



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

EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS UNICELULARES UTILIZANDO *ULVA RIGIDA* COMO FUENTE DE CARBONO

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL QUÍMICO E
INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA**

YASSER JANNA UARAC VIVAR

PROFESOR GUÍA:
MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS

MIEMBROS DE COMISIÓN:
MARÍA ORIANA SALAZAR AGUIRRE
STEPHANIE BRAIN ISASI

PROYECTO FONDECYT: 1180794

SANTIAGO DE CHILE

2019

**RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR
AL TÍTULO DE:** Ingeniero Civil Químico e
Ingeniero Civil en Biotecnología.
POR: Yasser Janna Uarac Vivar
FECHA: 09/09/2019
PROFESOR GUÍA: María Elena Lienqueo
Contreras

EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS UNICELULARES UTILIZANDO ULVA RIGIDA COMO FUENTE DE CARBONO

Frente al aumento poblacional, la FAO proyecta un incremento de un 70% en la demanda de proteínas alimenticias, siendo la industria acuícola el principal foco que permite solventar esta necesidad. Por otra parte, el mercado salmonero chileno contribuye en un 27% de este mercado a nivel mundial, donde los salmones tienen una dieta rica en aminoácidos como la metionina. La principal fuente de alimentación de los salmones corresponde a harina de soya, pero ésta comprende una concentración de metionina menor a los requerimientos nutricionales de los salmónidos.

El proyecto FONDECYT N°1180794, tiene como objetivo desarrollar un suplemento alimenticio basado en proteínas enriquecidas con metionina, utilizando al hongo filamentoso *Trichoderma reesei* RUT-C30 como microorganismo productor. A su vez, el proyecto busca otorgar un valor agregado a las algas residuales industriales y costeras del país, por lo que este propone la producción de proteínas unicelulares mediante la fermentación del alga verde *Ulva rigida* por parte de *T. reesei* RUT-C30.

La presente investigación centra sus esfuerzos en evaluar las condiciones de temperatura y acidez en las cuales la producción de proteínas intracelulares sea vea favorecida. Las temperaturas evaluadas fueron de 25 [°C], 30 [°C] y 35 [°C], mientras que los pH evaluados fueron de 4,0, 4,8 y 5,5, generando así una matriz de 9 experimentos que combinan estas dos variables. Se añade que estos experimentos se realizaron en matraces que contenían 50 [mL] de una solución de *Ulva rigida* a una concentración de 25 [g/L], siendo agitados a 200 [rpm]. El método utilizado para medir la cantidad de proteínas generada fue mediante método de Bradford, mientras que las condiciones favorables se determinaron mediante la relación entre la concentración de proteínas y el peso húmedo de las células lisadas, denominada como relación másica.

De este modo, se determinó que a medida que aumenta la temperatura del medio a un pH dado, la relación másica disminuye. Por otra parte, a un pH 4,8, se observa una mayor relación másica, independiente de la temperatura utilizada. Por lo tanto, se determinó que la condición que favorece la producción proteica es la de 25 [°C] a un pH de 4,8. En función de lo anterior, se propone estudiar temperaturas inferiores a 25 [°C], y superiores a 20 [°C], para verificar si la relación másica aumenta o disminuye. Por último, los resultados obtenidos a partir esta investigación permitirán abordar el estudio de las condiciones óptimas de producción proteica en cepas recombinantes de *Trichoderma reesei* RUT-C30.

*Dedicado a todas las personas
que me brindaron su apoyo a lo largo de la carrera.*

En especial a mi Padre quién siempre estuvo presente.

AGRADECIMIENTOS

Quiero partir agradeciendo a mi familia, en especial a mi padre, a mi hermana y a mi tío Luis, por brindarme apoyo en todo este proceso que es la vida universitaria. Agradecerle a mi mejor amigo, Iván Henríquez, por estar presente en todo momento y por alentarme en este último año para poder terminar mi carrera. Agradezco a cada una de las amistades que forjé a lo largo de la carrera. A la Comunidad del Anillo (Puvlo, Negro, Krizz, Nacho, Matt, Kiwi y Glande <3) y a los Optimus Transformers (Samba, Purén, Gabox, y Constant) por ser mis primeros grupos de amigos que tuve en la U, y dentro de estos grupos destaco a Glande y a Constant con los que he estado juntos durante toda la carrera. A Lissett Rebolledo por ser mi primera amiga de la U, con la que compartí buenos momentos. A Yanara Tranamil por ser una gran amiga que me apoyó en mis altos y bajos. También agradezco a su familia, que me brindaron ayuda y su buen corazón. Al CEPC 2015 (Oscar, Flo, KB, Gabo Moya, Bernardo, Ale y Nico Avilés) por confiar en mí para sacar a flote actividades. A la OIS (Claudia, Pablo, Cueto, Reynaldo, Cristi, Maca, Ale y Vale) por darme mi primera práctica profesional y trabajo durante mi estadía en la U. Por más allá de estar relacionados por trabajo, agradezco también por ser amigos. A los cabros de Convergencia Izquierda (Elías, Sergei, Gabo Moya, Lema, Santi y Mati) por dejarme militar con ellos y compartir momentos graciosos molestando al Elías xD. A los Hidrociclones FC en todas sus versiones (Pipe, Alonso, David, López, Muri, Oñate, Tata, Monroy, Galleguillos, Corsini y Danton) por ser el equipo con más garra de IQBT. A los Rajadiablos (Oñate, JP, Mendoza, Xiang Pu San-O, Giovanni, Pancho, Lula, Villa, Krok, Rucia y Quezadilla) por apañar en este proyecto musical que fue un sueño cumplido para mí y apañar en todas las tocatas realizadas. Agradecimientos especiales a Oñate (RIP) por haber sido mi nakama en la banda y en el LOL. A mi grupo de Taller (Stefano, JT y MeissenBitchler) por sacar un proyecto anual adelante, y por soportarme como autodenominado líder. Al grupo que siempre cambia de nombre (Macka, JT, MiNiño, Galleguillos, Kurt, Glande <3 y Constant) y a Chanco, por hacerme los días más amenos en la U, compartiendo chelas, carretes y risas. A Coni Santibañez, por soportarme 3 años como expareja a lo largo de la carrera, te deseo de kokoro lo mejor a ti y a tu familia. A Bonilla, a Pedro (Jofré) y al Tata por apañar a sus LOL en cada ventana. A Vanessa Vargas por entregarme su cariño, sus consejos y su ánimo para seguir adelante. Al Santi por ser ese amigo ricachón que siempre estuvo ahí para alegrías. A mis ángeles de Chayanne (Josefa, Jael y Gabi) por estar siempre en la salita de los Pc esperándome con una sonrisa que iluminaba mis días y noches. A los tíos de IQBT (Don Raúl, Manuel, Pedro y Juanito) por obrar siempre por el bien del depto. A Gerardo Flores, por ser un gran amigo. Al Cayetana, por hacerme sentir rico todo el año. A la profe Mel por confiar en mí y facilitarme un tema de tesis. A Stephanie, por guiarme en el lab y corregirme cuando se debía. A la Gatu por tatuarme. A Coni Escobar por ser la mejora compañera de práctica. A la Walla por arreglarme la bici cuando lo requería. Y a Gina Madariaga por ser la mejor secretaria del mundo, que sin su ayuda no me titulaba <3.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|----|
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1. Intecedentes generales | 1 |
| 1.1.1. Demanda mundial proteica y el mercado del salmón | 1 |
| 1.1.2. conflicto y potencial de las algas verdes..... | 4 |
| 1.1.3. Composición química de macroalgas del género <i>Ulva</i> | 7 |
| 1.1.4. <i>Trichoderma reesei</i> | 9 |
| 1.2. Proyecto FONDECYT n°1180794 | 13 |
| 1.2.1. Antecedentes | 13 |
| 1.2.2. Objetivos | 13 |
| 1.2.2.1. Objetivo general | 13 |
| 1.2.2.2. Objetivos específicos..... | 13 |
| 2. Materiales y metodología | 14 |
| 2.1. Condiciones de cultivo | 14 |
| 2.2. Medio de cultivo | 14 |
| 2.2.1. Molienda y tamizado..... | 14 |
| 2.2.2. Medio de cultivo en placa | 15 |
| 2.2.3. Medio de cultivo en matraz..... | 15 |
| 2.3. Muantificación de proteínas | 16 |
| 2.4. Equipamiento | 17 |
| 2.5. Análisis estadístico..... | 17 |
| 3. Resultados y discusión | 20 |
| 3.1. Cultivo de <i>T. reesei</i> en medio líquido en matraces | 21 |
| 3.2. Evaluación del contenido de proteínas en cultivos de <i>T. reesei</i> crecidos en biomasa algal como fuente de carbono | 23 |
| 3.3. Efectos de las condiciones de cultivo sobre la biomasa y el sustrato residual | 31 |
| 3.4. Efectos de las condiciones de cultivo sobre relación másica..... | 35 |
| 3.5. Aspectos metodológicos para considerar en el trabajo experimental . | 44 |
| 4. Conclusiones | 45 |
| 5. Recomendaciones | 47 |
| 6. Bibliografía..... | 48 |
| 7. Anexos..... | 52 |
| 7.1. Anexo A: Resultados preliminares de la primera fase..... | 52 |

| | |
|--|----|
| 7.2. Anexo B: Ejemplo de cálculo - curva de calibración y concentración de proteínas | 53 |
| 7.3. Anexo C: Ejemplo de análisis - mediciones de parámetros | 54 |
| 7.4. Anexo D: Ejemplo de cálculo - relación másica | 55 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1: Caracterización aminoacídica de la harina de pescado y de los productos derivados de la soya. Se destaca la concentración de metionina.. ... | 3 |
| Tabla 2: Porcentaje de remoción de amonio, nitrato y fosfato según especie de macroalga..... | 6 |
| Tabla 3: Composición química de <i>Ulva meridionalis</i> y <i>Ulva ohnoi</i> | 7 |
| Tabla 4: Composición macromolecular de <i>Ulva rigida</i> presente en las costas de Coquimbo..... | 8 |
| Tabla 5: Monómeros de azúcar presentes en <i>Ulva rigida</i> procedente de las costas de Coquimbo según total de carbohidratos..... | 8 |
| Tabla 6: Minerales presentes en <i>Ulva rigida</i> procedente de las costas de Coquimbo..... | 8 |
| Tabla 7: Caracterización aminoacídica de las proteínas presentes en <i>Ulva rigida</i> procedente de las costas de Coquimbo y Puerto Montt..... | 9 |
| Tabla 8: Cepas de <i>Trichoderma reesei</i> asociadas a su producción de proteína extracelular y actividad celulolítica. Valores obtenidos tras 14 días de fermentación en un reactor de 10 [L], utilizando algodón molido como fuente de carbono..... | 10 |
| Tabla 9: Condiciones de cultivo utilizados en estudios que cultivan <i>Trichoderma reesei</i> | 10 |
| Tabla 10: Niveles de producción de SCP de <i>Trichoderma reesei</i> , utilizando pulpa de remolacha como sustrato. Resultados a 30 [°C] y pH inicial 5,0. | 11 |
| Tabla 11: Etapas del proyecto FONDECYT 1180794..... | 13 |
| Tabla 12: Lista de experimentos realizados que combinan las condiciones de cultivo de temperatura y pH..... | 14 |
| Tabla 13: Composición del medio mínimo de cultivo derivado de Mohagheghi et al. | 15 |
| Tabla 14: Equipos utilizados durante la experiencia de laboratorio..... | 17 |
| Tabla 15: Listado de las metodologías experimentales utilizados en los diferentes experimentos..... | 20 |

