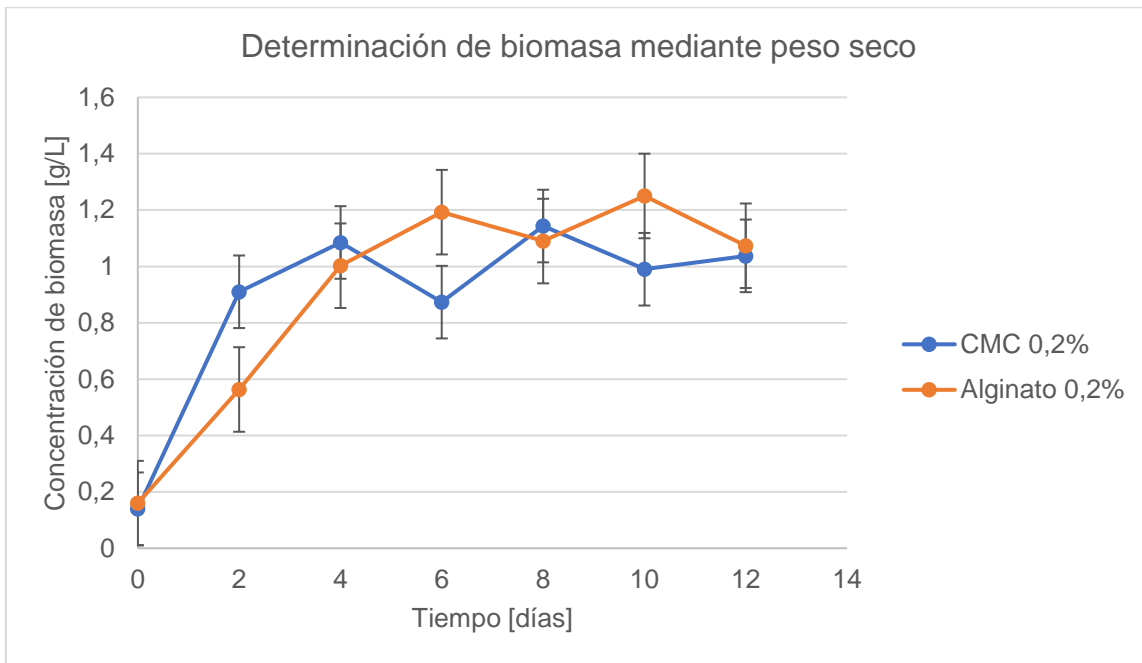


Figura 7: Crecimiento de biomasa en medio líquido del hongo *Dendryphiella salina*, usando como fuente de carbono alginato y carboximetilcelulosa (CMC), determinación mediante peso seco.

En la Figura 8 se puede observar la variación de pH en el medio de cultivo líquido a través de los diferentes días de muestreo. Este aumento en el pH es consecuente con lo observado en literatura por Schaumann et. al. 1990. La variación obtenida de pH es mínima, a diferencia de la obtenida por Schaumann et. al. 1990, esto podría ser por la cantidad de fuente de carbono utilizada, en el caso del alginato se usó un 1% en vez de 0,2%.

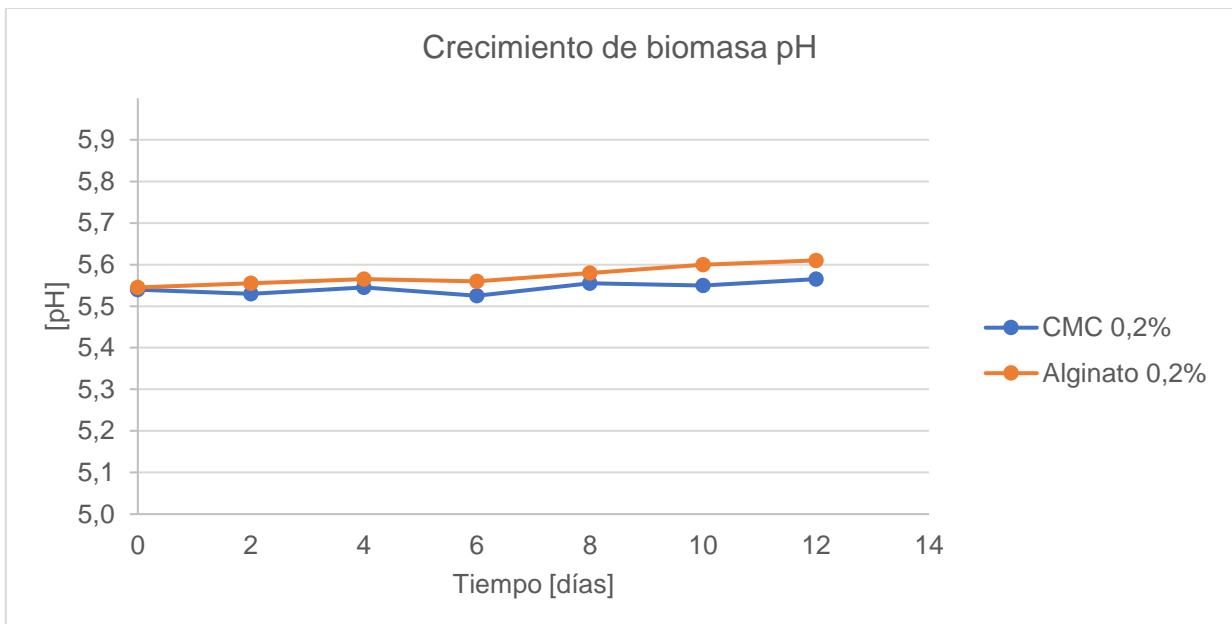


Figura 8: Variación de pH en el crecimiento de biomasa en medio líquido del hongo *Dendryphiella salina*, usando como fuente de carbono alginato y CMC.

En la Figura 9 se puede observar el consumo de azúcares reductores presentes en el medio por parte de *D. salina*. Los azúcares reductores corresponden a las subunidades básicas de los polímeros que se están estudiando como fuentes de carbono, que son capaces de reaccionar con diferentes compuestos. En el caso de alginato son el ácido glucurónico y ácido manurónico y para la CMC corresponde a glucosa unida a un grupo carboximetil, las moléculas de glucosa están unidas entre sí por un enlace β -glucosídico (mismo enlace que la celulosa natural), por lo que es una forma indirecta de medir la actividad de las enzimas (celulosa y alginato liasa) producidas por el hongo y la capacidad que tiene este de incorporar a su metabolismo estos azúcares simples como biomasa. En los primeros días, correspondientes a la fase lineal de crecimiento del microorganismo, se consume la mayor parte de estos azúcares. Luego se producen variaciones sinuosas de la curva que podrían corresponder a la acción de las enzimas liberadas al medio para la degradación de los polímeros complejos (alginato y CMC).

Este último fenómeno se aprecia en los días 4 y 10 en CMC, donde se ven nuevos aumentos en la medición de azúcares reductores y en los días 6 y 10 en alginato, en estos días se aprecia el mismo comportamiento que en el caso de CMC.

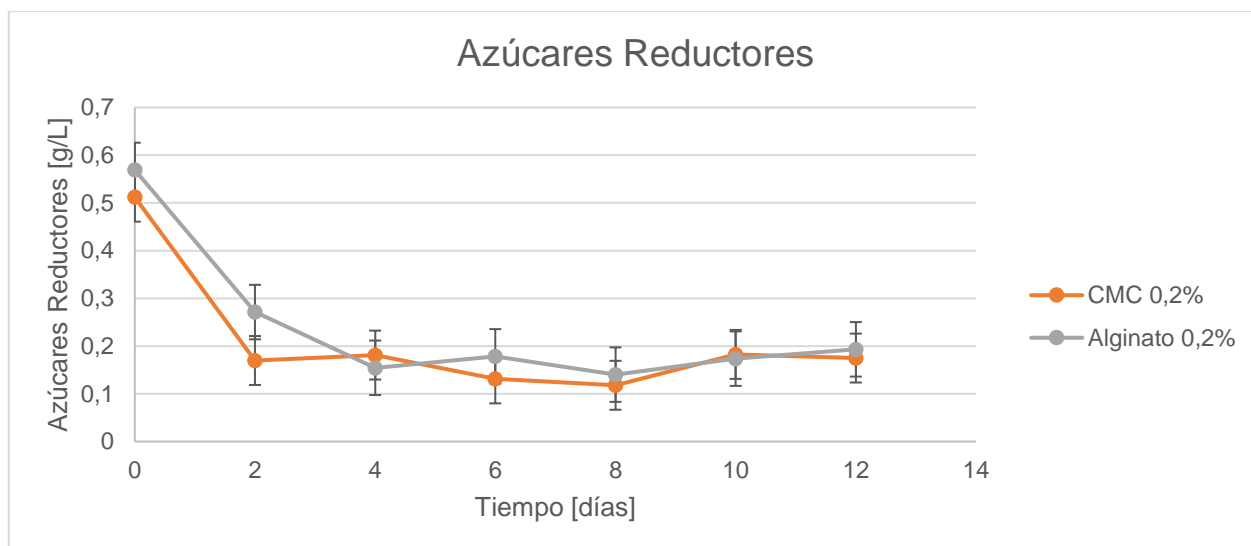


Figura 9: Variación de azúcares reductores en crecimiento en medio de cultivo líquido del hongo *Dendryphiella salina*, usando como fuente de carbono alginato y CMC.

En la Figura 10 se muestra la curva obtenida a partir de la determinación de proteína total usando el método del ácido Bicinconínico (BCA) para los mismos días en que se realizó la medición de biomasa mediante peso seco. Se usó un estándar de proteína albumina de suero bovino (BSA) (Anexo F: Curva de Calibración de Proteína Albumina de Suero Bovino (BSA)).

Los resultados obtenidos muestran un aumento muy pequeño de proteína presente en la muestra de los distintos días.

Al realizar la determinación de proteína total mediante el ensayo del método de Bradford (Anexo E Método de Bradford) no se obtuvieron resultados que indicaran la presencia de proteína en las muestras, en ninguno de los días analizados.

En base a los resultados obtenidos en ambos ensayos y a la sensibilidad de estos, se considera que no son concluyentes para poder inferir el porcentaje o la cantidad de proteína celular presente en *D. salina*, con relación a la cantidad de biomasa resultante en la determinación de peso seco.

Los problemas obtenidos en los resultados de los ensayos de proteína (Bradford y BCA), pueden deberse a una incompleta lisis celular, con la consiguiente subestimación de la cantidad de proteína real presente en las muestras. El proceso realizado para romper la pared fúngica consistió en sonicar las muestras en ciclos de 30 segundos de sonicado, por 30 segundos de pausa por un tiempo total de 10 minutos usando una potencia del 40% del equipo.

Se comprobó el estado de la ruptura de la pared celular del hongo mediante la observación al microscopio de muestras de ambos medios con 12 días de crecimiento, en las Figura 11 y Figura 12 se puede apreciar las condiciones de la lisis celular obtenida. Al mirar la muestra con lente de aumento 40X se puede notar que una mayor cantidad de los micelios no se encuentran rotos por completo, mientras que cuando se observa la Figura 11 que posee un aumento de lente 100X induce a errores al mostrar una mayor cantidad de hongo con la pared celular lisada.