| | |
|--|----|
| Tabla 16: Número de réplicas biológicas y analíticas según experimento. | 23 |
| Tabla 17: Análisis estadístico t-student para evaluar diferencias significativas entre las concentraciones proteicas de las muestras inoculadas y de control. Caso a 25 [°C]. Si valor P es menor a 0,05, entonces la diferencia es significativa. | 24 |
| Tabla 18: Análisis estadístico t-student para evaluar diferencias significativas entre las concentraciones proteicas de las muestras inoculadas y de control. Caso a 30 [°C]. Si valor P es menor a 0,05, entonces la diferencia es significativa. | 26 |
| Tabla 19: Análisis estadístico t-student para evaluar diferencias significativas entre las concentraciones proteicas de las muestras inoculadas y de control. Caso a 35 [°C]. Si valor P es menor a 0,05, entonces la diferencia es significativa. | 27 |
| Tabla 20: Correlación entre las condiciones de cultivo, las máximas diferencias de concentración obtenidas y la productividad asociada. | 27 |
| Tabla 21: Análisis estadístico t-student para evaluar diferencias significativas entre las relaciones másicas de las muestras inoculadas a diferentes pH inicial según día. Caso a 25 [°C]. Si valor P es menor a 0,05, entonces la diferencia es significativa. | 37 |
| Tabla 22: Análisis estadístico t-student para evaluar diferencias significativas entre las relaciones másicas de las muestras inoculadas a diferentes pH inicial. Caso a 30 [°C]. Si valor P es menor a 0,05, entonces la diferencia es significativa. | 38 |
| Tabla 23: Análisis estadístico t-student para evaluar diferencias significativas entre las relaciones másicas de las muestras inoculadas a diferentes pH inicial. Caso a 35 [°C]. Si valor P es menor a 0,05, entonces la diferencia es significativa. | 39 |
| Tabla 24: Análisis estadístico t-student para evaluar diferencias significativas entre las relaciones másicas de las muestras inoculadas a diferentes temperaturas según día. Caso a pH inicial 4,0. Si valor P es menor a 0,05, entonces la diferencia es significativa. | 41 |
| Tabla 25: Análisis estadístico t-student para evaluar diferencias significativas entre las relaciones másicas de las muestras inoculadas a diferentes temperaturas según día. Caso a pH inicial 4,8. Si valor P es menor a 0,05, entonces la diferencia es significativa. | 41 |

| | |
|--|----|
| Tabla 26: Análisis estadístico t-student para evaluar diferencias significativas entre las relaciones másicas de las muestras inoculadas a diferentes temperaturas según día. Caso a pH inicial 5,5. Si valor P es menor a 0,05, entonces la diferencia es significativa. | 43 |
| Tabla 27: Condiciones de cultivo para determinación de concentración inicial óptima de <i>Ulva rigida</i> | 52 |
| Tabla 28: Absorbancias medidas a 595 [nm] para diferentes concentraciones de BSA. Caso 30 [°C] – pH 4,0 – Día 0 – Parte 1. | 53 |
| Tabla 29: Absorbancias medidas a 595 [nm] para las muestras analíticas de los matraces inoculados y control, junto con las concentraciones de proteína que representan. Caso 30 [°C] – pH 4,0 – Día 0 – Parte 1..... | 54 |
| Tabla 30: Mediciones de masa de pellet para la condición de cultivo de 30 [°C] y pH inicial 4,0..... | 54 |
| Tabla 31: Mediciones de masa de pellet para la condición de cultivo de 30 [°C] y pH inicial 4,0..... | 55 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Proyección de la población mundial estimada por la FAO | 1 |
| Figura 2: Niveles de exportación de los distintos productos alimenticios según los dólares de venta..... | 2 |
| Figura 3: Precio de oferta histórica y de proyección, en \$USD, de los alimentos de pesca según toneladas..... | 2 |
| Figura 4: a) Fotografía aérea de los efectos de la marea verde en las costas de Qingdao, China. b) Esquematación de la eutroficación producida por los desechos acuícolas en las costas de Qingdao, China | 5 |
| Figura 5: <i>Trichoderma reesei</i> RUT-C30 cultivada en medio sólido de 25 [g/L] de <i>Ulva rigida</i> | 9 |
| Figura 6: Distribución espacial de las muestras analíticas en microplaca de 96 pocillos. En columnas 1 y 2, desde la fila A hasta la fila H, se encuentra diluido BSA de manera seriada, es decir, de 0 [mg/mL] (en blanco) hasta 7 [mg/mL] (en azul). En columnas 3, 4 y 5, se encuentran diluidas las muestras analíticas que contienen <i>Trichoderma reesei</i> RUT-C30 (Azul y Verde) y los controles negativos (Amarillo)..... | 16 |
| Figura 7: Algoritmo de decisión para la elección del tipo de prueba t-student. | 19 |
| Figura 8: Cultivos líquidos de <i>Ulva rigida</i> más medio mínimo en el día 5. A la derecha matraz inoculado con <i>Trichoderma reesei</i> RUT-C30, a la izquierda matraz de control negativo. | 21 |
| Figura 9: Partículas de alga en suspensión para cultivos inoculados y de control tras 8 días post inoculación. A) Partículas de <i>Ulva rigida</i> suspendidas en matraz de control. B) Aglomeraciones celulares y <i>Ulva rigida</i> suspendida en matraz inoculado..... | 22 |
| Figura 10: Resultado de la homogenización de los cultivos mediante minipimer. A) y B) cultivos inoculados tras 8 días de crecimiento. C) Cultivo control que comprende <i>Ulva rigida</i> y medio mínimo. | 22 |
| Figura 11: Gráfico comparativo de la concentración de proteínas intracelulares en función del tiempo, entre los cultivos con temperatura 25 [°C] a diferentes pH. Número de muestras para cada cultivo definido entre paréntesis en la leyenda. | 24 |

Figura 12: Gráfico comparativo de la concentración de proteínas intracelulares en función del tiempo, entre los cultivos con temperatura 30 [°C] a diferentes pH. Número de muestras para cada cultivo definido entre paréntesis en la leyenda. 25

Figura 13: Gráfico comparativo de la concentración de proteínas intracelulares en función del tiempo, entre los cultivos con temperatura 35 [°C] a diferentes pH. Número de muestras para cada cultivo definido entre paréntesis en la leyenda. 26

Figura 14: Gráfico comparativo de la concentración de proteínas intracelulares en función del tiempo, entre los cultivos con pH 4,0 a diferentes temperaturas. Número de muestras para cada cultivo definido entre paréntesis en la leyenda. 28

Figura 15: Gráfico comparativo de la concentración de proteínas intracelulares en función del tiempo, entre los cultivos con pH 4,8 a diferentes temperaturas. Número de muestras para cada cultivo definido entre paréntesis en la leyenda. 29

Figura 16: Gráfico comparativo de la concentración de proteínas intracelulares en función del tiempo, entre los cultivos con pH 5,5 a diferentes temperaturas. Número de muestras para cada cultivo definido entre paréntesis en la leyenda. 29

Figura 17: Gráfico comparativo de la concentración del pellet en función del tiempo, entre los cultivos con temperatura 25 [°C] a diferentes pH iniciales. Número de muestras para cada cultivo definido entre paréntesis en la leyenda. 31

Figura 18: Gráfico comparativo de la concentración de pellet en función del tiempo, entre los cultivos con temperatura 30 [°C] a diferentes pH iniciales. Número de muestras para cada cultivo definido entre paréntesis en la leyenda. 32

Figura 19: Gráfico comparativo de la concentración de pellet en función del tiempo, entre los cultivos con temperatura 35 [°C] a diferentes pH iniciales. Número de muestras para cada cultivo definido entre paréntesis en la leyenda. 33

Figura 20: Gráfico comparativo de variación de pH y concentración de pellet en función del tiempo, entre los cultivos inoculados a diferentes pH iniciales y a temperatura constante de 25 [°C]. Número de muestras para cada cultivo definido entre paréntesis en la leyenda. 33

| | |
|---|----|
| Figura 21: Gráfico comparativo de variación de pH y concentración de pellet en función del tiempo, entre los cultivos inoculados a diferentes pH iniciales y a temperatura constante de 30 [°C]. Número de muestras para cada cultivo definido entre paréntesis en la leyenda. | 34 |
| Figura 22: Gráfico comparativo de variación de pH y masa de pellet en función del tiempo, entre los cultivos inoculados a diferentes pH iniciales y a temperatura constante de 35 [°C]. Número de muestras para cada cultivo definido entre paréntesis en la leyenda. | 34 |
| Figura 26: Gráfico comparativo de la relación másica en función del tiempo, entre los cultivos con temperatura 25 [°C] a diferentes pH iniciales. Número de muestras para cada cultivo definido entre paréntesis en la leyenda. | 36 |
| Figura 27: Gráfico comparativo de la relación másica en función del tiempo, entre los cultivos con temperatura 30 [°C] a diferentes pH iniciales según día. Número de muestras para cada cultivo definido entre paréntesis en la leyenda. | 37 |
| Figura 28: Gráfico comparativo de la relación másica en función del tiempo, entre los cultivos con temperatura 35 [°C] a diferentes pH iniciales según día. Número de muestras para cada cultivo definido entre paréntesis en la leyenda. | 38 |
| Figura 29: Gráfico comparativo de la relación másica en función del tiempo, entre los cultivos con pH 4,0 a diferentes temperaturas. Número de muestras para cada cultivo definido entre paréntesis en la leyenda. | 40 |
| Figura 30: Gráfico comparativo de la relación másica en función del tiempo, entre los cultivos con pH 4,8 a diferentes temperaturas. Número de muestras para cada cultivo definido entre paréntesis en la leyenda. | 41 |
| Figura 31: Gráfico comparativo de la relación másica en función del tiempo, entre los cultivos con pH 5,5 a diferentes temperaturas. Número de muestras para cada cultivo definido entre paréntesis en la leyenda. | 42 |
| Figura 32: Gráfico de concentración de proteína soluble en función de la concentración de <i>Ulva rigida</i> inicia y del tiempo. Producción mediante <i>Trichoderma reesei</i> RUT-C30. | 52 |
| Figura 33: Curva de calibración de absorbancia en función de Albúmina de Suero Bovino (BSA). Caso 30 [°C] - pH 4,0 - Día 1 - Parte 1..... | 53 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES GENERALES

1.1.1. DEMANDA MUNDIAL PROTEICA Y EL MERCADO DEL SALMÓN

Estudios realizados por la Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas (FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) en el año 2017, proyectan que la demanda de proteínas a nivel mundial aumentará en un 20% para el año 2020 [1], mientras que para el año 2050 se espera un incremento en la demanda de un 70%. Todo lo anterior, debido a la proyección del crecimiento de la población mundial cercana al 33% para el año 2050, respecto al año 2015 (Ver Figura 1) [2][3].



Figura 1: Proyección de la población mundial estimada por la FAO [2].

Centrándose la demanda alimenticia en productos marinos, la FAO estima que para el año 2030 estos aumentarán en 37 millones de toneladas por sobre los 48 millones de toneladas que a la fecha se producen [4]. En consecuencia, el mercado salmonero tenderá a aumentar, consecuencia de que es uno de los productos marinos con mayor contenido proteico [5]. Lo anterior se refleja en lo estipulado por la Fundación Británica de Nutrición (*British Nutrition Foundation*), la cual enuncia que el salmón posee una concentración de 24,2 [g] de proteínas por cada 100 [g] del pez [5]. Asimismo, el salmón cuenta con una retención proteica del 31%, porcentaje que está por sobre las estudiadas para bovinos, porcinos y ovinos [6]. Se destaca que la retención proteica es la capacidad que tienen los animales y las plantas para retener en sus tejidos las proteínas que son consumidas por éstos.