La incapacidad de asegurar una lisis completa de las células del hongo presentes en la muestra y la sensibilidad de los ensayos surgen como los puntos clave a tener en cuenta para determinar el porcentaje de SCP (proteína unicelular) disponible en *D. salina*.

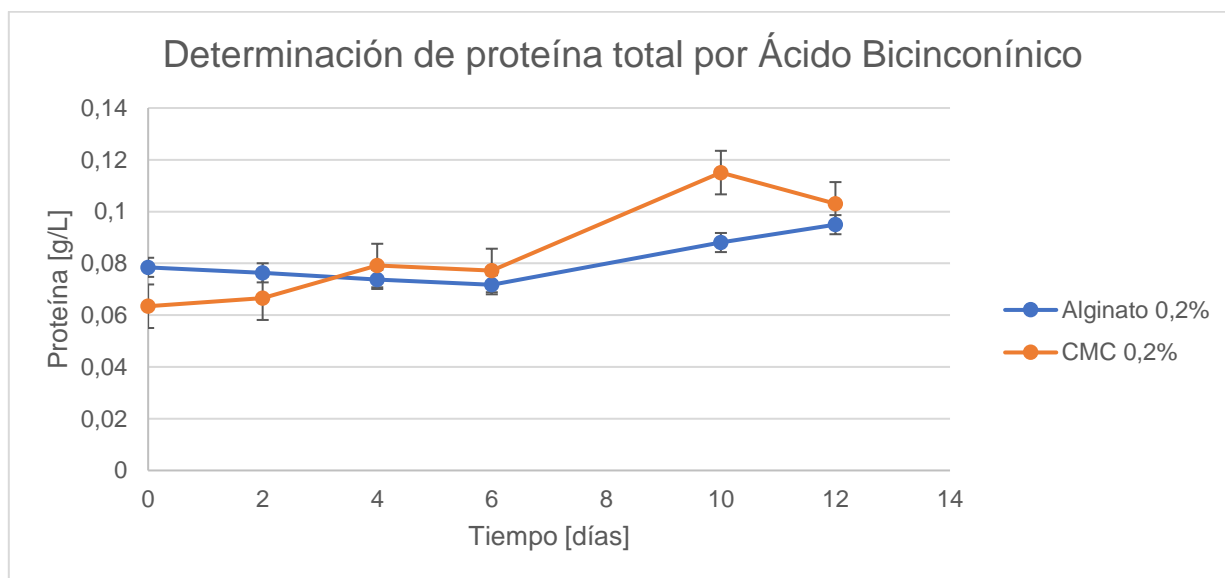


Figura 10: Determinación de proteína total usando el método del ácido bicinconínico en medio de cultivo líquido del hongo *Dendryphiella salina*, usando como fuente de carbono alginato y carboximetil celulosa.



Figura 11: D. salina creciendo en medio líquido, alginato 0,2%. Día 12 de cultivo. Lente 100X

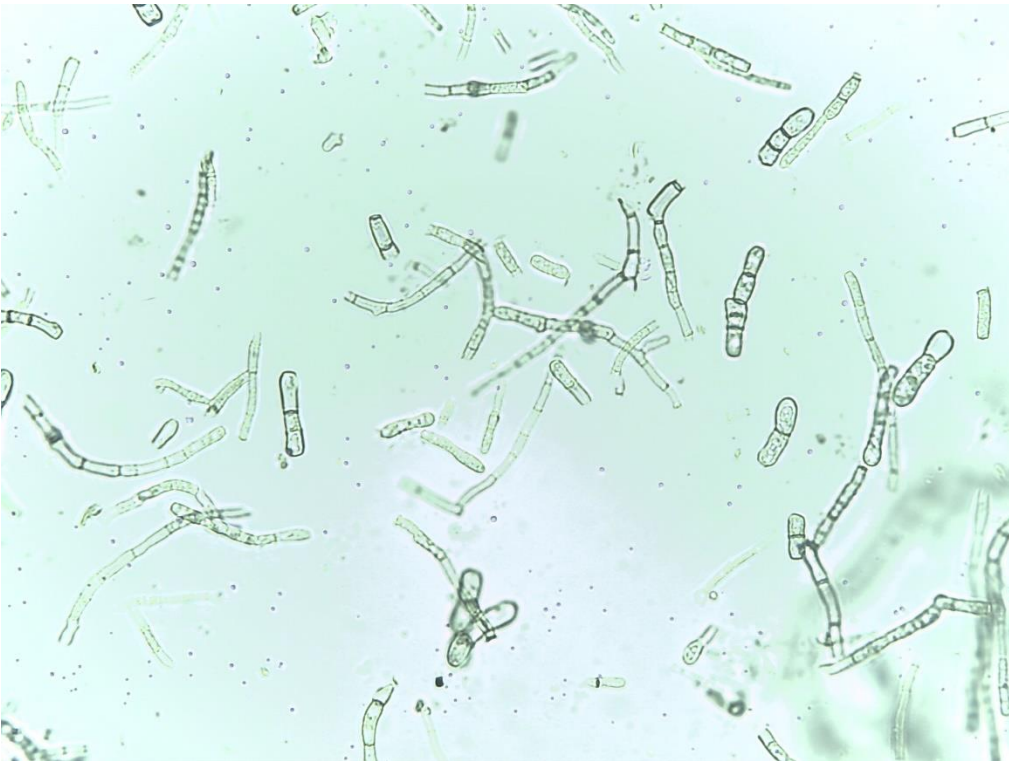


Figura 12: D. salina creciendo en medio líquido, alginato 0,2%. Día 12 de cultivo. Lente 40X.

En análisis anteriores, se demostró que el hongo *D. salina* es capaz de utilizar dos de los compuestos usados como buffer (Tris hidroximetil metano y ácido maleico) como fuente de carbono, sólo se probó suministrar ambos de manera simultánea en el medio, en las concentraciones indicadas en el Anexo Medio Líquido. Es por esto que para los análisis de rendimiento y balances de masa se considerará una mayor cantidad de aporte de carbono en el medio.

Finalmente, con los resultados obtenidos de peso seco y considerando los diferentes parámetros presentados anteriormente se tiene que al cosechar el hongo al día 10, tomando como única fuente de carbono el alginato se puede obtener un rendimiento de 62,5%. Sin embargo, es necesario tomar en cuenta que *D. salina* es capaz de metabolizar los compuestos agregados como buffer al medio, se cree que el ácido maleico es incorporado directamente a las vías metabólicas del hongo, al ser ionizada su estructura se transforma en maleato (compuesto intermedio del ciclo de Krebs), por lo que sumando el ácido maleico al alginato como posibles fuentes de carbono queda un rendimiento de 15,6% (Tabla 9).

Los resultados presentados en la Tabla 9 corresponden a cultivos realizados en medios con los compuestos buffer y la fuente de carbono señalada.

Tabla 9: Rendimientos de biomasa según peso seco con diferentes fuentes de carbono al día 10 de cultivo (Anexo J: Base de Cálculo).

Fuente de carbono	Rendimiento
Alginato	62,5 %
Alginato + ácido maleico	15,6 %
CMC	49,5 %
CMC + ácido maleico	12,4 %

4.1.2 Comparación de diferentes fuentes de carbono

En la Figura 13 se observa el crecimiento que presenta *D. salina* usando las fuentes de carbono a estudiar (alginato y CMC) y los compuestos usados como buffer del medio (Tris hidroximetil metano y ácido maleico). Todas las muestras fueron trabajadas por duplicado. Se aprecia que *D. salina* es capaz de incorporar y asimilar uno de los compuestos del buffer como fuente de carbono, pero el crecimiento alcanzado con alginato y CMC en promedio es mayor. En el día determinado de cosecha con alginato se obtienen 2 mg más de biomasa y en el caso de CMC es de 1,1 mg más de biomasa.

La resolución de la balanza utilizada es de 0,1 mg lo que representa un 5% y 9% de la medición de aumento de biomasa obtenido para alginato y CMC, respectivamente. Siendo estos valores menores a un 10% se concluye que no es significativo y la sensibilidad de la balanza no influye en los resultados obtenidos.

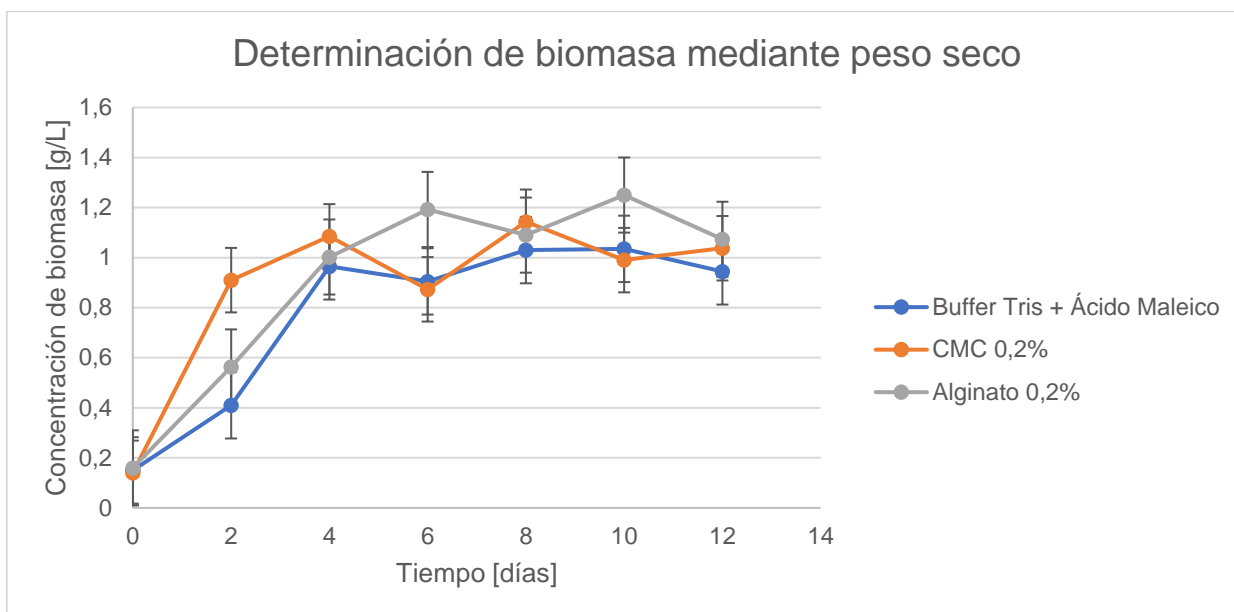


Figura 13: Crecimiento de biomasa en medio líquido del hongo *Dendryphiella salina*, usando como fuente de carbono los compuestos tampón del medio, alginato y carboximetilcelulosa (CMC).

Para realizar un balance de masa más exacto y obtener rendimientos específicos para cada fuente de carbono es necesario cambiar los compuestos utilizados como buffer del medio por algunos que puedan mantener un pH similar a 5,5 y que no sean asimilables por el microorganismo. Se trató de usar como buffer fosfato monopotásico y ácido fosfórico, pero debido a la cantidad de sales que posee el medio estos compuestos precipitan y hacían necesario elaborar un medio de cultivo totalmente nuevo, lo cual no se realizó debido a lo acotado del tiempo de trabajo disponible, quedando propuesto para futuras investigaciones.

4.2 Estudio del cultivo de *Dendryphiella salina* en medio complejo

Para seleccionar el pretratamiento a estudiar se evaluó el crecimiento de *Dendryphiella salina* los días 0, 8 y 12, mediante la determinación de proteína total usando un ensayo de nitrógeno Kjeldahl simplificado. Se trabajó con una sola muestra de cada tiempo.

En la Figura 14 se observan los resultados obtenidos, aplicando una dilución de 200 veces a las muestras analizadas, mediante el ensayo de nitrógeno Kjeldahl simplificado (Anexo E Método de Nitrógeno Total Kjeldahl Simplificado (Hach)) cuyo rango de detección es de 0 – 16 mg/L de nitrógeno total Kjeldahl (NTK). Este ensayo mide el nitrógeno orgánico presente en la muestra (NTK), el valor obtenido se multiplica por un factor, específico para cada tipo de muestra (Anexo J: Base de Cálculo). Para *Dendryphiella salina* se utilizó un factor de 6,25, que corresponde al factor estándar que relaciona el contenido de aminoácidos con el nitrógeno presente en la muestra, factor que debería ser determinado específicamente para cada organismo que se está estudiando. Según lo reportado para algas y microalgas este factor varía de una especie

a otra, reportándose valores que oscilan entre 3,75 a 5,72 ([53], [54]). Hacen falta estudios sobre esta relación en los hongos filamentosos.

Dado el rango de detección del ensayo se decidió no evaluar el pretratamiento de hidrólisis enzimática, ya que no se podía cuantificar de manera clara cuanto está afectando la adición de la enzima alginato liasa.

Finalmente se seleccionó el pretratamiento de rompimiento por ultrasonido seguido de una hidrólisis termo-alcalina con una concentración de NaOH 0,5M, en este proceso se aplica llega a una temperatura de 121 °C por 20 minutos a una presión de 2 atm.

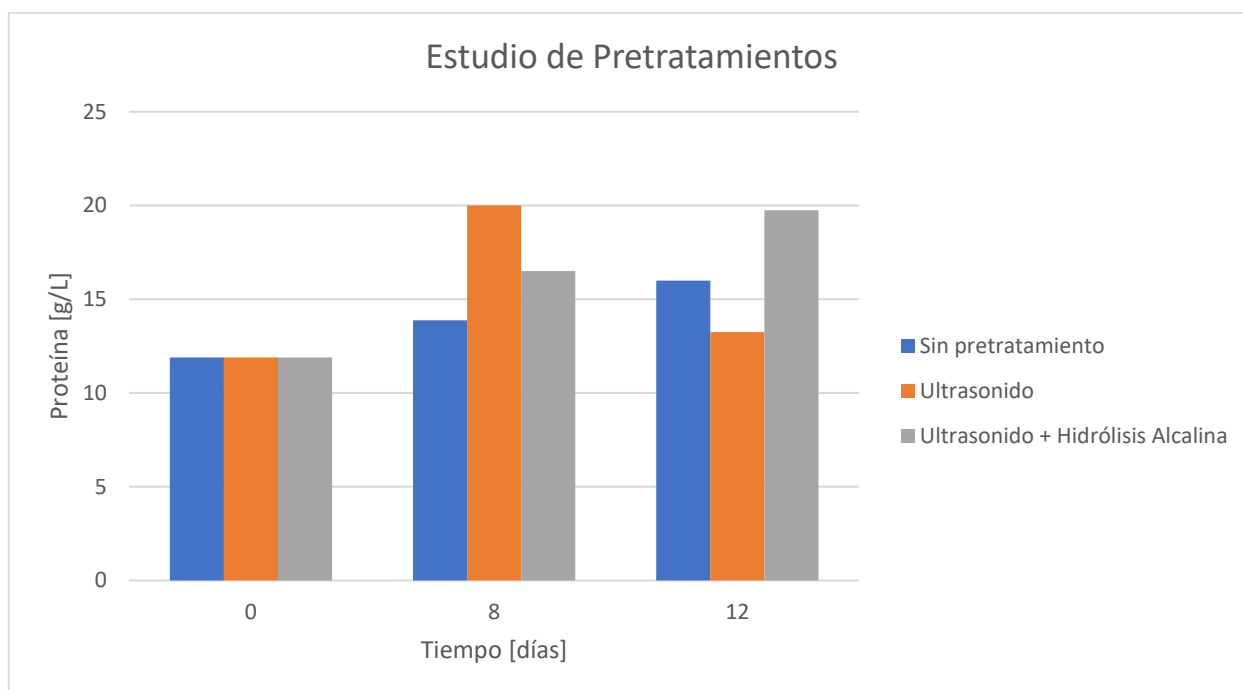


Figura 14: Proteína total en cultivos de *Dendryphiella salina* suministrados con residuos pretratados con dos condiciones. La proteína total se determinó mediante nitrógeno Kjeldahl.

4.2.1 Resultados de pretratamiento seleccionado

Para el pretratamiento seleccionado se cosecharon muestras cada 4 días y se trabajó por duplicado, los resultados obtenidos se pueden observar en la Figura 15. La determinación de proteína total de estas muestras se realizó mediante el ensayo de nitrógeno Kjeldahl simplificado con una dilución de 400 veces, se modificó la dilución (de 200 a 400 veces) debido a que los resultados anteriormente obtenidos del día 12 (Figura 14) estaban cercanos al límite superior de detección del ensayo, con el cambio en la dilución se encontraron valores máximos de 10,4 mg/L de NTK al día 12.

En la Figura 15 se observa la curva obtenida a partir de los resultados de nitrógeno Kjeldahl (Anexo J: Base de Cálculo) de las muestras diluidas 400 veces. Al comparar los resultados obtenidos con la curva de crecimiento de hongos filamentosos presentada en literatura (Figura 4) se aprecian las similitudes entre ambas, al observarse las mismas etapas (fase de adaptación, fase lineal y fase de declive). Con esto queda demostrado

que la determinación de proteína total usando nitrógeno Kjeldahl se puede determinar el crecimiento de biomasa de un microorganismo del tipo hongo filamentoso creciendo en medio complejo, el cuál es incompatible con el uso de otros métodos colorimétricos, como el método de Bradford y del Ácido Bicinconínico.

A partir de la Figura 15 se puede sugerir cosechar el día 8 de cultivo del hongo *D. salina*. En este día alcanza una concentración de proteína de 24,2 g/L, lo que representa un aumento de 59,2% de proteína total presente en el medio, con relación a la concentración inicial.

En el Anexo J: Base de Cálculo se muestra el cálculo teórico de la cantidad de proteína total presente en el medio complejo, ésta es proveniente principalmente del residuo rico en alginato y la fuente de nitrógeno (YNB) suplementada. El valor teórico obtenido de proteína total es de 13 g/L y el valor experimental resultante del ensayo de nitrógeno Kjeldahl es de 15,2 g/L. Con esto es posible suponer que el error asociado al método puede ser cercano a un 14%.

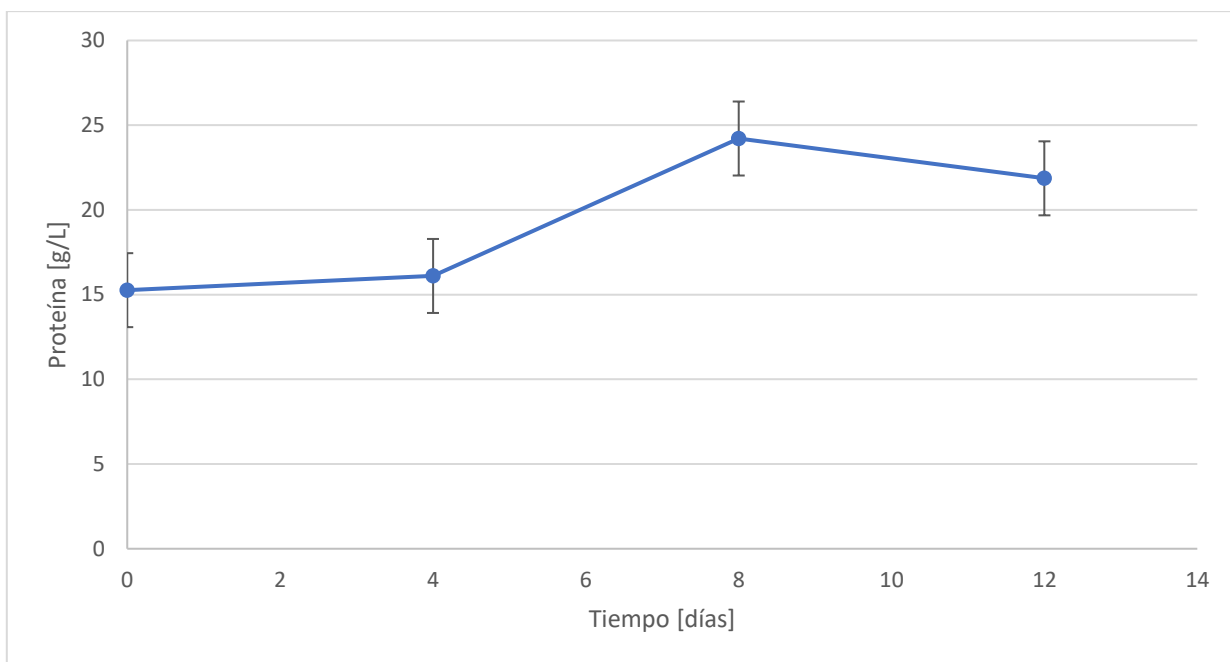


Figura 15: Determinación de proteína total mediante nitrógeno Kjeldahl al cultivo de *D. salina* con el proceso de pretratamiento de ultrasonido seguido de hidrólisis alcalina.

La determinación de proteína total mediante el ensayo de nitrógeno Kjeldahl se considera como una forma absoluta de medir nitrógeno en una muestra orgánica, ya que este es completamente digerido. Sin embargo, el método simplificado usado en estos experimentos requiere de grandes diluciones debido al rango de medición (0-16 mg/L). Diluir 400 veces una muestra puede inducir a errores sistemáticos en la metodología y el aumento de este error va a depender de la capacidad de homogeneizar correctamente la muestra. Además, cualquier error se amplifica mucho al multiplicar por el factor de dilución.

4.3 Exploración del potencial comercial de los productos generados

El medio cultivo complejo se elaboró considerando una concentración de 2% p/p de la fuente de carbono (cantidad de extracto no nitrogenado presente en el residuo), esto significa agregar una concentración de 89,9 g/L de residuo al medio (Anexo Cálculo de Cantidad de Residuo en Medio Complejo). Los cultivos se realizaron en 10 mL de medio en tubos cónicos de 50 mL.

Para considerar aplicar el cultivo de este hongo a escala industrial es necesario realizar el escalamiento del proceso, un factor importante a tomar en cuenta al comenzar la etapa de escalamiento es la densidad del medio de cultivo, ya que al ir aumentando la biomasa fúngica esta va aglutinando las partículas presentes en el medio formando esferas cuyo radio va aumentando conforme pasan los días de cultivo (Figura 16 y Figura 17). Además, se debe estudiar la agitación y aireación necesaria para mantener el cultivo creciendo adecuadamente por 8 días.