Por otro lado, el mercado del salmón para Chile significa un gran porcentaje de ingresos por exportación de alimentos, siendo para el año 2017 el alimento que generó mayores ingresos para el país con US\$ 4.631 millones (Ver Figura 2) [4][7]. Los ingresos por exportación de salmón nacional equivalen a 791 mil toneladas, representando a un 27% de las exportaciones de salmón a nivel mundial, y al 1,7% de la demanda actual de productos marinos.

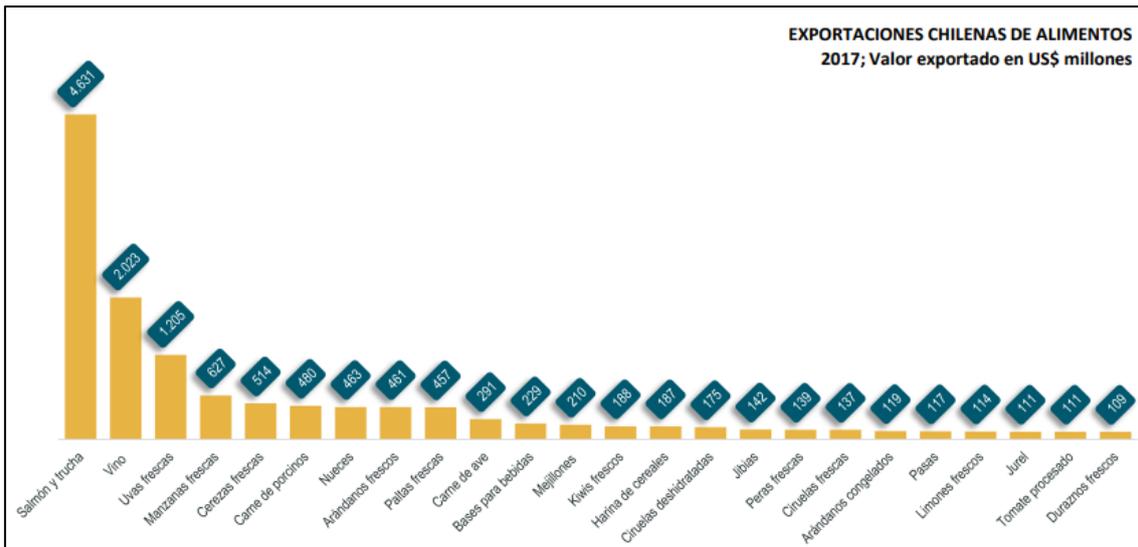


Figura 2: Niveles de exportación de los distintos productos alimenticios según los dólares de venta [7].

En relación con el cultivo de los salmones, estos son alimentados con harina de pescado, harina de soya y concentrado de proteína de soya. Sin embargo, cada uno de estos alimentos presentan falencias que harán inviable el cultivo de esta especie en el corto y largo plazo [8].

En primera instancia, la harina de pescado es un producto que a largo plazo se ve inviable como alimento para acuicultura por la fuerte alza en el costo desde el año 2001 (Ver Figura 3), proyectando para el año 2026 alcance valores de US\$ 2.000 por tonelada [9].

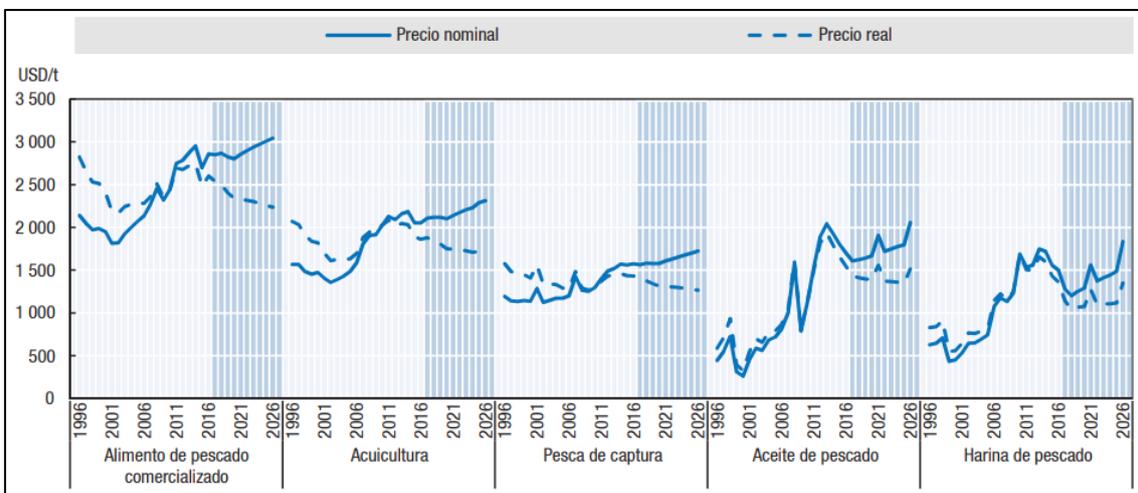


Figura 3: Precio de oferta histórica y de proyección, en \$USD, de los alimentos de pesca según toneladas[9].

En segundo lugar, la harina de soya es un alimento que contiene varios factores anti nutricionales (ANF's), donde destacan principalmente lectinas e inhibidores de proteasas. En cuanto a las lectinas, estudios demuestran que estas producen hiperplasia e hipertrofia en el intestino del salmón, mientras que los inhibidores de proteasas disminuyen la digestibilidad de las proteínas en el salmón [10].

En tercer lugar, el concentrado de proteína de soya es un alimento que presenta un mayor contenido proteico en comparación a la harina de soya, siendo este cercano al 70% p/p como mínimo, versus que el contenido proteico de la harina de soya que alcanza un máximo de 55% p/p. Asimismo, el concentrado de proteína de soya posee una menor concentración de ANF's que la harina de soya. Sin embargo, a pesar de sus beneficios en cuanto a composición, el precio de mercado del concentrado proteico de soya es entre 2,0 y 2,5 veces superior a la harina de soya [8], [10], [11].

Por otra parte, los alimentos en base a soya no son capaces de suministrar a los salmones todos los aminoácidos esenciales, siendo la metionina el aminoácido limitante que debe ser complementado mediante harina de pescado o metionina sintética (syntethic DL-Met) [12]. A continuación, en la Tabla 1 se visualiza, de manera comparativa, las composiciones aminoacídicas de la harina de pescado y de los alimentos en base de soya mencionados con anterioridad, destacando la diferencia en la concentración de metionina [11],[13].

Tabla 1: Caracterización aminoacídica de la harina de pescado y de los productos derivados de la soya. Se destaca la concentración de metionina. [11], [13].

| Aminoácido | Concentración [g/16g N] | | | |
|----------------------|-------------------------|----------------|-----------------------------------|------------------|
| | Harina de Pescado | Harina de Soya | Concentrados de proteínas de soya | |
| | | | Lavado con alcohol | Lavado con ácido |
| Alanina | 6,31 | 4,00 | 4,86 | 4,03 |
| Arginina | 6,37 | 6,95 | 7,98 | 6,46 |
| Ác. Aspártico | 8,54 | 11,26 | 12,84 | 11,28 |
| Cisteína | 0,93 | 1,45 | 1,40 | 1,36 |
| Ác. Glumático | 12,79 | 17,18 | 20,20 | 18,52 |
| Glicina | 9,92 | 3,99 | 4,60 | 4,60 |
| Histidina | 2,01 | 2,60 | 2,64 | 2,59 |
| Isoleucina | 3,70 | 4,80 | 4,80 | 5,26 |
| Leucina | 6,48 | 6,50 | 7,90 | 8,13 |
| Lisina | 6,90 | 5,70 | 6,40 | 6,67 |
| Metionina | 2,60 | 1,34 | 1,40 | 1,40 |
| Fenilalanina | 3,29 | 4,72 | 5,20 | 5,61 |
| Prolina | 5,34 | 4,72 | 6,00 | 5,32 |
| Serina | 4,75 | 5,00 | 5,70 | 5,97 |
| Treonina | 3,85 | 4,27 | 4,46 | 3,93 |
| Triptófano | 0,94 | 1,80 | 1,60 | 1,35 |
| Tirosina | 2,60 | 3,40 | 3,70 | 4,37 |
| Valina | 4,47 | 4,60 | 5,00 | 5,57 |

Retomando la importancia de la metionina en la alimentación del salmón, se han realizado estudios sobre los efectos en el crecimiento, y en la absorción de nutrientes, de los salmones atlánticos (*Salmo salar* L.) al momento de alterar la concentración de metionina en su dieta. En primera instancia, se ha descubierto que dicha especie de salmón acelera su crecimiento cuando es alimentado con harina de pescado en comparación si es alimentado con harina de soya y con concentrados de proteína de soya suplementados con metionina

sintética (Synthetic DL Met). A partir de lo anterior, investigadores afirman que la absorción a nivel intestinal de las proteínas se ve favorecida cuando la metionina se encuentra en abundancia en sus cadenas, no así, cuando esta se encuentra separada [14].

En segunda instancia, se ha descubierto que los niveles de grasa en estos animales disminuyen conforme al aumento en los niveles de metionina en la ingesta. Lo anterior se debe a que la metionina ayuda en el transporte de los lípidos a través del torrente sanguíneo, permitiendo el ingreso de estos en las células para su transformación en energía [15]. Se destaca que una disminución en los niveles óptimos de metionina en la ingesta de los salmones, es decir, niveles por debajo de los 2,2 [g] de metionina por cada 100 [g] de proteínas, favorece la producción de la enzima ácido graso sintasa (*Fatty acid synthase-FAS*), lo cual genera un aumento en los niveles de grasa en el animal a nivel del hígado, y lo que trae por consecuencia la susceptibilidad de contraer enfermedades hepáticas no alcohólicas [16][17].

Por otro lado, y bajo un aspecto económico, el precio de mercado de la metionina sintética (Synthetic DL Met) es aproximadamente US\$ 4,8/kg [18], aumentando los costos operacionales en las empresas salmoneras que alimentan mediante productos provenientes de la soya.

En vista a que la producción de alimentos ricos en metionina se ve afectada principalmente por las alzas en los costos de producción, se requiere de la búsqueda de una vía de producción que brinde la posibilidad de obtener una alta productividad, bajo costos, y que asegure las características favorables para el crecimiento del animal. Además, surge la necesidad de encontrar una solución que logre combatir el alza en la demanda del salmón, cerciorando que el contenido proteico y nutricional en estos animales se mantenga o aumente, para así suplir la demanda proteica que se espera para los años 2020 y 2050.

1.1.2. CONFLICTO Y POTENCIAL DE LAS ALGAS VERDES

Las algas *Chlorophyceae* del género *Ulva*, presentes en las costas centro-norte de Chile, son reconocidas por la formación de grandes floraciones llamadas "mareas verdes" (también conocidas como *Green Tides*) que se acumulan en el agua y en las playas. Estas floraciones son producidas por la eutroficación a partir de efluentes antropogénicos no controlados y/o a condiciones ambientales extraordinarias (como lo son el Fenómeno de "El Niño" y el cambio climático), y generan impactos económicamente negativos tanto en la industria acuicultura, como en el sector turístico [19].