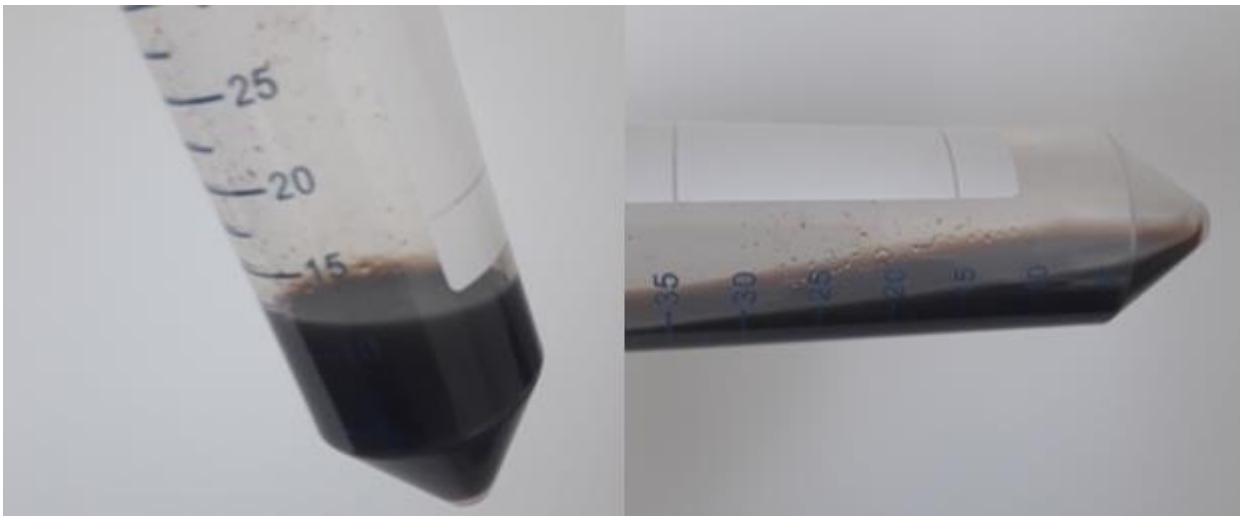


Figura 16: Estado del cultivo de Dendryphiella salina en medio complejo con pretratamiento de ultrasonido seguido de hidrólisis alcalina, al día 0. Fuente: Elaboración propia.



Figura 17: Estado del cultivo de *Dendryphiella salina* en medio complejo con pretratamiento de ultrasonido seguido de hidrólisis alcalina, al día 8. Fuente: Elaboración propia.

Para realizar la exploración del potencial comercial se considera una base de cálculo de una tonelada de residuo, para determinar los posibles ingresos a obtener, según los resultados obtenidos, con esta cantidad es posible producir 269,2 kg de proteína total (detalles del cálculo y supuestos en el Anexo J: Base de Cálculo).

La estimación del valor comercial de la proteína unicelular se hace a partir de los valores de mercado que poseen los productos que se pretende sustituir, en este caso son la harina de pescado y la proteína de soya. En la Figura 18 se muestra la evolución de los precios de estos productos en la última década, para tener un valor de mercado competitivo el precio de la proteína unicelular debe estar entre estos dos insumos o ser inferior al valor de la harina de soya. Es por esto que se proponen 3 escenarios para el posible valor comercial.

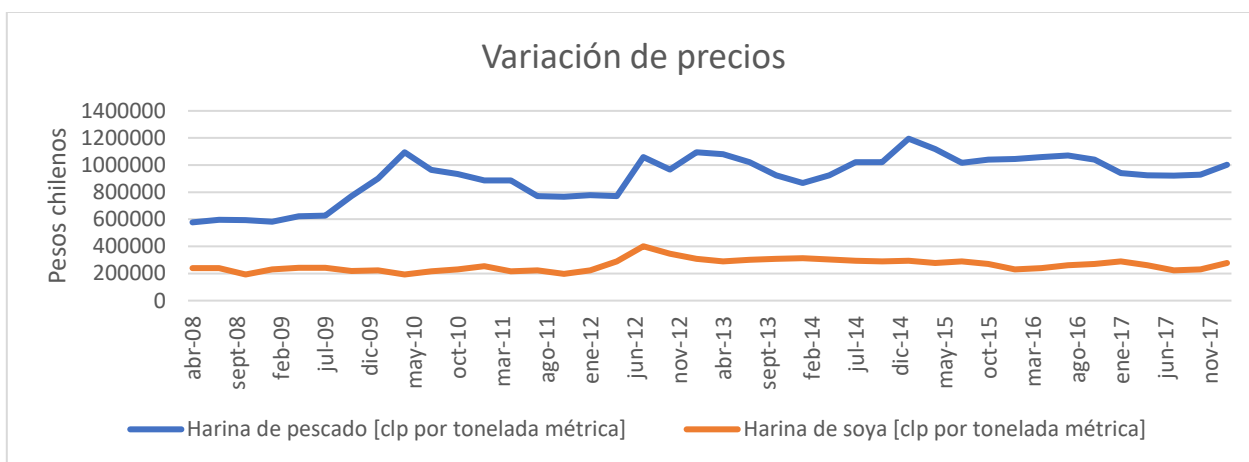


Figura 18: Evolución de precios (clp / tonelada métrica) de la harina de soya y la harina de pescado durante la última década. Adaptado de: *New feed for pigs and poultry. Report May 2018* [55].

En Tabla 10 se muestra el valor del precio por tonelada de harina de soya y harina de pescado en pesos chilenos (clp) obtenidos a partir de los datos de los últimos dos años

presentados en la Figura 18. En la tercera columna se presenta la ganancia obtenida por la producción de 269,2 kg de proteína total en cada caso y en la última columna se observa la ganancia por kg de residuo tratado. La diferencia en los precios de mercado entre la harina de soya y harina de pescado es que esta última es aproximadamente 4 veces más costosa que la primera. Para tener un valor de mercado competitivo se presenta un precio promedio de venta entre los suplementos proteicos presentados, dando una ganancia de 168 clp por kg de residuo tratado.

Tabla 10: Variación de ganancia para la producción de proteína unicelular, según el valor de mercado de la harina de soya y harina de pescado en los últimos 2 años.

	Precio [clp por tonelada]	Ganancia por proteína total producida[clp]	Ganancia por kg de residuo tratado [clp]
Harina de soya	253.975	68.370	68
Harina de pescado	992.774	267.255	267
Promedio soya/pescado	623.374	167.812	168

El tamaño del mercado global de los extractos de proteína, usando proteína celular y otras fuentes convencionales (harina de soya, harina de pescado, etc) fue estimado en 12.685,7 millones de USD. Los principales factores que están involucrados es la expansión del mercado son la creciente demanda por alimento humano y alimentación animal que tenga una baja concentración de grasas y una composición óptima de aminoácidos [56]. El uso de nuevas fuentes de proteína que no compitan por el uso de suelo, como la soya, ni impacten en los ecosistemas, como la pesca de arrastre para producir harina de pescado, presenta la producción de proteína unicelular a partir de hongos como una alternativa ecológica. Al usar como sustrato residuos de una industria algal aumenta la rentabilidad de este proceso y el aprovechamiento de la biomasa desarrollando una bioeconomía sustentable.

Además del potencial comercial que presenta *Dendryphiella salina* como proteína unicelular este hongo produce algunos tipos de proteínas específicas que tienen un alto valor comercial (Tabla 11), entre ellas están las proteínas hidrofobinas cuya capacidad hidrofóbica permite su uso como biosurfactantes con una gran variedad de aplicaciones industriales (Anexo A) y las enzimas alginato liasas (Tabla 11), *D. salina* es capaz de asimilar el alginato mediante la liberación de este tipo de enzimas al medio de cultivo, las cuáles degradan este polisacárido en sus azúcares más simples (Anexo B). Para comercializar estas proteínas es necesario un complejo proceso de extracción y purificación, posterior a la producción de las mismas.

Tabla 11: Precio de proteínas de interés producidas por *D. salina* y de alto valor comercial. Fuente: Sigma-aldrich.

Proteínas	Cantidad [mg]	Valor Comercial [clp]
Hidrofobinas SC3	1	1.100.000
Alginato Liasa	100	219.000

En Chile, en el mercado de manejo de residuos industriales, la administración de éstos (separación, transporte, tratamiento y eliminación) tiene un precio promedio de USD 180 /ton, lo que equivale aproximadamente a 122.000 clp por tonelada de residuo tratado. Al generar productos de alto valor comercial a partir de estos desechos se estaría logrando una ganancia aún mayor, ya que se dejaría de pagar el costo de disposición de estos.

Finalmente, el cultivo de *D. salina* a partir de un residuo de alga parda surge como una posibilidad de negocio mediante la generación de productos de alto valor comercial, cuyo escalamiento es necesario estudiar.

5 Conclusiones

A partir del desarrollo experimental y del análisis de los resultados obtenidos, se puede concluir que es posible generar el crecimiento de un hongo filamentoso, como *Dendryphiella salina*, para la producción de proteína unicelular usando como sustrato un residuo de algas pardas.

Considerando que el medio de cultivo tiene un contenido inicial de proteína, correspondiente al residuo y a la fuente de nitrógeno utilizada, se logra un aumento de 59% de proteína total al día 8 cultivo de *Dendryphiella salina* usando un medio cuya fuente de carbono es un residuo de alga parda, con esto se concluye que es factible usar este tipo de sustrato complejo para producir proteína unicelular proveniente de hongo, aplicando un pretratamiento que consiste en un rompimiento por ultrasonido seguido de una hidrólisis alcalina con NaOH 0,5N.

Por otra parte, con un aumento de 8,5 mg y 10,9 mg de biomasa de *D. salina* obtenidos al día 10 de cultivo usando como fuentes de carbono CMC y alginato, respectivamente, y la obtención de sus curvas de crecimientos en peso seco para 12 días de cultivo se comprueba la capacidad de asimilación de estos polisacáridos por parte de *D. salina*. Además, se estudiaron otras características del medio como son pH y contenido de azúcares reductores que sirven de indicadores del estado de crecimiento del cultivo. Adicionalmente, se midió el contenido de proteína total usando el método de Bradford y del ácido Bicinconínico (BCA) obteniéndose resultados de baja o nula presencia de proteína en el medio, se debe mejorar la metodología usada para realizar la lisis de la pared celular del hongo, ya que está debe ser completa y uniforme para poder determinar la cantidad de proteína intracelular y extracelular presente.

Desde el punto de vista del proceso, se analizaron tres tipos de pretratamientos para aplicar al residuo de alga parda, antes de preparar el medio de cultivo, ultrasonido, ultrasonido seguido de una hidrólisis alcalina y ultrasonido seguido de una hidrólisis enzimática. Con una diferencia de 6 [g/L] de proteína al día 12 de cultivo se seleccionó aplicar ultrasonido seguido de una hidrólisis alcalina, en vez de aplicar sólo ultrasonido. Se dejó pendiente la evaluación del pretratamiento que involucraba una hidrólisis enzimática, ya que se presentaron dificultades para cuantificar la cantidad de enzima que se está agregando inicialmente, dado el rango de medición del ensayo de nitrógeno Kjeldahl simplificado.

Durante el desarrollo experimental, a las muestras se les realizaron diluciones de 200 y 400 veces para los análisis del medio con residuos y sus posibles pretratamientos, estas diluciones fueron necesarias para llegar al rango del ensayo de nitrógeno Kjeldahl simplificado, este procedimiento agrega ruido a los resultados obtenidos.

Por la naturaleza ácida del residuo a trabajar y los resultados obtenidos en la evaluación de los pretratamientos se seleccionó aplicar ultrasonido seguido de una hidrólisis alcalina, al día 8 de cultivo se obtuvo una concentración final de proteína de 24,2 [g/L], lo cual representa un aumento de un 59% en el contenido de proteína total del medio.

A partir del análisis de la posibilidad de exploración comercial se concluye que usando una tonelada de residuo se pueden producir 269,3 kg de proteína unicelular. Considerando la información del precio de venta de la harina de soya y la harina de pescado se estima un valor comercial intermedio entre estos suplementos proteicos, que asciende a 623.374 clp por tonelada métrica de proteína unicelular. Usando este precio de venta se obtendrían 167.812 clp por los 269,2 kg de proteína unicelular producidos a partir de una tonelada de residuo y se tendría un ahorro de aproximadamente 122.000 clp por tonelada de residuo en la disposición final de éste.

Con esto se concluye acerca de la factibilidad del crecimiento de *D. salina* para la producción de proteína unicelular. Se deja propuesto para futuras investigaciones el estudio del escalamiento de la producción usando mayores volúmenes de medio de cultivo, ya que en este estudio se trabajó en tubos con 10 mL de medio.

6 Recomendaciones y Proyecciones

- La cantidad de la fuente de carbono agregada al medio (0,2 o 2%) y el volumen del medio de cultivo afecta directamente el crecimiento de biomasa del hongo. Para volúmenes mayores el uso de matraces mejora la agitación y evita la aglomeración de la biomasa permitiendo un crecimiento homogéneo en el medio.
- Para poder evaluar y estudiar el uso de un pretratamiento enzimático se recomienda cuantificar previamente la cantidad de proteína que tiene la muestra de enzima adicionada usando el método de nitrógeno Kjeldahl simplificado.
- La fuente de nitrógeno utilizada (YNB) contiene aminoácidos (metionina, triptófano e histidina) se recomienda repetir los experimentos usando una fuente de nitrógeno que no contenga aminoácidos para evaluar la asimilación de nitrógeno sin considerar el aporte directo de aminoácidos que tuvo el hongo con el medio utilizado anteriormente.
- Para realizar la extracción de proteínas de alto valor comercial se recomienda el cultivo en tubos de otro material, como puede ser de vidrio, ya que, al usar tubos cónicos de plástico, a medida que pasaban los días de cultivo algunas proteínas se pegaban a las paredes del recipiente, a una distancia aproximada de 1 cm del nivel del medio líquido, esta condición dificultaba la extracción y cuantificación de estas proteínas.
- Al proponer el uso de *D. salina* para la producción de SCP como suplemento proteico de alimentos animales, es necesario hacer un análisis de micotoxinas y metales pesados del medio de cultivo complejo al día 8 de crecimiento del hongo y estudiar el marco regulatorio establecido por la Food and Drug Administration (FDA) para este tipo de alimentos.
- Para lograr la caracterización completa de *D. salina* es necesario realizar un estudio del perfil de aminoácidos que posee este hongo, además de establecer una relación exacta del porcentaje de proteínas presente en la biomasa. Esto último se puede realizar en medios de cultivo líquido usando el ensayo de nitrógeno Kjeldahl para determinar la cantidad de proteína total, evitando la necesidad de romper por completo la célula.

7 Bibliografía

- [1] B. SA, «Valorización de Residuos, BRISA Ingeniería Ambiental,» 2017. [En línea]. Available: <http://www.brisa.cl/valorizacion-de-los-residuos/>. [Último acceso: 10 Noviembre 2017].
- [2] A. E. d. B. AEBIG, «Biorefinerías AEBIG,» 2014. [En línea]. Available: <http://www.aebig.org/biorefinerias/>. [Último acceso: 10 Noviembre 2017].
- [3] K. Balina, R. Francesco y D. Blumberga, «Seaweed biorefinery concept for sustainable use of marine resources,» de International Scientific Conference "Environmental and Climate Technologies", Riga, Latvia, 2017.
- [4] Waste biorefineries using filamentous ascomycetes fungi: Present status and future prospects por Jorge A. Ferreira "et al". Bioresource Technology, 215(3):334-345, mar. 2016.
- [5] Hang Y. D. Fungal treatment of beet waste. Progress in Water Technology, 8(1):325-327, enero 1976.
- [6] Friedrich J. Mixed culture of *Aspergillus awamori* and *Trichoderma reesei* 1295 for bioconversion of apple distillery waste. Applied Microbiology and Biotechnology, 26(3):299-303, jun, 1987.
- [7] Mishra B. K. y Arora A. Optimization of a biological process for treating potato chips industry wastewater using a mixed culture of *Aspergillus foetidus* and *Aspergillus niger*. Bioresource Technology, 94(1):9-12, agosto 2004.
- [8] Reade A. E. y Gregory K. F. High-temperature production of protein-enriched feed from cassava by fungi. Applied Microbiology, 30:897-904, 1975.
- [9] Safety evaluation of *Aspergillus fumigatus* grown on cassava for use as an animal feed por G. L. Khor "et al". Canadian Journal of Comparative Medicine, 41:428-434, 1977.
- [10] Protein content and amino acid composition of certain fungi avaluated for microbial production por C. Christias "et al". Applied Microbiology, 29:250-254, 1975.
- [11] The production of single cell protein from agricultural wastes by fungi por R. El-Saadnay "et al". Acta Alimentaria Academiae Scientiarum Hungaricae, 17:376-377, 1988.
- [12] Single cell protein production by *Aspergillus niger* and its evaluation por A. Singh "et al". Zentralblatt fur Mikrobiologie, 146:181-184, 1991.

- [13] Utilization of starch processing wastewater for production of microbial biomass protein and fungal α -amylase by *Aspergillus oryzae* por B. Jing "et al". Bioresource Technology, 66(3):201-206, dic. 1998.
- [14] Truong Q. T., Miyata N. y Iwahori K. Growth of *Aspergillus oryzae* during the treatment of cassava starch wastewater with high content of suspended solids. Journal of Bioscience and Bioengineering, 97(5):329-335, mar. 2004.
- [15] Achermowicz B., Kosikowski F. V. y Masuyama K. Mixed culture of different yeast species, yeasts with filamentous fungi in SCP production. I. Production of single cell protein by mixed culture *Candida lipolytica*, *Candida tropicalis*. Acta Microbiologica Polonica, 26(3):265-271, 1977.
- [16] Guven M. y Cansunar E. Single cell protein production and reduction of pollutants in waste sulphite liquor. Bullentin of Mikrobiyology, 23(4):329-335, oct. 1989.
- [17] Villas-Boas S. G., Esposito E. y Matos de Mendoca M. Bioconversion of apple pomace into a nutritionally enriched substrate by *Candida utilis*, *Pleurotus ostreatus*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 19(5):461-467, jul. 2003.
- [18] B. D. Singh, Biotechnology, 498-510, New Delhi, India: Kalyani Publishers, 1998.
- [19] Lignin biodegradation by the ascomycete *Chrysonilia sitophila* por J. Rodriguez "et al". Applied Biochemistry and Biotechnology, 62(2-3):233-242, feb-mar. 1997.
- [20] Drouliscos N. J., Macris B. J. y Kokke R. Growth of *Fusarium moniliforme* on carob aqueous extract and nutritional evaluation of its biomass. Applied and Environmental Microbiology, 31(4):691-694, abril 1976.
- [21] Sukara E. y Doelle H. W. Optimization of single cell protein production from cassava starch (*Rhizopus oligosporus*). Acta Biotechnologica, 9(9):99-110, sept. 1989.
- [22] Anderson C. y Solomons G. L. Primary metabolism and biomass production from *Fusarium*. The applied mycology of *Fusarium*, Cambridge UK, Cambridge University Press, 1984, pp. 231-250.
- [23] Trinci A. P. Myco-protein: A twenty-year overnight success story. Mycological Research, 96(1):1-13, 1992.
- [24] Robinson P. M. y Smith J. M. Morphogenesis and growth kinetics of *Geotrichum candidum* in continuous culture. Transaction of the British Mycological Society, 66:413-420, 1976.
- [25] Lipid composition of *Geotrichum candidum* single cell protein grown in continuous submerged culture por M. Ziino "et al". Bioresource Technology, 67(1):7-11, enero 1999.

- [26] Kim J. H. y Lebeault J. M. Protein production from whey using *Penicillium cyclopum*: Growth parameters and cellular composition. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 13:151-154, 1981.
- [27] Cardoso M. B. y Nicoli J. R. Single cell protein from the thermotolerant fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown in vinasse. I. Production, composition. *Nutrition Reports International*, 24:237-247, 1981.
- [28] Kinetic model for selective cultivation of microfungi in a microscreen process for food porcessing wastewater treatment and biomass production por J. van Leeuwen "et al". *Acta Biotechnology*, 23(2-3):289-300, Agosto 2003.
- [29] Preliminary screening of some fungal strains for protein upgrading of sugar-beet pulp por A. M. Bajon "et al". *Biotechnology Letters*, 7:203-206, 1985.
- [30] Youssef B. M. y Aziz N. H. Influence of gama-irradiation on the bioconversion of rice straw by *Trichoderma viride* into single cell protein. *Cytobios*, 97:171-183, enero 1999.
- [31] Miller S. A. y Dwyer J. T. Evaluating safety and nutritional value of mycoprotein. *Food Technology*, 55(7):42-47, jul. 2001.
- [32] Rodger G. Production and properties of mycoprotein as a meat alternative. *Food Technology*, 55(7):36-41, jul. 2001.
- [33] Wilson D. Marketing mycoprotein: The Quorn foods story. *Food Technology*, 55(7):48-50, jul. 2001.
- [34] A. G. J. Tacon, M. R. Hasan y M. Metian, «Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans: trends and prospects.,» *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper 564*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 2011.
- [35] U.S. Department of Agriculture (USDA), «USDA Market News Service: AMS USDA national weekly feedstuff wholesale prices,» 2012. [En línea]. Available: http://www.ams.usda.gov/mnreports/ms_gr850.txt. [Último acceso: Noviembre 2012].
- [36] Anupama y Ravindra P. Value-added food: Single cell protein. *Biotechnology Advances*, 18:459-479, 2000.
- [37] Sumbali G. Significance of fungal diversity de *The Fungi*, Harrow, UK, Alpha Science International Ltd, 2005, 169-241.
- [38] Thrane U. Fungal protein for food de *Food Mycology: A Multifaceted Approach to Fungi and Food*. Boca Raton, FL, USA. CRC Press. 2007. 353-3600.