A nivel mundial, se han reportado problemas de marea verde a lo largo de Europa, Oceanía, Asia y África, siendo el caso más conocido el ocurrido en China el año 2008, en donde debido al aumento de nitrógeno por la presencia de escurrimientos acuícolas en las costas de Qingdao (China), se produjo el fenómeno de eutroficación originando floraciones a lo largo de toda la zona costera. Dicho fenómeno generó pérdidas millonarias tanto para los organismos estatales, como para la misma industria acuícola, las cuales están valoradas en US\$ 30 millones y US\$ 100 millones, respectivamente. A continuación, en la

Figura 4 se representa el conflicto provocado en las costas de Qingdao (China), producto de la eutroficación [19].

Otro ejemplo de problemas por floración de marea verde fue el ocurrido en las costas de Gran Bretaña entre los años 2009 y 2011, en donde debido a la liberación de ácido sulfhídrico al ambiente por descomposición de *Ulva*, se ocasionó la muerte de 31 animales de rebaño. Dicho suceso fue reportado por la prensa local, encabezando en los titulares que las costas estaban contaminadas con algas tóxicas para el humano, generando repercusiones negativas en el turismo local. Además, gobierno de la zona afectada tuvo pérdidas económicas referentes a la mitigación de 100.000 toneladas de *Ulva* costera, teniendo un costo aproximado por retiro de entre US\$ 10-150 por tonelada [19].

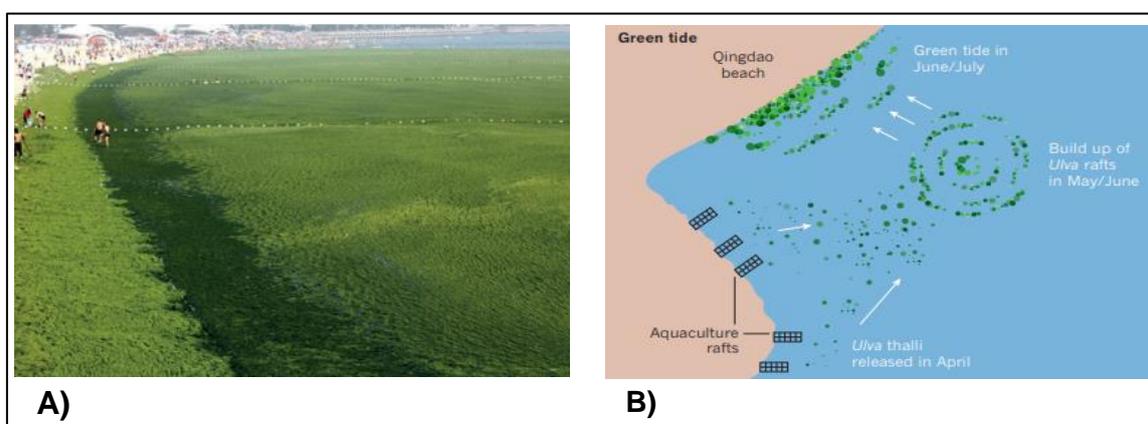


Figura 4: a) Fotografía aérea de los efectos de la marea verde en las costas de Qingdao, China. b) Esquemática de la eutroficación producida por los desechos acuícolas en las costas de Qingdao, China [19].

Por otra parte, para el caso chileno, en los años 2003 y 2010 producto de los cambios climatológicos que sufrió el país, se generaron problemas de eutroficación en las costas de Algarrobo (2010) y en un río de Dichato (2003), siendo para el primero *Ulva lactuca* el alga en cuestión, y *Enteromorpha* sp. para el segundo caso. Para ambos casos no hay antecedentes en cuanto a los costos de remoción, sólo reportes cualitativos respecto al impacto socioeconómico [20], [21]. Se tiene noción que la empresa Seco S.A. realiza retiro y secado de algas pardas y rojas en el territorio nacional, sin embargo, no hay información respecto al costo del servicio [22].

En relación con el principio de eutroficación, a la falta de regulación ambiental en Chile, y a prevención de la formación de mareas verdes por acción antropogénica, el Instituto de Fomento Pesquero (IFOP) en el año 2013 propuso la utilización de algas para la biorremediación de las aguas marinas. Esta biorremediación abarcaría principalmente la captación de dióxido de carbono (CO_2), seguido de amonio (NH_4^+), nitrato (NO_3^-) y fosfato (PO_4^{3-}), que son los nutrientes que mayormente se presentan (a niveles tóxicos) en sistemas de maricultura animal [23].

Las macroalgas propuestas por el IFOP para la biorremediación acuícola se basan en los estudios de Dellarossa (2010), los cuales midieron la capacidad

de remoción de los nutrientes anteriormente mencionados, y los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 2 [23][24].

Tabla 2: Porcentaje de remoción de amonio, nitrato y fosfato según especie de macroalga [23] [24].

| Macroalga | Porcentaje de remoción (%) | | |
|-----------------------------|----------------------------|---------|-----------|
| | Amonio | Nitrato | Fosfato |
| <i>Sarcothalia crispata</i> | 92,4 | 97,7 | 42,0-49,0 |
| <i>Gracilaria chilensis</i> | 94,6 | 88,6 | |
| <i>Ulva lactuca</i> | 92,1 | 91,9 | |

En adición, el IFOP comparó la capacidad de retención de CO₂ a partir de la producción primaria neta¹. Esta comparación la realizó para las macroalgas del género *Ulva* y *Gracilaria*, siendo 1.038 y 600 [g C/(m²-año)] la producción primaria neta respectivamente. Se destaca que el máximo valor registrado para este parámetro, en el caso de las macroalgas, es de 1.900 [g C/(m²-año)] [23].

Es así como, en base a la información de la Tabla 2, a la producción primaria neta y a los antecedentes sobre los conflictos de marea verde, se puede establecer que las macroalgas del género *Ulva* son un buen candidato para la biorremediación de sectores marinos acuícolas.

En cuanto al mercado de las algas en Chile, éste se centra en la venta de algas pardas y rojas, tales como: el Huiro Negro (*Lessonia berteorana*), el Huiro Palo (*Lessonia trabeculata*), el Cochayuyo (*Durvillaea antártica*), el Luga Negra (*Sarcothalia crispata*) y el Luga roja (*Gigartina skottsbergii*), siendo un mercado valorado en US\$87,7 millones al año 2018 [25]. Se destaca que dichos productos se destinan principalmente para la extracción de componentes de alto valor, como lo son el carragenano, el agar y el alginato. Además, los residuos generados tras la extracción, los cuales contienen porcentajes entre 27-60% de celulosa (porcentaje que depende del tipo de alga, del componente a extraer y su procedimiento), son utilizados frecuentemente para sacarificación mediante microorganismos, sin embargo, no existe registro de la producción de proteínas intracelulares con estos residuos.

Por otra parte, el mercado de algas verdes, y en específico el mercado de *Ulva* sp., actualmente se centra en la producción de biocombustibles y biofertilizantes. Estos productos no resultan atractivos para la inversión privada, sin embargo, se han realizado estudios que buscan otorgarle un potencial económico a las algas verdes, siendo el principal foco la producción de alimentos con alto contenido proteico. Es aquí en donde ingresa el concepto de proteínas unicelulares (*Single Cell Protein - SCP*), las cuales son proteínas brutas o refinadas sintetizadas a partir de microorganismos tales como: algas, bacterias, hongos y/o levaduras, que se utilizan para el alimento animal o humano [26].

Ejemplo de ello, son los estudios de Félix y Brindo en el año 2014, que reportan que un consorcio de *Saccharomyces cerevisiae* con *Lactobacillus* sp.

¹ Se define a la producción primaria neta como la cantidad de energía que es capaz de aprovechar una especie. En el caso de las algas, esta se mide por la cantidad de CO₂ que es capaz de retener. (CO₂ retenido = CO₂ fijado por fotosíntesis – CO₂ utilizado por respiración celular)

permitió generar un alimento que aumenta el contenido proteico basal de *Ulva lactuca*, aumento que asciende de un 21,0% (contenido basal) a un 30,4%. Lo anterior, tras la fermentación láctica y alcohólica del alga después de tres días desde la inoculación [27]. Otro ejemplo de generación de alimentos de alto contenido proteico a partir de *Ulva* sp., es la investigación realizada por Uchida et al. en el año 1997, la cual mediante la fermentación de *Ulva* sp. utilizando cepas de *Pseudoalteromonas espejiana* logró generar alimentos que duplicaban el contenido proteico del alga en cuestión [28].

Amparado lo expuesto con anterioridad, sumado que se tienen indicios de que las algas del género *Ulva* crecen a lo largo de toda la costa continental y oceánica del país (desde Arica hasta Magallanes) [29], se puede posicionar a Chile como uno de los principales explotadores primarios de estas algas verdes, expandiendo así el mercado exportador general de algas que, al año 2018, alcanzaba valores de producción iguales a 132.950 toneladas [25].

1.1.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE MACROALGAS DEL GÉNERO *ULVA*

Diversos estudios de composición han determinado las macromoléculas presentes en diferentes algas del género *Ulva*, como fue el caso de los estudios de Msuya y Neori (2008) que determinaron que, bajo ciertas condiciones de cultivo, el *Ulva lactuca* podría alcanzar niveles proteicos del 45% en peso seco [30]. Por otro lado, Tsubaki et al. (2014) determinaron diferencias en las composiciones de dos especies oceánicas, *Ulva meridionalis* y *Ulva ohnoi* específicamente, y estas diferencias que se pueden observar en la Tabla 3.

Tabla 3: Composición química de *Ulva meridionalis* y *Ulva ohnoi*.

| Macromolécula | Composición química (%) | |
|-------------------------|--------------------------|-------------------|
| | <i>Ulva meridionalis</i> | <i>Ulva ohnoi</i> |
| Celulosa | 8,6 | 19,7 |
| Almidón | 13,0 | 4,2 |
| Azúcares Neutros | 44,9 | 34,5 |
| Ácido Urónico | 11,6 | 13,4 |
| Proteína | 24,7 | 13,1 |
| Cenizas | 8,6 | 24,6 |
| Lípidos | 6,5 | 12,6 |

Adicionalmente, estudios determinaron los niveles de metionina en peso seco presentes en las algas, siendo para el caso de *Ulva lactuca* niveles que oscilan entre 1,5 a 2,2 [g/100 g de proteína] (Nielsen et al. 2011; Shuuluka et al. 2012), y niveles cercanos a 1,5 [g/100 g de proteína] para los casos de *Ulva rigida* y *Ulva capensis* (Shuuluka et al. 2012).

Siguiendo con la línea de caracterización del alga en cuestión, en la Tabla 4 se presentan estudios realizados por Ricardo Pezoa-Conte, sobre la composición bioquímica de la especie *Ulva rigida* provenientes de las costas de Coquimbo, mientras que en la Tabla 5 se presenta la composición de los monómeros de azúcar, y en la Tabla 6 los minerales presentes [31].

Por otro lado, en la Tabla 7 se presentan los estudios realizados por el Centro de Estudios en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad de Santiago de Chile, sobre la composición aminoacídica del *Ulva rigida* proveniente de las costas de Coquimbo y Puerto Montt [32]. Finalmente, se añade que los datos referidos al perfil aminoacídico (Tabla 7) son los que caracterizan al alga trabajada en esta investigación.

Tabla 4: Composición macromolecular de *Ulva rigida* presente en las costas de Coquimbo [31].

| Macromolécula | Porcentaje en peso seco (por cada 100 [g] de <i>Ulva</i>) |
|--------------------------|--|
| Cenizas | 19,00 |
| Proteínas | 21,00 |
| Lípidos | 4,00 |
| Fibras insolubles | 6,00 |
| Carbohidratos | 50,00 |

Tabla 5: Monómeros de azúcar presentes en *Ulva rigida* procedente de las costas de Coquimbo según total de carbohidratos [31].

| Monómero | Porcentaje según total de carbohidratos |
|--------------------------|---|
| Glucosa | 51,00 |
| Ácido glucurónico | 15,00 |
| Ácido Idurónico | 3,00 |
| Galactosa | 4,00 |
| Xilosa | 9,00 |
| Ramnosa | 17,00 |
| Otros (**) | 1,00 |

(**) Otros considera Arabinosa, Fucosa, Fructosa, Ácido Galacturónico, Manitol y Manosa.

Tabla 6: Minerales presentes en *Ulva rigida* procedente de las costas de Coquimbo [31].

| Minerales | Concentración [g/kg de alga fresca] |
|------------------|-------------------------------------|
| Aluminio | 0,12 |
| Boro | 0,07 |
| Hierro | 0,39 |
| Silicio | 0,50 |
| Estroncio | 0,05 |
| Calcio | 4,30 |
| Potasio | 16,00 |
| Magnesio | 20,00 |
| Sodio | 26,00 |
| Fósforo | 1,90 |
| Azufre | 34,00 |

Tabla 7: Caracterización aminoacídica de las proteínas presentes en *Ulva rigida* procedente de las costas de Coquimbo y Puerto Montt [32].

| Aminoácido | Concentración [g/100 g de proteína] | |
|-----------------|-------------------------------------|--------------|
| | Coquimbo | Puerto Montt |
| Acido aspártico | 1,33 | 0,31 |
| Acido glutámico | 1,48 | 0,80 |
| Serina | 0,57 | 0,24 |
| Glicina | 0,71 | 0,32 |
| Histidina | 0,14 | 0,07 |
| Arginina | 0,45 | 0,26 |
| Treonina | 0,44 | 0,25 |
| Alanina | 0,90 | 0,54 |
| Prolina | 0,44 | 0,26 |
| Tirosina | 0,12 | 0,08 |
| Valina | 0,55 | 0,34 |
| Metionina | 0,06 | 0,03 |
| Cisteína | 0,00 | 0,00 |
| Isoleucina | 0,43 | 0,26 |
| Leucina | 0,61 | 0,39 |
| Fenilalanina | 0,37 | 0,22 |
| Lisina | 0,42 | 0,28 |

1.1.4. *Trichoderma reesei*

El hongo filamentoso *Trichoderma reesei* fue originalmente aislado en las Islas Salomón durante la Segunda Guerra Mundial, y nombrado QM6a por el Centro de Investigación y Desarrollo QuaterMaster de la armada de Estados Unidos en Natick, Massachusetts [33].

Trichoderma reesei se hizo conocido por su capacidad de generar celulasas, y su uso en el tiempo se vio potenciado por la necesidad a nivel mundial de encontrar fuentes alternativas de combustibles como es el caso del bioetanol, en donde por medio de la hidrólisis de biomasa rica en celulosa se podía generar glucosa dispuesta para fermentación [33].

Es así como, en torno a la capacidad de *Trichoderma reesei* para producir celulasas, se desarrollaron sistemas de expresión que permitieron incrementar la producción de celulasas y la producción de proteínas. A continuación, en la Tabla 8 se presentan los niveles de proteína soluble y de actividad celulolítica que se han registrado para la cepa silvestre (QM6a) y las diferentes cepas mutantes [33].

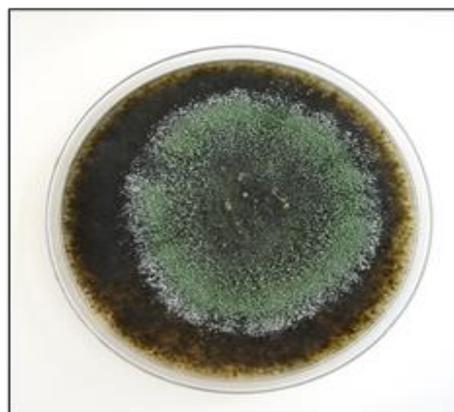


Figura 5: *Trichoderma reesei* RUT-C30 cultivada en medio sólido de 25 [g/L] de *Ulva rigida*.

Tabla 8: Cepas de *Trichoderma reesei* asociadas a su producción de proteína extracelular y actividad celulolítica. Valores obtenidos tras 14 días de fermentación en un reactor de 10 [L], utilizando algodón molido como fuente de carbono [33] [34].

| Cepa | Proteína Soluble [mg/mL] | FPU (*) [U/mL] | Productividad [FPU/(L·h)] | CMC (*) [U/mL] | βGI (*) [U/mL] |
|----------------|--------------------------|----------------|---------------------------|----------------|----------------|
| QM6a | 7,0 | 5 | 15 | 88 | 0,3 |
| QM9414 | 14,0 | 10 | 30 | 109 | 0,6 |
| MCG77 | 16,0 | 11 | 33 | 104 | 0,9 |
| NG-14 | 21,0 | 15 | 45 | 133 | 0,6 |
| RUT-C30 | 19,0 | 14 | 42 | 150 | 0,3 |

(**) FPU, Unidades de papel filtro (Filter paper Unit); CMC, Carboxymetilcelulasa (Endoglucanasa); βGI, β-Glucosidasa.

Haciendo énfasis en la cepa mutante *T. reesei* RUT-C30 (Ver Figura 5), cepa generada por la Universidad Rutgers (Nueva Jersey) a través del método de screening en conjunto de mutagénesis UV y química, se puede observar en la Tabla 8 (marcado en rojo) que esta cepa es capaz de aumentar la secreción de proteínas en un 270% y la actividad celulasa en un 280% en relación a la cepa silvestre [33] [34].

Por otra parte, diversos estudios han cuantificado los niveles de producción proteica y enzimática en función de la temperatura, pH, agitación y fuente de carbono.

A continuación, en la Tabla 9 se presentan las condiciones de cultivo de temperatura, pH, agitación y fuente de carbono, en los cuales se ha visto involucrado *Trichoderma reesei*.

Tabla 9: Condiciones de cultivo utilizados en estudios que cultivan *Trichoderma reesei*.

| Estudio | Temp. [°C] | pH | Agitación [RPM] | Fuente de carbono |
|------------------------------|------------|---------|-----------------|-------------------|
| Pakula et al. (2003) [35] | 28 | - | 200 | Lactosa |
| Linger et al. (2015) [36] | 30 | 5,5 | 225 | Glucosa |
| Domingues et al. (2000) [37] | 28 | 4,8 | 150 | Glucosa |
| Li et al. (2013) [38] | 26 | 4,0-6,0 | 300 | Glucosa |
| Wen et al. (2005) [39] | 22-34 | 3,8-6,2 | 175 | Glucosa |

Dentro los estudios presentados en la Tabla 9, Li et al. (2013) establecieron que el pH que optimiza la producción de celulasas dependía del tipo de celulasa, siendo pH 5,5-6,0 para β-glucosidasas y pH 4,0 para endoglucanasas. Además, determinaron que la mayor concentración de proteína (4,0 [g/L]) se obtuvo para pH 5,0, asimismo la biomasa alcanzó su mayor concentración cuando el pH osciló entre 4,0 y 4,5 [38].

Bajo la misma línea, Wen et al. (2005) establecieron, a partir de un análisis de superficie de respuesta, que las condiciones de cultivo que optimizan la producción de celulasas son 25,5 [°C] y pH inicial 5,7. Por otra parte, Duff y Murray (1996) determinaron que la actividad celulolítica se maximiza en el rango

de 22-25 [°C], y Ghose (1987) estableció que el pH óptimo para la actividad celulolítica era 4,8 [39][40].

En base a que las diversas conclusiones sobre las condiciones óptimas de temperatura y pH para el crecimiento de *Trichoderma reesei* son para condiciones de cultivo específicas, se observa la necesidad de generar investigaciones en torno a fuentes de carbono distintas a las mencionadas, como es el caso del uso de *Ulva* sp. Sin embargo, las investigaciones presentadas con anterioridad dan conocimiento de los posibles comportamientos de *Trichoderma reesei* en rangos de temperatura entre 22 y 34 [°C] y de pH entre 4,0 y 6,2.

A parte de la producción de celulasas, *Trichoderma reesei* también está relacionada con la industria de alimentos, en donde doce preparaciones enzimáticas procedentes de este hongo tienen certificación GRAS (Generally Regarded as Safe) por parte de la FDA de Estados Unidos. Además, la EFSA de la Unión Europea y EPA de Estados Unidos, aprueban el uso de varios pesticidas de planta y potenciadores de crecimiento basados en *Trichoderma reesei* para aplicación de alimento humano y animal. Estas aprobaciones por parte de organizaciones gubernamentales se dieron ya que este hongo no produce micotoxinas u otros agentes nocivos que afecten a la salud de animales y humanos [41][42].

Siguiendo con el área de alimentos, se tienen referencias en el uso de *Trichoderma reesei* para fermentación de fuentes con alto contenido de celulosa para suplementar la dieta de animales de ganado. A modo de ejemplo, se tiene el estudio de Omer et al. (2012) en el cual se reemplazó un 30% del heno de trébol utilizado para la dieta de ovinos de rebaño con tallos de maíz tratados con *Trichoderma reesei*. Este reemplazo significó un aumento en el peso del animal en un 27% en relación con la dieta control, y en una reducción en los costos de alimentación de un 22% [43].

Luego, en relación con investigaciones de producción de proteínas unicelulares utilizando cepas de *Trichoderma reesei*, se cita a la investigación de Ghanem (1992) la cual, mediante el uso de pulpa de remolacha como fuente de carbono, logra una eficiencia de conversión del 35,7%. En la Tabla 10, se presentan los niveles de producción de SCP en torno a medios de cultivo de 100 [mL] con una concentración de 20 [g/L] de pulpa de remolacha y 3 [g/L] de sulfato de amonio [44].

Tabla 10: Niveles de producción de SCP de *Trichoderma reesei*, utilizando pulpa de remolacha como sustrato. Resultados a 30 [°C] y pH inicial 5,0.

| pH final | Peso seco (*) [mg] | SCP [mg] | %SCP respecto a Peso seco | %Eficiencia de conversión (**) |
|----------|--------------------|----------|---------------------------|--------------------------------|
| 5,1 | 1450,0 | 714,9 | 49,3 | 35,7 |

(*) Peso seco = Pulpa residual + biomasa

(**) Eficiencia de conversión = mg SCP/mg de Pulpa de remolacha en 100 [mL].

Por otro lado, especies relacionadas a *Trichoderma reesei*, como lo son *Trichoderma viride* y *Trichoderma deliquescens* han presentado un contenido de metionina igual a 1,7 [g/100 g de proteína] y 1,3 [g/ 100 g de proteína], respectivamente. Estos valores están por debajo del requerido para la

alimentación de los salmónidos (2,2 [g/ 100g de proteína]), no obstante, estos podrían ser elevados mediante el uso de ingeniería genética.

En función de lo anterior, se han realizado variados estudios relacionados a la expresión de genes tanto endógenos, como exógenos en *Trichoderma reesei*. Se destaca que estas investigaciones no están enfocadas en la búsqueda de proteínas con alto contenido en metionina, no obstante, las proteínas producidas presentan un contenido de este aminoácido al 1% (ZERA y HFBI). Así, para el caso de genes endógenos, se tiene como ejemplo la investigación de Mustalahti et al. (2013), quienes mediante la fusión de los genes que codifican la proteína fluorescente verde (GFP) e Hidrofobina 1 (HFBI), lograron generar cuerpos proteicos intracelulares fluorescentes [45].