- [39] Nitayavardhana S. y Khanal S. K. Biodiesel-derived crude glycerol bioconversion to animal feed: A sustainable option for a biodiesel refinery. *Bioresource Technology*, 102(2):5808-5814, feb. 2011.
- [40] FAO, «El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016,» de Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos, 224 pp, Roma, 2016.
- [41] FAO, FAO Aquaculture Newsletter N° 56, April 2017.
- [42] EFE, «La extracción de algas en Chile es más rentable que la pesca,» 3 Marzo 2017. [En línea]. Available: <http://www.elmostrador.cl/agenda-pais/vida-en-linea/2017/03/12/la-extraccion-de-algas-en-chile-es-mas-rentable-que-la-pesca-artesanal/>. [Último acceso: 2017 Noviembre 2017].
- [43] de la Cruz T. E., Wagner S. y Schulz B. Physiological responses of marine *Dendryphiella* species from different geographical locations. *Mycological Progress*, 5(6):108-119, jun. 2006.
- [44] Carbon source utilization by the marine *Dendryphiella* species *D. arenaria* and *D. salina* por Thomas Edison de la Cruz "et al". *FEMS Microbiol Ecol*, 58(3):343-53, mar. 2006.
- [45] C. Landeta, Desarrollo de un método integrado para la utilización de los residuos la industria de las macroalgas para crecer biomasa fúngica para obtención de bioproductos: Proteína unicelular e Hidrofobinas, Santiago: Universidad de Chile, 2017.
- [46] Moore-Landecker, Elizabeth. *Fundamentals of the fungi*. Upper Sadle River. New Jersey: Prentice Hall. 1990.
- [47] Yu Y., Lou X. y Wu H. Some Recent Advances in Hydrolysis of Biomass in Hot-Compressed Water and Its Comparisons with Other Hydrolysis Methods. *Energy & Fuels*, 22(1):46-60, sept. 2008.
- [48] Karray R., Hamza M. y Sayadi S. Evaluation of ultrasonic, acid, thermo-alkaline and enzymatic pre-treatments on anaerobic digestion of *Ulva rigida* for biogas production. *Bioresource Technology*, 187(3):205-213, mar. 2015.
- [49] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254, enero, 1976.
- [50] Schaumann K. y Weide G. Enzymatic degradation of alginate by marine fungi. *Hydrobiologia*, 204/205:589-596, 1990.
- [51] Miller G. L. Modified DNS method for reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 31(3):426-428, 1959.

- [52] Hach, Nitrogen, Simplified TKN (s-TKN), 2018.
- [53] Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds por S. O. Lourenco "et al". *Phycological Research*, 50:233-241, mayo, 2002.
- [54] Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass por C. V. González López "et al". *Bioresource Technology*, 101(19):7587-7591, oct. 2010.
- [55] EIP-AGRI Focus Group, New feed for pigs and poultry, 2018.
- [56] Market Research Report, «Protein Extracts from Single Cell Protein and Other Conventional Sources Market Analysis by Sources (Plant, Bacteria, Yeast, Algae, Fungi), by Applications (Pharma, Animal Feed, Agriculture), and Segments Forecast, 2018-2025,» Market Research, 2018.
- [57] Statistical Design, a Powerful Tool for Optimizing Biosurfactant Production: A Review por B. Bertrand "et al". *Colloids Interfaces*, 3(2):36, jul. 2018.
- [58] Mohan P. K., Nakhla G. y Yanful E. K. Biokinetics of biodegradation of surfactants under aerobic, anoxic and anaerobic conditions. *Water Research*, 40(3):533-540, 2006.
- [59] Desai J. D. y Banat I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(1):47-64, 1997.
- [60] Kosaric N. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. *Food Technology Biotechnology*, 39(4):295-304, 2001.
- [61] Krishnasway S. G., Ravi T. K. y Sivachidambaram P. Biosurfactants: Properties, commercial production and application. *Current Science*, 94(6):736-747, jun. 2008.
- [62] Mulligan C. N. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133(2):183-198, feb. 2005.
- [63] De la Rosa Cruz N. L., Sánchez-Salinas E. y Ortiz-Hernández M. L. Biosurfactantes y su papel en la biorremediación de suelos contaminados con plaguicidas. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 5(1):47-67, 2014.
- [64] T. M. Research, «Biosurfactants Market-Global Scenario, Raw Material and Consumption Trends, Industry Analysis, Size, Share and Forecast 2011-2018,» 2012.
- [65] Marine fungi as source of new hydrophobins por P. Cicatiello "et al". *International Journal of Biological Macromolecules*, nº 92, pp. 1229-1233, nov. 2016.
- [66] Khalesi M., Gebruers K. y Derdelinckx G. Recent Advances in Fungal Hydrophobin Towards Using in Industry, *Portein J*, 34:243-255, jul. 2015.

- [67] Wösten H. A. y Scholtmeijer K. Applications of hydrophobins: current state and perspectives. *Application Microbiology Biotechnological*, 99(4):1587-1597, feb. 2015.
- [68] Characterization of a new endo-type polyM-specific alginate lyase from *Pseudomonas sp.* por BW. Zhu "et al". *Biotechnol Lett*, 37(2):409-415, feb. 2015.
- [69] Molecular cloning, purification, and characterization of a novel polyMG-specific alginate lyase responsible for alginate MG block degradation in *Stenotrophomas maltophilia* KJ-2 por S. I. Lee "et al". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(6):1643-1653, sept. 2012.
- [70] Characterization of a new alginate lyase from newly isolated *Flavobacterium sp.* S20 por L. Huang "et al". *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 40(1):113-122, enero, 2013.
- [71] A novel oligoalginate lyase from abalone, *Haliotis discus hannai*, that release disaccharide from alginate polymer in an exolytic manner por H. Suzuki "et al". *Carbohydrate Research*, 341(11):1809-1819, agosto, 2006.
- [72] Crystal structure of family 14 polysaccharide lyase with pH-dependent modes of action por K. Ogura "et al". *The Journal of Biological Chemistry*, 284(51):35572-35579, dic. 2009.
- [73] Molecular identification of *Sphingomonas sp.* A1 alginate lyase (A1-1V) as a member of novel polysaccharide lyase family 15 and implications in alginate evolution por W. Hashimoto "et al". *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(1):48-54, enero, 2005.
- [74] Park D., Jagtap S. y Nair S. K. Structure of a PL17 family alginate lyase demonstrates functional similarities among exotype depolymerases. *The Journal of Biological Chemistry*. 289(12):8645-8655, dic. 2014.
- [75] Molecular insight into the role of the N-terminal extension in the maturation, substrate recognition, and catalysis of a bacterial alginate lyase from polysaccharide lyase family 18 por S. Dong "et al". *Journal of Biology and Chemistry*, 289(43):29558-29569, oct. 2014.
- [76] Zhu B. y Yin H. Alginate lyase: Review of major sources and classification, properties, structure-function analysis and applications. *Bioengineered*, 6(3):125-131, abril, 2015.
- [77] Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid por P. Smith "et al". *Analytical Biochemistry*, 150:76-85, 1985.

- [78] M. d. Salud, «Decreto Supremo N° 745, sobre condiciones sanitarias y ambientales básicas en los lugares de trabajo (en cuanto a acumulación y disposición de Residuos Industriales Sólidos - RISES),» Diario Oficial, 8 Junio 1992.
- [79] Wang X., Liu X. y Wang G. Two-stage Hydrolysis of Invasive Algal Feedstock for Ethanol Fermentation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 3(53):246-252, dic. 2011.
- [80] Francisco M., van den Bruinhorst A. y Kroon M. C. New natural and renewable low transition temperature mixtures (LTTMs): screening as solvents for lignocellulosic biomass processing. *Green Chemistry*, 14:2153-2158, jun. 2012.
- [81] Algae Biomass Organization, «Algae Industry Project Book 2015,» 2015.
- [82] Preparation and structure elucidation of alginate oligosaccharides degraded by alginate lyase from *Vibrio sp. 510* por Z. Zhang "et al". *Carbohydrate Research* , 339:1475-1481, mar. 2004.

8 Anexos

Anexo A: Biosurfactantes

Los Biosurfactantes (Bs) son compuestos naturalmente anfipáticos producidos por microorganismos como bacterias, levaduras y hongos filamentosos. Ellos resultan atractivos para ser aplicados en diversas áreas industriales, que incluyen, la cosmética, farmacéutica, agrícola, alimentaria y petroquímica, por sus propiedades bioquímicas [57].

Existen diferentes ventajas de los Bs con respecto a aquellos de origen químico, por lo que los Bs se han vuelto atractivos para aplicaciones industriales y ambientales, las cuales se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12: Ventajas de los Bs comparativamente con los surfactantes de origen químico.

Ventajas	Descripción	Referencia
Biodegradabilidad	Pueden ser fácilmente degradados por los microorganismos	[58]
Baja Toxicidad	Los Bs son menos tóxicos que los surfactantes químicos	[59]
Disponibilidad de residuos orgánicos para su producción	Los Bs pueden ser producidos a partir de materiales de desecho que existen en abundancia y por lo tanto, son económicos. La fuente de carbono se obtiene de hidrocarburos, carbohidratos y/o lípidos, los cuales pueden ser utilizados separadamente o en combinación entre ellos.	[60]
Factores ambientales	Muchos Bs no son afectados por factores ambientales tales como temperatura, pH o salinidad	[61]
Actividad superficie interface	Pueden bajar la tensión superficial del agua y la tensión interfacial agua/hexadecano	[62]
Otras ventajas	Son biocompatibles y digeribles, lo cual permite su aplicación en la industria cosmética, farmacéutica y en aditivos para los alimentos.	[60]

La mayoría de Bs descritos en la literatura son de origen bacteriano, siendo *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus* y *Arthrobacter* los géneros productores más reportados. Sin embargo, el estudio de Bs en levaduras ha ido creciendo en importancia, principalmente de los géneros *Candida*, *Pseudozima* y *Yarrowia* [63].

Debido a la creciente importancia de los Bs, se han buscado alternativas de fuentes de carbono a partir de residuos orgánicos y un medio mínimo para el crecimiento de microorganismos productores de Bs, lo cual es atractivo para disminuir costos de producción [63]. Thompson et al. (2000), reportan la producción de surfactina a partir de

residuos sólidos y líquidos de papa y almidón suplementados con sales minerales. Así mismo la utilización de otros residuos como melaza de azúcar y residuos de las destilerías han sido utilizados para la producción de Bs [63].

Existe un mercado de los biosurfactantes, que al año 2011 tenía un tamaño de mercado de USD\$1,7 billones, para el año 2018 se proyecta que alcance los USD\$2,2 billones, esto implica una tasa de crecimiento anual relativa de un 3,5% [64].

Proteínas Hidrofobinas

Son pequeñas proteínas de superficie, de aproximadamente 100 aminoácidos, obtenidas a partir de hongos filamentosos, han sido descritas como las proteínas activas de superficies más poderosas. En una de las caras de su superficie molecular, algunas de sus cadenas hidrofóbicas alifáticas están expuestas formando un parche hidrofóbico plano, mientras que sus residuos con cargas o polares quedan confinados en el otro lado, esta interacción le otorga propiedades anfifílicas. Varias características del desarrollo fúngico han sido atribuidas a estas proteínas, como son recubrimiento de esporas, hifas aéreas y cuerpos fructíferos con una capa repelente al agua y adhesiva que le permite al hongo escapar desde el medio líquido y vivir en adhesión a diferentes superficies [65]. Esta proteína es usada como un biosurfactante, agente espumante o agente encapsulante en productos alimenticios y formulaciones médicas [66].

En la Figura 19 se muestra como las proteínas hidrofobinas intervienen e interactúan entre ellas y las superficies modulando las principales características, descritas anteriormente, que permiten el desarrollo de este de los hongos [67].