Y para el caso de genes exógenos, se tiene la investigación de Torrent et al. (2009), quien mediante la fusión del gen que codifica la proteína fluorescente verde (GFP) con un gen exógeno que codifica la proteína de maíz y zeína (ZERA) logró generar cuerpos proteicos (Protein Bodies) que se acumulaban de manera intracelular [46]. Además, en el año 2014, Smith et al. lograron expresar tanto intracelularmente, como extracelularmente, α -galactosidasa humana (GLA) en *Trichoderma reesei* RUT-C30. Lo anterior, se realizó mediante la generación de cassettes de expresión que contenían las fusiones de genes que codifican para ZERA-GLA y CBHI-GLA, en donde el primero logró una máxima de concentración de 0,64 [g/L] de GLA intracelular, mientras que el segundo logró una máxima concentración de 0,02 [g/L] [47].

Por lo tanto, se procede a plantear la posibilidad de enriquecer en metionina las proteínas producidas por el hongo filamentoso *Trichoderma reesei*, mediante el uso de ingeniería genética para la generación de cuerpos proteicos intracelulares, y utilizando como fuente de carbono *Ulva rigida*.

Finalmente, relacionando todo lo visto en antecedentes, se da el pie al uso comercial de una de las principales algas involucradas en la problemática de las mareas verdes, es decir, a *Ulva* spp., con la finalidad de generar una respuesta a la demanda proteica a nivel mundial que se pronostica a futuro, y generando un potencial mercado de exportación de carácter biológico que compita económicamente con los alimentos con alto valor proteico, como lo son las harinas de pescado y los concentrados proteicos en base a soya.

1.2. PROYECTO FONDECYT N°1180794

1.2.1. ANTECEDENTES

El proyecto FONDECYT N°1180794 se basa en la producción de una cepa recombinante de *T. reesei* RUT C-30 capaz de hidrolizar los polisacáridos de la *Ulva rigida* a glucosa, y así generar de proteínas ricas en metionina. El proyecto en sí tiene una duración de 3 años, y se divide en 6 etapas, las cuales son presentadas en la Tabla 11 .

Tabla 11: Etapas del proyecto FONDECYT 1180794

| Actividad |
|---|
| 1.- Generación de vectores de expresión |
| 2.- Transformación de <i>Trichoderma reesei</i> |
| 3.- Caracterización de transformantes |
| 4.- Caracterización de la macroalga residual |
| 5.- Optimización de la fermentación del alga residual |
| 6.- Análisis de datos y preparación de manuscritos |

Se destaca que la actividad n°5 se desglosa en tres subcategorías, las cuales se enlistan a continuación.

- I. Identificación de las condiciones favorables para la producción de proteínas unicelulares de *Trichoderma reesei* RUT-C30 en tubos.
- II. Identificación de las condiciones favorables para la producción de proteínas unicelulares de *Trichoderma reesei* RUT-C30 en matraces.
- III. Identificación de las condiciones óptimas para la producción de proteínas unicelulares de *Trichoderma reesei* RUT-C30 recombinante.

Finalmente, los objetivos de esta investigación se centran en la actividad n°5, principalmente en la identificación de las condiciones favorables para la producción de proteínas unicelulares de *Trichoderma reesei* RUT-C30 en matraces.

1.2.2. OBJETIVOS

1.2.2.1. OBJETIVO GENERAL

- Determinar las condiciones de cultivo favorables para la producción de proteínas intracelulares de *Trichoderma reesei* RUT-C30, utilizando *Ulva rigida* como fuente de carbono, para así sentar las bases de estudio para las condiciones de cultivo óptimas de cepas recombinantes.

1.2.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar los efectos del pH en la producción de proteínas intracelulares a una temperatura dada.
- Determinar los efectos de la temperatura en la producción de proteínas intracelulares a un pH dado.

2. MATERIALES Y METODOLOGÍA

2.1. CONDICIONES DE CULTIVO

Para determinar las condiciones de cultivo de pH y temperatura que favorecen la producción proteica de la *Trichoderma reesei* RUT-C30, se diseñó una combinatoria de 9 experimentos basados en las condiciones de cultivo bibliográficos presentados en la Tabla 9 de la sección 1.1.4. Así, en la Tabla 12 se tabulan los experimentos que se realizaron en función de las variables de temperatura y pH inicial.

Tabla 12: Lista de experimentos realizados que combinan las condiciones de cultivo de temperatura y pH.

| Experimento | Temperatura [°C] | pH | Experimento | Temperatura [°C] | pH |
|-------------|------------------|-----|-------------|------------------|-----|
| 1 | 25 | 4,0 | 6 | 30 | 5,5 |
| 2 | 25 | 5,5 | 7 | 35 | 4,0 |
| 3 | 25 | 4,8 | 8 | 35 | 4,8 |
| 4 | 30 | 4,0 | 9 | 35 | 5,5 |
| 5 | 30 | 4,8 | | | |

Se destaca que la elección de las condiciones se centró en los valores más representativos de la bibliografía, siendo 25 [°C] y 30 [°C] en el caso de la temperatura, y de 4,0 y 5,5 para el caso de pH inicial, teniendo como punto medio el valor de 4,8 [35-39]. Luego, el valor de 35 [°C] fue seleccionado ya que se tiene constancia de que *Trichoderma reesei* crece a esta temperatura con actividad celulolítica reducida [40], sin embargo, no se tiene registro sobre producción de SCP a dicha temperatura.

Por otra parte, se optó no incidir luz a los medios, puesto que no todas las incubadoras disponibles en el laboratorio poseían dicha función, y se escogió una velocidad de agitación de 200 [rpm] en base a la bibliografía y con la finalidad de no dañar a los equipos [35-39]. Se destaca que la ausencia/presencia de luz en el crecimiento de *Trichoderma reesei* repercute tanto en la utilización y recepción de fuentes de carbono, como en la producción de celulasas [48].

Por último, cada experimento se realizó por duplicado, y si los valores de concentración de proteína no eran semejantes entre duplicados, se procedía a realizar un triplicado.

2.2. MEDIO DE CULTIVO

2.2.1. MOLIENDA Y TAMIZADO

La molienda de *Ulva rigida* se realizó mediante un molinillo de granos de café, específicamente, el molinillo Sindelen Modelo Mol-165. Luego, el material molido fue tamizado con tal de almacenar partículas de alga con tamaños menores a 500 [µm]. En total, se molieron 600 [g] de *Ulva rigida*.

2.2.2. MEDIO DE CULTIVO EN PLACA

Para el cultivo en placa se utilizó el medio Agar PDX, que se preparó con 19,5 [g] de Agar PDA y 0,47 [mL] de Tritón® X-100 (octoxinol-9), aforando con agua destilada hasta completar los 500 [mL]. La inoculación de la *T. reesei* RUT-C30 se realizó bajo condiciones de esterilidad, en donde los inóculos provinieron de preinóculos líquidos crecidos en glucosa. Finalmente, las placas se incubaron a 25 [°C] por 6 a 7 días.

2.2.3. MEDIO DE CULTIVO EN MATRAZ

Para el medio de cultivo en matraz se utilizó extracto de *Ulva* como fuente de carbono a una concentración de 25 [g/L], junto con medio mínimo, el cual es un derivado del medio de cultivo utilizado por Mohagheghi *et al.* [35], y se presenta a continuación en la Tabla 13.

Tabla 13: Composición del medio mínimo de cultivo derivado de Mohagheghi *et al.* [35].

| Componente | Concentración [g/L] |
|---|----------------------|
| KH_2PO_4 | 15,00 |
| $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ | 5,00 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 1,23 |
| $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 0,79 |
| $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | $5,00 \cdot 10^{-3}$ |
| $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | $1,60 \cdot 10^{-3}$ |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | $1,40 \cdot 10^{-3}$ |
| CoCl_2 | $0,40 \cdot 10^{-3}$ |

Se destaca que la elección del valor de 25 [g/L] de *Ulva rigida* se escogió en torno a los resultados obtenidos en experimentos previos. Dichos resultados se pueden encontrar en el Anexo A.

Para cada experimento que consideraba una de las 9 combinaciones de condiciones de cultivos, se realizaron duplicados, en donde para cada repetición se consideraron 18 matraces distribuidos a lo largo de 11 días. La distribución consideraba los días 0, 1, 3, 5, 8 y 11 tras la inoculación, en donde para cada día se utilizaban tres matraces de 125 [mL] con 50 [mL] de solución de medio mínimo con extracto de *Ulva rigida*. Para cada día se consideró dos matraces para duplicados biológicos de cultivos inoculados y uno para control negativo. Los duplicados biológicos fueron inoculados con cepas de *Trichoderma reesei* RUT-C30 incubadas tras 6 a 7 días en placa PDX. Se destaca que el tamaño de los inóculos fue de 5 [mm] × 5 [mm] aproximadamente.

La preparación del medio de cultivo líquido para cada experimento (y repetición) consistió en la elaboración de una solución de 1 [L] que contenía 25 [g] de *Ulva rigida* molida, y las concentraciones de medio mínimo detalladas en la Tabla 13. Esta solución se autoclavó por 1[h] a 121 [°C], para luego, verter 50 [mL] de ésta en cada uno de los 18 matraces de 125 [mL] destinados para fermentación.

2.3. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

En relación a la cuantificación de proteínas, ésta se realizó mediante análisis de Bradford [49][50], en donde para cada matraz se extrajeron 3 [mL] que fueron distribuidos en tres tubos de microcentrífuga de 2 [mL] (1 [mL] para cada tubo). Se destaca que la extracción del material se realizó para cada uno de los 11 días de experimentación. Además, previamente a cada extracción, el contenido de cada matraz fue mezclado mediante el uso de una Minipimer, permitiendo así el rompimiento físico de las aglomeraciones formadas por el crecimiento del hongo. Se midió el pH antes de la extracción de alícuotas.

Los tubos fueron posteriormente centrifugados a 18900 [g] por 5 [min], descartando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet con 0,5 [mL] de solución 1 [M] de Tris en agua destilada ajustada a pH 7,0 mediante HCl. Una vez resuspendidas las muestras, estas fueron centrifugadas a 18900 [g] por 10 [min], descartando nuevamente el sobrenadante.

Luego, los pellets fueron resuspendidos con 0,5 [mL] de solución de 4 [M] de tiocianato de guanidina y 0,05 [M] de Tris en agua destilada ajustada a pH 7,5 con HCl. La solución utilizada permite el rompimiento de la pared celular de los hongos, liberando así el contenido proteico al interior de estas. Una vez resuspendidos los pellets, estos se dejaron incubando a 90 [°C] en termoagitadores por un tiempo de 3 [h] a 0 [g].

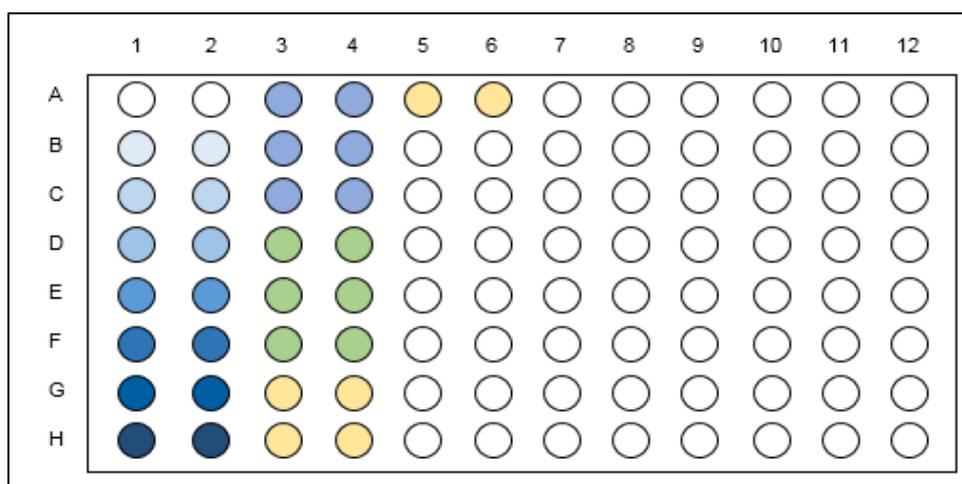


Figura 6: Distribución espacial de las muestras analíticas en microplaca de 96 pocillos. En columnas 1 y 2, desde la fila A hasta la fila H, se encuentra diluido BSA de manera seriada, es decir, de 0 [mg/mL] (en blanco) hasta 7 [mg/mL] (en azul). En columnas 3, 4 y 5, se encuentran diluidas las muestras analíticas que contienen *Trichoderma reesei* RUT-C30 (Azul y Verde) y los controles negativos (Amarillo).

Posterior a las 3 [h], se centrifugaron las muestras a 18900 [g] durante 15 [min]. Se separaron las fases, y se procedió a analizar el sobrenadante mediante espectrofotometría a 595 [nm]. Para ello, se utilizaron 40 pocillos de una microplaca de 96 pocillos, conteniendo 200 [μL] de solución de azul de Coomassie (Bio – Rad® Protein Assay Dye Reagent Concentrate), en donde para las primeras dos columnas se añadieron de manera gradual volúmenes de albúmina de suero bovino (BSA) a una concentración del 1 [g/L] junto con 10[μL] de solución 4 [M] de Tiocianato de guanidina y 0,05 [M] de Tris, y en las siguientes cuatro columnas se añadieron 10 [μL] de los sobrenadantes obtenidos en cada muestra, tal y como se expone en la Figura 6.

Mediante el uso de BSA en la microplaca, se realizó la curva de calibración que determinó, de manera aproximada, el contenido proteico de las muestras analíticas de los matraces. Se destaca que la concentración de proteínas obtenida mediante la conversión de la absorbancia medida, fue dividida por la masa del pellet de la muestra dada. Esto último con la intención de normalizar la cantidad de proteínas en función de las células contenidas en cada muestra.

Por último, se masaron los pellets de cada muestra analítica (peso húmedo). Los tubos de microcentrífuga fueron masados previamente a su uso, con la finalidad de obtener únicamente la masa del contenido.

2.4. EQUIPAMIENTO

A continuación, en Tabla 14 se presentan los equipos utilizados a lo largo de la experiencia de laboratorio.

Tabla 14: Equipos utilizados durante la experiencia de laboratorio.

| Equipo | Modelo |
|-----------------------------|---|
| Molinillo | Sindelen – Mol 165 |
| Minipimer | Thomas TH-8715i |
| Medidor de pH | Corning pH meter 320 |
| Balanza | OHAUS Analytical Plus |
| Centrífuga | Eppendorf Centrifuge 5403 y BOECO M-24A |
| Agitador térmico | PCMT Grant-bio |
| Espectrofotómetro de placas | ASYS UVM 340 |
| Incubadora | SHEL LAB y LABTECH |

2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se consideraron las mediciones de los parámetros de concentración de proteína intracelular, masa de pellet y sobrenadante tras centrifugación post lisis celular, y pH de los medios cultivados.

La herramienta que se utilizó para trabajar los parámetros medidos fue el software Microsoft Excel, software con el cual se calcularon los promedios y las desviaciones estándar de dichos parámetros para las diversas condiciones de cultivos y días de fermentación, además de graficar y comparar la tendencia de estos.

En el caso de la concentración de proteínas intracelulares, se desarrollaron curvas de calibración a partir de las absorbancias medidas mediante espectrofotometría a 595 [nm]. Con el uso de esta curva se transformó los valores de absorbancia que presentaron las alícuotas de las muestras problema a concentraciones de proteína en mg/mL. En el Anexo B, se presenta un ejemplo de obtención de curva de calibración, junto con la transformación de los valores de absorbancia para una muestra dada.

Para los parámetros de masa de pellet y de pH, se obtuvo el promedio y la desviación estándar de las mediciones realizadas, para cada condición de cultivo y día tratado. A modo de ejemplo, se estableció que el pH de los medios inoculados para el día 3 bajo la condición de cultivo de 25 [°C] a pH inicial 4,8, fue el promedio entre las mediciones de masa de pellet de las 6 alícuotas de la primera parte (3 por cada matraz) y las mediciones de masa de pellet de las 6 alícuotas de la segunda parte (la repetición). Por otro lado, se destaca que hubo cambios en los volúmenes de alícuotas utilizados a lo largo de la investigación que se explicitarán en la sección 3. Basado en lo anterior, se procedió a normalizar la masa de pellet por el volumen de la solución de lisis utilizada, con la finalidad de obtener un parámetro comparativo que mida los efectos de la temperatura y pH inicial sobre la biomasa residual. Luego, en el Anexo C se pueden hallar tablas de datos que ejemplifican lo anteriormente descrito.

Posteriormente, para determinar la condición de cultivo más favorable, se debió generar un parámetro comparativo que se denominó relación másica, y consiste en la cantidad de proteína que genera por la masa de pellet de las alícuotas de análisis. La forma de calcular la relación másica se presenta a continuación:

$$\text{Relación másica} \left[\frac{\text{mg proteína}}{\text{g pellet}} \right] = \frac{\text{Concentración} \left[\frac{\text{mg proteína}}{\text{ml}} \right] \times \text{Volumen Alícuota} [\text{ml}]}{\text{Masa}_{\text{pellet}} [\text{g de pellet}]}$$

Cabe señalar que la fórmula de relación másica presentada es una variación de la relación SCP producido/peso seco utilizada por Ghanem (1992) [44] para la producción de proteínas intracelulares de *Trichoderma reesei*, utilizando pulpa de remolacha como sustrato.

Por consiguiente, y al igual que para los parámetros medidos, los valores de relación másica fueron calculados para cada alícuota, por lo que, para la determinación de la mejor condición de cultivo, se consideró el promedio entre alícuotas que representan a una condición de cultivo en un respectivo día. Ejemplos de cálculo se pueden observar en el Anexo D.

Luego, para contrastar las diferencias entre los valores obtenidos y verificar si éstas son significativas o no, se realizaron análisis estadísticos de prueba t-student, comparando el nivel de probabilidad (Valor P; P(t<T)) con el nivel de significancia establecida (Valor α; igual a 0,05). Así, si el valor P era menor a 0,05, entonces la diferencia entre los valores era estadísticamente significativa.

Finalmente, las pruebas de t-student se realizaron mediante el software Microsoft Excel, y la determinación del tipo de prueba t se basó en el algoritmo presentado en la Figura 7.

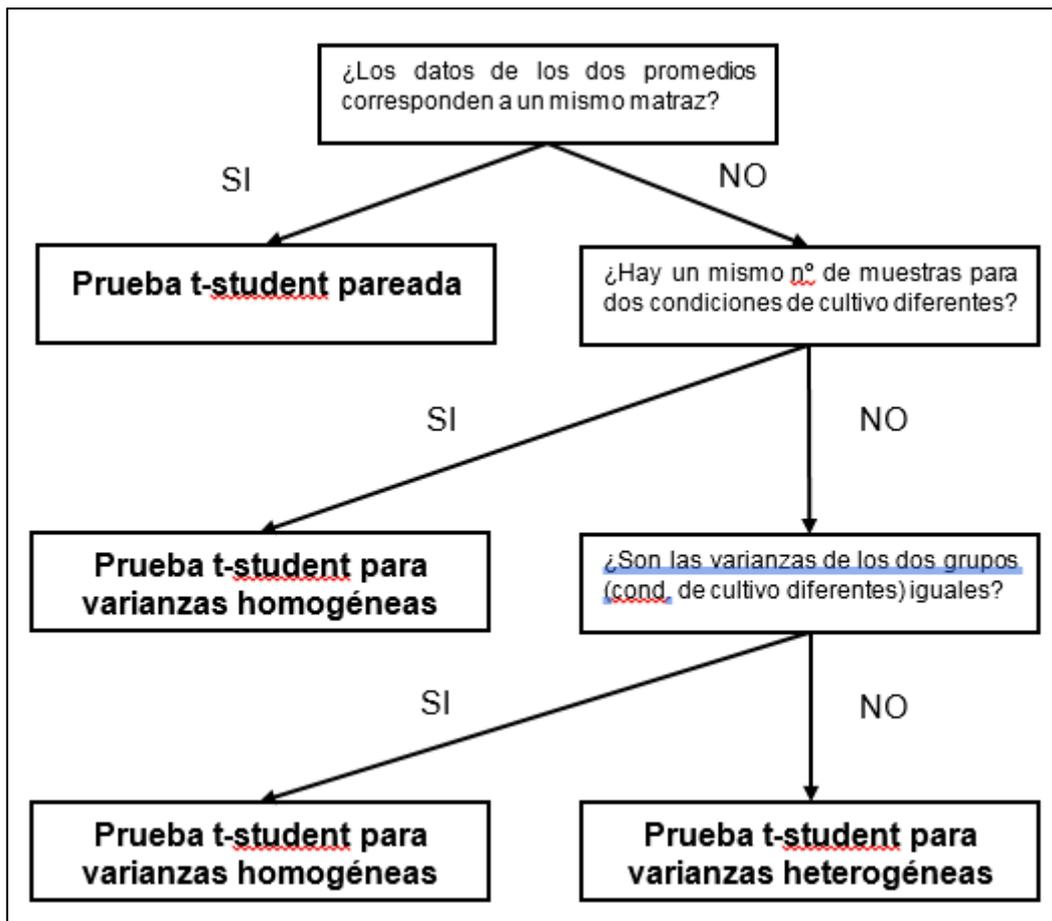


Figura 7: Algoritmo de decisión para la elección del tipo de prueba t-student.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se estudió la producción de proteínas intracelulares por parte del hongo filamentoso *Trichoderma reesei* RUT-C30, utilizando *Ulva rigida* como fuente de carbono. Se consideró para el estudio la concentración proteica obtenida mediante el método de Bradford, la biomasa y sobrenadante resultantes de la lisis celular, la variación de pH a través del tiempo, y la relación másica entre la masa de proteína y de biomasa presentes en las muestras lisadas. Además, el estudio contempló la medición de dichos parámetros a diferentes condiciones de temperatura y pH, comparando y relacionando los resultados obtenidos al variar éstas últimas.

Durante el desarrollo del estudio hubo cambios en el lugar de origen del alga en análisis y en las medidas utilizadas para los análisis de proteína intracelular. En primer lugar, la *Ulva rigida* utilizada inicialmente provino de las costas de Puerto Montt, y posteriormente, se cambió por algas procedentes de la zona costera de Coquimbo. Se destaca que tanto el contenido proteico, como aminoacídico, del *Ulva rigida* fue distinta según la zona [32], asimismo se plantea que el contenido macromolecular también difería según la zona, sin embargo, no se disponía de bibliografía que lo corrobore empíricamente.