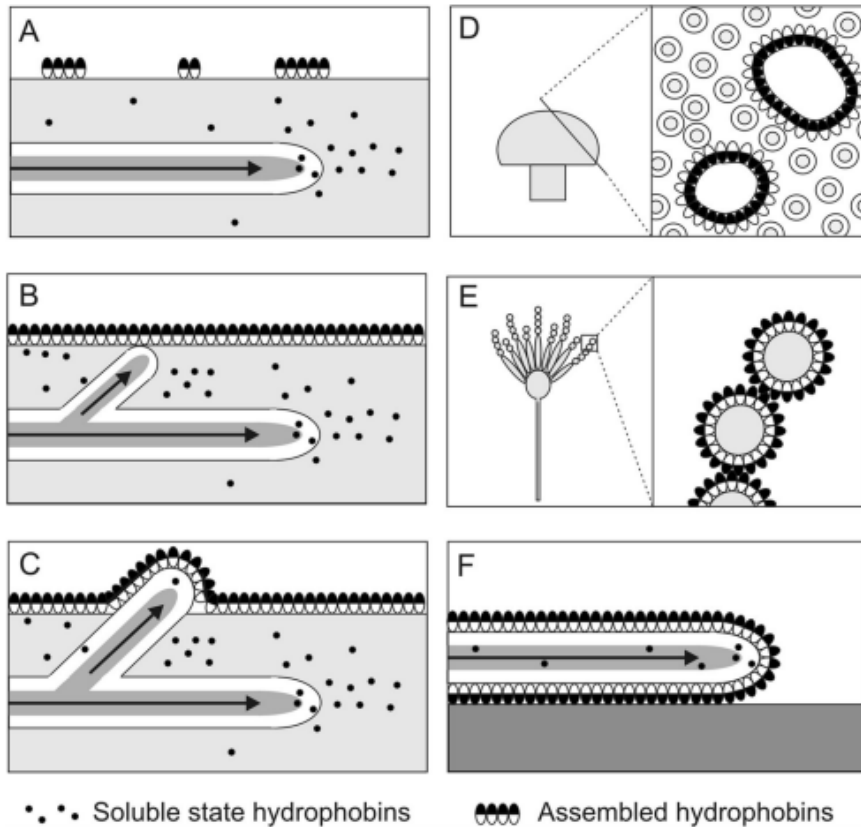


Figura 19: En esta figura se muestran los procesos de desarrollo del hongo en que están involucradas las hidrofobinas. A , B muestra como la proteína disminuye la tensión superficial permitiendo a la hifa penetrar la interface medio-aire. C, auto ensamblaje de las hidrofobinas a la superficie de la pared celular permiten hifas aéreas. D, cuerpos fructíferos y la capa de aire en la cavidad de los cuerpos fructíferos. E, y las esporas. F, hidrofobinas y el resultado de cómo es su ensamblaje en la hifa a superficies hidrofóbicas. Fuente: Wösten et. al., 2015

Anexo B: Alginato Liasa

El alginato es un polímero lineal compuesto por β -D- ácido manurónico (M) y α -L- ácido glucorónico (G), es el compuesto más abundante presente en las algas pardas llegando a el 40% del peso seco. Estas unidades están organizadas en 3 tipos de bloques diferentes, poli β -D- manuronato (polyM), poli α -L-guluronato (polyG) y el heteropolímetro (polyMG).

Los oligosacáridos de alginato son producto de la despolimerización mediante el uso de las enzimas alginato liasas o métodos fisicoquímicos. Ellos han tenido una creciente atención debido a su gran rango de aplicaciones en la industria alimenticia y farmacéutica. Pueden ser usados como promotores de crecimiento en plantas y agentes terapeuticos como anticoagulantes e inhibidores de tumores.

Las alginato liasas pueden degradar el alginato a través de la β -eliminación del enlace glicosídico y produce oligosacáridos insaturados con dobles enlaces en el final no reducido de la cadena. Un número de alginato liasas han sido identificadas, clonadas, purificadas y caracterizadas desde varias fuentes, entre ellas bacterias marinas y terrestres, moluscos, algas hongos y virus marinos (Tabla 13). Estas enzimas pueden ser clasificadas en 2 grupos en relación con su sustrato específico, peso molecular y modo de acción. Alginato liasa, especialmente alginato liasa con acción endolítica, han sido ampliamente usada en la producción de oligosacáridos de alginato. Además, la enzima alginato liasa ha mostrado un gran potencial en el tratamiento de la fibrosis cística a través de la degradación del biofilm polisacárido de las bacterias.

Tabla 13: Alginato liasas de diferentes fuentes y sus sustratos específicos

Organismo	Sustrato Específico	Referencia
<i>Pseudomonas sp. E03</i>	polyM	[68]
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	polyM, polyG	[69]
<i>Flavobacterium spS20</i>	polyG	[70]
<i>Halitos discus hannai</i>	polyM, polyG	[71]
<i>Chlorella virusATCV-1</i>	Alginato	[72]
<i>Sphingomonas sp. A1</i>	polyM, polyG	[73]
<i>Saccharophagus degradans</i>	polyM, polyG	[74]
<i>Pseudoalteromonas sp SM0524</i>	polyM, polyG	[75]

El alginato despolimerizado producido a través de una hidrólisis enzimática con bajo DO posee varios tipos de actividades biológicas. Los oligómeros de alginato obtenidos a partir de la degradación del alginato mediante enzimas alginato liasas tiene una función como oligosacáridos y actúa en los procesos de regulación fisiológica en plantas y microorganismos, por ejemplo, como promotor del crecimiento de *Bifidobacterium spp.*, realizando la germinación e iniciando el crecimiento en plantas. Los oligosacáridos exhiben muchas actividades fisiológicas, tales como, antitumor, estimulante de la producción de citoquinas, regulador de la concentración de lípidos y azúcar en la sangre [76].

Anexo C: Medios de Cultivo

Se diseñaron y realizaron 3 tipos de medios de cultivo para el crecimiento del hongo *Dendryphiella salina*, cepa 100654.

Medio Sólido

Para preparar 1 L de medio es necesario agregar (Tabla 14):

Tabla 14: Composición medio sólido.

Reactivo	Masa [gr]
NaNO ₃	3

K ₂ HPO ₄	1
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,5
KCl	0,5
FeSO ₄ *7H ₂ O	0,1
Agar	15
Extracto de Malta	3

1. Ajustar a pH 7 con HCl o NaOH y dejar incubando a 25 °C por 8 días.

Medio Líquido

Para preparar 1 L de medio es necesario agregar (Tabla 15):

Tabla 15: Composición medio líquido.

Reactivo	Masa [gr]
NaCl	15
MgCl ₂ x 6H ₂ O	1,9
MgSO ₄	4,74
KCl	0,72
NaHCO ₃	0,2
CaCl ₂	0,428
Base de Nitrógeno de Levadura (YNB)	4
Ácido Maleico	6
Tris Hidroximetil metano	6
Fuente de Carbono (Carboximetil celulosa o Alginato)	2

1. Añadir todas las sales y 40% del volumen de agua destilada del volumen total del medio a preparar.
2. Añadir lo que queda de agua, la fuente de carbono, la base de nitrógeno y los compuestos tampón (ácido maleico y buffer tris). Mezclar hasta ver una solución homogénea.
3. Medir pH y ajustar con NaOH 4M hasta alcanzar un pH final de 5,5.

Medio Complejo

Para preparar 1 L de medio es necesario agregar (Tabla 16):

Tabla 16: Composición medio complejo.

Reactivo	Masa [gr]
NaCl	15
MgCl ₂ x 6H ₂ O	1,9
MgSO ₄	4,74
KCl	0,72

NaHCO ₃	0,2
CaCl ₂	0,428
Base de Nitrógeno de Levadura (YNB)	4
Ácido Maleico	6
Tris Hidroximetil metano	6
Fuente de Carbono (Residuo)	89,9 (Anexo J)

1. Añadir todas las sales y 40% del volumen de agua destilada del volumen total del medio a preparar.
2. Añadir lo que queda de agua, la fuente de carbono, la base de nitrógeno y los compuestos tampón (ácido maleico y buffer tris).
3. Homogeneizar en licuadora.
4. Medir pH y ajustar con NaOH 4M hasta alcanzar un pH final de 5,5.

Anexo D: Metodología de Determinación de Peso Seco

Se mide el pH del medio. Para remover el alginato o la carboximetil celulosa del medio se calienta la muestra en baño de agua a 100°C por 10 minutos, luego la biomasa de los cultivos líquidos es recogida mediante filtración usando papel filtro Whatman 1 y se deja secar por 24 horas en estufa a 60°C. Se pesa el papel filtro antes de ser usado y después del proceso de secado.

Anexo E: Metodologías de Determinación de Proteína Total

Se describen las metodologías usadas para la determinación de proteína total en los medios líquido y complejo.

Método del Ácido Bicinconínico (BCA)

Es necesario preparar por separado el Reactivo A y Reactivo B, cuya mezcla constituye el reactivo de BCA.

Los componentes para preparar 1 L de Reactivo A, usando agua desionizada, se presentan en la Tabla 17.

Tabla 17: Compuestos para preparar reactivo A, en el método del Ácido Bicinconínico (BCA).

Compuesto	Masa gr
Ácido Bicinconínico	10
Carbonato de Sodio Monohidratado	20
Tartrato de Sodio	1,6
Hidróxido de Sodio	4
Bicarbonato de Sodio	9,5

Ajustar a pH 11,25 usando NaOH al 50%.

Los componentes para preparar 1 L de Reactivo B, usando agua desionizada, se presentan en la Tabla 18.

Tabla 18: Compuestos para preparar reactivo B, en el método del ácido bicinconínico (BCA).

Compuesto	Masa gr
Sulfato de Cobre Pentahidratado	40

Ambos reactivos deben ser guardados en botellas ámbar o recipientes oscuros.

Al momento de someter a análisis la muestra se realiza la mezcla del reactivo A con el reactivo B, con una proporción de 5 mL de reactivo A con 100 μ L de reactivo B, se mezcla y se forma el reactivo de BCA tomando una coloración morada. En una placa de 200 μ L se agregan 20 μ L de muestra y 200 μ L de reactivo BCA y se deja incubando a 60°C por 30 minutos. Luego se lee la absorbancia a 562 nm. Realizar una curva de calibración de proteína de suero albumina bovino cada vez que se realice el ensayo [77].

Método de Bradford [49]

1. Se prepara una solución disolviendo 100gr de Azul de Coomassie G250 en 50mL de etanol al 95%. Se adicionan 100mL de una solución de ácido fosfórico al 85% (p/v).
2. Para realizar el ensayo diluir la tinción del reactivo de Bradford 1:5 y filtrar con papel filtro.
3. Colocar 1000 μ L del reactivo diluido en un pocillo de placa de pozo profundo y agregar 20 μ L de muestra a cuantificar.
4. Colocar 210 μ L de cada mezcla anterior en cada pocillo de una placa de 96 pocillos.
5. Medir la absorbancia a 595nm y a 465nm.
6. Calcular la razón Abs_{595}/Abs_{465} para todas las muestras y restarles la razón Abs_{595}/Abs_{465} del blanco, según el caso.
7. Armar la curva de calibración con el estándar BSA [mg/mL] vs ratio Abs_{595}/Abs_{465} , insertando regresión lineal.
8. Calcular la concentración en mg/mL de proteína en cada muestra usando la curva de calibración y multiplicar por el factor de dilución.

Método de Nitrógeno Total Kjeldahl Simplificado (Hach)

Las muestras se preservan agregando ácido sulfúrico, hasta alcanzar un pH<2, se pueden guardar a una temperatura menor a 6°C hasta por 28 días.

Antes de realizar el método ajustar el pH de las muestras con NaOH, hasta 7.

Análisis usando el kit TNT plus 880 s-TKN de Hach.

1. Adicionar 1,3 mL de muestra, 1,3 mL de la solución A y una tableta del Reactivo B en un vial de digestión de 20 mm. Cerrar el tubo inmediatamente y no invertir el tubo.
2. Llevar el tubo de reacción a un bloque calefactor a 100°C por una hora.
3. Después de una hora, remover el tubo de reacción del bloque calefactor y enfriar a temperatura ambiente (15-20°C).
4. Remover la tapa del tubo de reacción y agregar 1 Micro Cap C al tubo. Cerrar e invertir el tubo de reacción 2-3 veces, hasta que no se vean más residuos se vean en la solución del tubo de reacción.
5. Tomar 0,5 mL de la muestra digestada desde el tubo de reacción al Test Vial 1 (vial rojo).
6. Agregar 0,2 mL de la Solución D al Test Vial 1. Rápidamente cerrar e invertir el vial 2-3 veces hasta que la solución se vea homogénea.
7. Tomar 1 mL de muestra no digestada y adicionar al Test Vial 2 (vial verde).
8. Agregar 0,2 mL de la Solución D al Test Vial 2. Rápidamente cerrar e invertir el vial 2-3 veces hasta que la solución se vea homogénea.
9. Después de 15 minutos, limpiar el Test Vial 1 con un papel limpio y leer en el espectrofotómetro. El instrumento leerá el código de barras del Test Vial 1 y aparecerá E1.
10. Limpiar el Test Vial 2 con un papel limpio y leer en el espectrofotómetro. El instrumento leerá el código de barra en el Test Vial 2.

Anexo F: Curva de Calibración de Proteína Albumina de Suero Bovino (BSA)

Tabla 19: Curva de calibración proteína BSA.

Tubo	Concentración mg/mL	Agua destilada mL	BSA (2 mg/mL) mL
1	0	1	0
2	0,1	0,95	0,05
3	0,25	0,875	0,125
4	0,5	0,75	0,25
5	0,7	0,65	0,35
6	1,0	0,50	0,50
7	1,5	0,25	0,75

Se prepara cada solución (Tabla 19) en tubos eppendorf de 1,5 mL y se guardan a -20°C, manteniendo siempre en hielo durante su uso.

Anexo G: Metodología de Determinación de Azúcares Reductores según el método de Miller (DNS)

Preparación del reactivo del ácido 3,5 dinitrosalicílico en caliente:

Se pesan 5 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS), 150 g de Tartrato de NaK y 8 g de NaOH. Se disuelve el NaOH en 200 mL de agua destilada y se añade en agitación el tartrato de NaK lentamente. Se completa con agua destilada hasta 400 mL y se comienza a añadir lentamente el ácido 3,5 dinitrosalicílico. Se deja en agitación toda la noche, se enrasa a 500 mL y se filtra. Se guarda en frasco color ámbar. La preparación del reactivo DNS en caliente se hace en agitación magnética y calentamiento.

Se colocan 100 μ L de muestra en una placa de 200 μ L y se añade 100 μ L de reactivo DNS, se incuba durante 10 minutos a 100°C. Se deja enfriar y se lee la absorbancia a 550 nm.

Anexo H: Curva de Calibración de Glucosa

Tabla 20: Curva de calibración Glucosa.

Tubo	Concentración mg/mL	Agua destilada mL	Glucosa (2 mg/mL) mL
1	0	1	0
2	0,1	0,95	0,05
3	0,25	0,875	0,125
4	0,5	0,75	0,25
5	0,7	0,65	0,35
6	1,0	0,50	0,50
7	1,5	0,25	0,75

Se prepara cada solución (Tabla 20) en tubos eppendorf de 1,5 mL y se guardan a -20°C, manteniendo siempre en hielo durante su uso.

Anexo I: Buffer de Degradación AL

Tabla 21: Receta Buffer de Degradación de Alginato Liasa (AL).

Reactivo	Volumen para preparar 50 mL de buffer
M9 10X pH 5,5	6,25 mL
Alginato Liasa	1,875 mL
Cloruro de Amonio 10%	12,5 mL
Azida de Sodio 5%	312 μ L
Agua Destilada	22,81 mL
Buffer Fosfato 1M pH 7,5	6,25 mL

En un vaso precipitado de 250 mL, preparar una solución de 8,99 g de residuos húmedo con 50 mL de agua destilada previamente sonicada, luego agregar 50 mL de buffer de degradación OAL (Tabla 21).

Mezclar con agitador magnético, tapan el vaso precipitado con Parafilm y dejar incubando a 37°C sin agitación por 24 horas.

Anexo J: Base de Cálculo

Cálculo de Cantidad de Residuo en Medio Complejo

En la Tabla 22 se muestran los parámetros más importantes del análisis proximal del residuo.

Tabla 22: Análisis proximal del residuo a trabajar.

Parámetro	%
Materia Seca	46,5
Proteína Cruda	15,8
Extracto No Nitrogenado	47,8

Para el medio complejo se requería una concentración de 2% p/p de fuente de carbono. Utilizando los datos de la Tabla 22 se realizaron los siguientes cálculos:

$$2\% \text{ p/p} = 20 \text{ g de fuente de carbono/L de medio}$$

$$0,478 \text{ fuente de carbono/peso seco} * 0,465 \text{ peso seco/residuo} \\ = 0,22227 \text{ fuente de carbono/residuo}$$

$$\text{cant. de residuo} = \frac{20 \text{ g de fuente de carbono/L de medio}}{0,22227 \text{ fuente de carbono/residuo}} \\ = 89,9 \text{ g de residuo/L de medio}$$

Calculo de proteína total a partir de nitrógeno total Kjeldahl (NTK)

$$PT [g/L] = \frac{NTK [mg/L] * FE * FD}{1000}$$

Donde:

NTK [mg/L]: corresponde al valor obtenido de nitrógeno total Kjeldahl presente en la muestra

FE: corresponde al factor estándar que relaciona el contenido de nitrógeno en aminoácidos a contenido proteico.

FD: corresponde al factor de dilución que posee la muestra.

1000: corresponde al cambio de unidad de mg a g.

Cómo ejemplo se tiene que para un valor de NTK de 6,82 [mg/L] se tiene:

$$PT [g/L] = \frac{6,82 [mg/L] * 6,25 * 400}{1000 [mg/g]} = 17,05 [g/L]$$

Calculo de proteína total presente en el medio complejo

Para realizar el cálculo de proteína total presente en el medio se sumaron los compuestos que aportan nitrógeno proteico, la Tabla 23 muestra la composición de la fuente de nitrógeno usada para suplementar el medio. Al realizar las transformaciones necesarias y sumar los compuestos que poseen nitrógeno proteico aporta un total de 75,43 mg/g de YNB agregado al medio.

Tabla 23: Composición de fuente de nitrógeno (YNB) agregado al medio.

6,7g en 100 ml	mg/L	mg/g
YNB	mg/L	mg/g
Sulfato de amonio	5000	74,62687
Animoácidos	50	0,74627
Biotina	0,002	0,00003
Pantotenato de Ca	0,4	0,00597
Ácido Fólico	0,002	0,00003
Inositol	2	0,02985
Niacina	0,4	0,00597
Ác. Aminobenzoico	0,2	0,00299
Cloridrato de piridoxina	0,4	0,00597
Riboflavina	0,2	0,00299
Cloridrato de Tiamina	0,4	0,00597
Ácido Bórico	0,5	0,00746
Sulfato de Cobre	0,04	0,00060
Ioduro de Potasio	0,1	0,00149
Cloruro de Hierro	0,2	0,00299
Sulfato de Manganeso	0,4	0,00597
Molibdato de Sodio	0,2	0,00299
Sulfato de Zinc	400	5,97015
Fosfato de Monopotasio	1000	14,92537
Sulfato de Magnesio	500	7,46269
Cloruro de Sodio	100	1,49254
Cloruro de Calcio	100	1,49254

Luego se sumó el aporte de nitrógeno de cada compuesto que forman parte del medio complejo, estos valores se presentan en la Tabla 24. Finalmente, el valor calculado es de 12,88 g/L de nitrógeno proteico.

Tabla 24: Aporte de nitrógeno de los compuestos que son parte del medio complejo.

Reactivo	[gr/L]
NaCl	0
MgCl ₂ x 6H ₂ O	0

MgSO ₄	0
KCl	0
NaHCO ₃	0
CaCl ₂	0
YNB	0,302
Ácido Maleico	0
Tris Hidroximetil metano	6
Residuos (Proteína cruda)	6,58

Calculo de escalamiento y proyección económica

Considerando una base de cálculo de 1 tonelada de residuos, la cantidad total de proteína que se podría obtener es:

$$1000 \text{ kg de residuo} \rightarrow 11123,5 \text{ L de medio}$$

$$11123,5 \text{ L de medio} * 24,2 \text{ gr de proteína/L de medio} = 269188,7 \text{ gr de proteína} \\ = 269,2 \text{ kg de proteína}$$

Los supuestos son:

1. Se necesita 89,9 gr de residuos para preparar 1 L de medio.
2. Se obtendrá la misma cantidad de proteína que en los cultivos de 10 mL realizados en los tubos cónicos.
3. Se realizará la cosecha al día 8 con obteniéndose una concentración de 24,2 g/L de proteína total en el medio (según los resultados presentados).
4. Se realizará un pretratamiento al residuo consistente en un rompimiento por ultrasonido seguido de una hidrólisis alcalina.

Calculo de Rendimientos de Fuentes de Carbono

Para determinar los rendimientos de biomasa presentados en la Tabla 9 se consideró en la fuente de carbono a estudiar (alginate y carboximetilcelulosa) y luego se sumo el compuesto del buffer que podría estar asimilando el hongo.

Los medios con los que se trabajó son todos iguales y tienen los compuestos buffer y la fuente de carbono a estudiar.

Para el caso del alginate se realizó el siguiente cálculo:

Se consideró la concentración de biomasa, determinada mediante peso seco en el día 10 de la curva (Figura 7) y se dividió en la concentración de alginate agregada al medio inicialmente:

$$\frac{1,25 \text{ [gramos de biomasa/litro de cultivo]}}{2 \text{ [gramos de alginate/litro de cultivo]}} = 0,625 \left[\frac{\text{gr de biomasa}}{\text{gr de alginate}} \right] = 62,5\%$$

Para el caso del alginate + ácido maleico se realizó el siguiente cálculo:

Se consideró la concentración de biomasa, determinada mediante peso seco en el día 10 de la curva (Figura 7) y se dividió en la concentración de alginato más la concentración de ácido maleico (compuesto usado como buffer) agregada al medio inicialmente:

$$\frac{1,25 \text{ [gramos de biomasa/litro de cultivo]}}{2 \text{ [gr alginato/lt cultivo] } + 6 \text{ [gr ácido maleico/lt cultivo]}} = 0,156 \left[\frac{\text{gr de biomasa}}{\text{gr fuente de carbono}} \right] = 15,6\%$$

Este mismo cálculo se realizó para el caso de la carboximetilcelulosa (CMC).