En segundo lugar, con énfasis en lo detallado en la Sección 2.3 sobre los volúmenes utilizados en las alícuotas extraídas de los medios de cultivo para análisis de contenido proteico, éstos disminuyeron de 1,00 [mL] a 0,50 [mL]. Lo anterior tuvo como finalidad disminuir el volumen de la solución de lisis utilizado dado al alto costo de éste. Así, dichos volúmenes disminuyeron de 0,50 [mL] a 0,25 [mL], y la cantidad de alícuotas extraídas por matraz disminuyeron de 3 a 2. A continuación, en la Tabla 15 se listan los experimentos que fueron desarrollados con las diferentes algas y metodologías.

Tabla 15: Listado de las metodologías experimentales utilizados en los diferentes experimentos.

| Exp. | Condición de cultivo | | Ulva rígida | | Muestra:Solución | |
|------|----------------------|-----|--------------|----------|------------------|----------------|
| | Temperatura [°C] | pH | Puerto Montt | Coquimbo | 1,00:0,50 [mL] | 0,50:0,25 [mL] |
| 1 | 25 | 4,0 | - | ✓ | - | ✓ |
| 2 | 25 | 4,8 | ✓ | - | ✓ | - |
| 3 | 25 | 5,5 | ✓ | ✓ | ✓ | - |
| 4 | 30 | 4,0 | - | ✓ | - | ✓ |
| 5 | 30 | 4,8 | ✓ | - | ✓ | ✓ |
| 6 | 30 | 5,5 | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| 7 | 35 | 4,0 | - | ✓ | - | ✓ |
| 8 | 35 | 4,8 | ✓ | - | ✓ | ✓ |
| 9 | 35 | 5,5 | - | ✓ | - | ✓ |

Así, la principal consecuencia que se esperaba al realizar cambios en el volumen de alícuota era encontrar una mayor variabilidad en los valores de concentración y masa de pellet, dada la baja homogeneidad de los medios de cultivo. Y, en el caso de disminuir el número de alícuotas, se esperaba una obtener mayores desviaciones estándar para los valores de concentración y masa de pellet. Sin embargo, la variabilidad de los datos fue menor que en los casos donde las alícuotas presentaban mayor número y volumen, asimismo con las desviaciones estándar.

3.1. CULTIVO DE *T. reesei* EN MEDIO LÍQUIDO EN MATRACES

A continuación, se presentan los resultados visuales de los cultivos líquidos en matraces. En las Figuras 8-10 se presentan los cultivos en medio líquido, inoculados y sin inocular como control negativo.



Figura 8: Cultivos líquidos de *Ulva rigida* más medio mínimo en el día 5. A la derecha matraz inoculado con *Trichoderma reesei* RUT-C30, a la izquierda matraz de control negativo.

La primera diferencia visual que se apreció entre un cultivo inoculado con *Trichoderma reesei* y uno de control negativo (Medio mínimo y *Ulva rigida*), es que el primero presenta un color verde oscuro posterior al día 5 tras la inoculación, además de presentar espuma. Al contrario, los cultivos de control mantuvieron desde el día 0 un color verde claro, sin presentar espuma (Ver Figura 8).

Por otra parte, se destaca que las muestras inoculadas entre los días 0 y 3 presentaron el color verde claro característico de las muestras de control, además, de no presentar espuma.

A partir de la diferencia en la presencia de espuma en las muestras, se puede inferir que a partir del día 3 tras la inoculación, el hongo entra en la fase exponencial de producción de proteínas. Este comportamiento se puede asemejar al visto por Li et al. (2013), que posterior a las 24 horas de cultivo, *Trichoderma reesei* entra en la fase exponencial de producción de proteínas. Se plantea que la diferencia en el tiempo de inicio de la fase exponencial se debe a la fuente de carbono, dado que la bibliográfica trabaja con glucosa, y no con *Ulva*. Por otra parte, la diferencia en la tonalidad de las muestras se debió a la solubilización del alga en cuestión dado a su degradación por parte del hongo.

Adicionalmente, otra diferencia visual entre los cultivos inoculados y los de control, es que éstos últimos presentaban suspensiones de alga que decantaban en cuestión de segundos, mientras que, para los primeros se aprecia una disminución de las partículas de alga en suspensión, siendo estas solubilizadas tras la degradación de ésta por parte del hongo. Además, los medios inoculados presentaban aglomeraciones esféricas de células de hongos en suspensión, que los controles no presentan. En la Figura 9, se presentan las partículas de alga y las aglomeraciones celulares en suspensión.

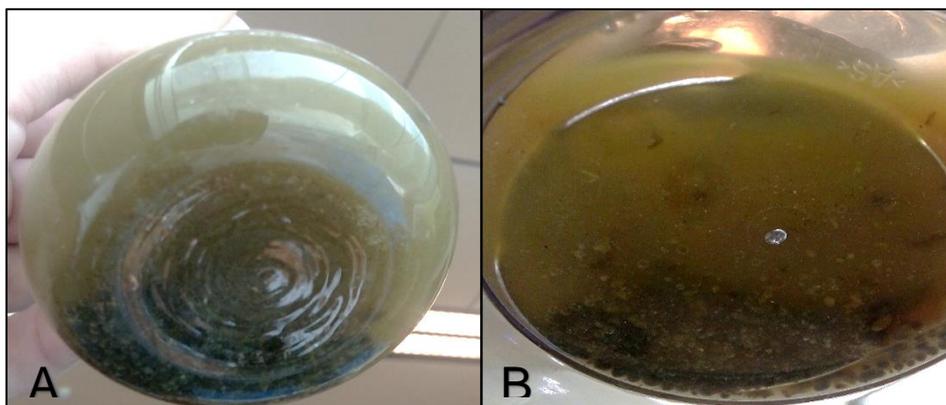


Figura 9: Partículas de alga en suspensión para cultivos inoculados y de control tras 8 días post inoculación. A) Partículas de *Ulva rigida* suspendidas en matraz de control. B) Aglomeraciones celulares y *Ulva rigida* suspendida en matraz inoculado.

Producto de la presencia de material suspendido, y de que éste decantaba rápidamente, se generaron cultivos heterogéneos. Lo anterior, dificultaba que las alícuotas extraídas de estos cultivos fuesen representativas. Por ende, se tomó la medida de homogenizar los cultivos utilizando una minipimer, con la finalidad de romper las aglomeraciones celulares disminuyendo su tamaño, y de distribuir uniformemente tanto el alga decantada, como las células de hongos, en los recipientes.

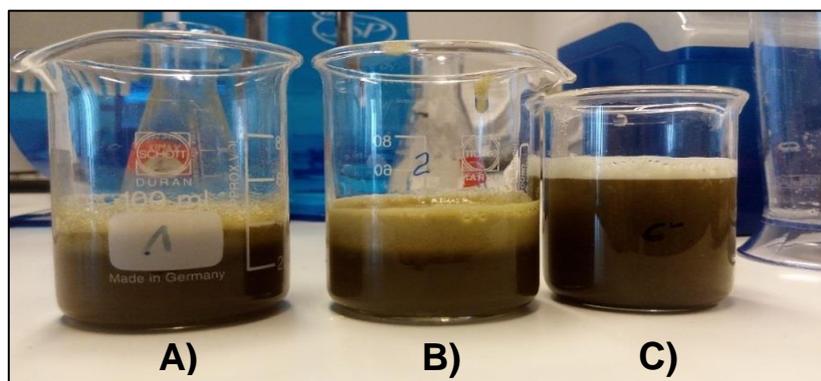


Figura 10: Resultado de la homogenización de los cultivos mediante minipimer. A) y B) cultivos inoculados tras 8 días de crecimiento. C) Cultivo control que comprende *Ulva rigida* y medio mínimo.

Tras el proceso de homogenización, la diferencia visual más notoria fue que en los cultivos inoculados el volumen de espuma aumenta en comparación a antes de ser mezclado, lo mismo sucede para las muestras de control negativo (que contenían sólo medio mínimo y *Ulva rigida*). El aumento del volumen de espuma se debió a la agitación que sufrieron las proteínas extracelulares hidrofóbicas presentes en los cultivos. Se añade que el color de la espuma para las muestras de control negativo fue de color beige, mientras que para los casos inoculados fue de color verde (Ver Figura 10).

Se concluye que la presencia de *Trichoderma reesei* en cultivo líquidos que utilicen *Ulva rigida* como fuente de carbono, generó un aumento en la espuma y tonalidad verde del medio. Lo anterior, producto de la degradación del alga y la producción de proteínas extracelulares hidrofóbicas.

3.2. EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNAS EN CULTIVOS DE *T. reesei* CRECIDOS EN BIOMASA ALGAL COMO FUENTE DE CARBONO

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de la concentración de proteínas intracelulares producidas por el hongo filamentoso *Trichoderma reesei* RUT C-30 tras 11 días de cultivo. Las mediciones fueron realizadas con el objetivo de evaluar los efectos de la temperatura y pH sobre la producción de las proteínas intracelulares. Cabe destacar que cada experimento tiene un número determinado de réplicas biológicas y analíticas (alícuotas totales analizadas de un conjunto de réplicas biológicas) que se detallan en la Tabla 16.

Tabla 16: Número de réplicas biológicas y analíticas según experimento.

| Exp. | Condición de cultivo | | Nº de Réplicas biológicas | | Nº de muestras analíticas | |
|------|----------------------|-----|---------------------------|-----------------|---------------------------|-----------------|
| | Temperatura [°C] | pH | Muestra Inoculada | Muestra Control | Muestra Inoculada | Muestra Control |
| 1 | 25 | 4,0 | 4 | 2 | 8 | 4 |
| 2 | 25 | 4,8 | 4 | 2 | 12 | 6 |
| 3 | 25 | 5,5 | 4 | 2 | 12 | 6 |
| 4 | 30 | 4,0 | 4 | 2 | 8 | 4 |
| 5 | 30 | 4,8 | 6 | 3 | 16 | 8 |
| 6 | 30 | 5,5 | 6 | 3 | 14 | 7 |
| 7 | 35 | 4,0 | 4 | 2 | 8 | 4 |
| 8 | 35 | 4,8 | 6 | 3 | 16 | 8 |
| 9 | 35 | 5,5 | 4 | 2 | 8 | 4 |

3.2.1. EFECTOS DE LA VARIACIÓN DEL pH INICIAL SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

Antes de analizar las concentraciones obtenidas, se debe explicitar que el pH no fue controlado a lo largo del tiempo, pero si fue medido. En este apartado sólo se relacionarán las concentraciones de proteína que se obtuvieron con el pH establecido al inicio de los cultivos

Al analizar la Figura 11, se aprecia que para cultivos a 25 [°C], la mayor concentración de proteínas se obtuvo al pH inicial 4,8, siendo 12,91 [mg/mL] al día 8 del cultivo. Luego, la máxima concentración proteica obtenida para los cultivos con pH inicial 5,5 fue de 7,51 [mg/mL] en el día 3, y para los cultivos con pH 4,0 fue de 4,96 [mg/mL] en el día 5.

Respecto de los controles negativos, éstos mantuvieron un comportamiento constante en relación con su concentración inicial (concentración en día 0) a excepción de los cultivos con pH inicial 4,8, en donde las concentraciones registradas ascienden hacia el día 11. Este comportamiento se asocia a un problema en la cantidad de alga presente en cada matraz y

alícuota. Se destaca que los valores de concentración obtenidos para los controles negativos son similares a los obtenidos para las muestras inoculadas.

Respecto a la concentración de proteínas en las muestras inoculadas, se obtuvo que a partir del día 3, los valores superaron a los de los controles negativos, con excepción de los días 5 y 11 para los cultivos con pH inicial 4,8. Además, la mayor diferencia de concentración respecto al control negativo se obtuvo para los cultivos a pH 4,0 con un valor igual a 2,23 [mg/mL] en el día 5,0.

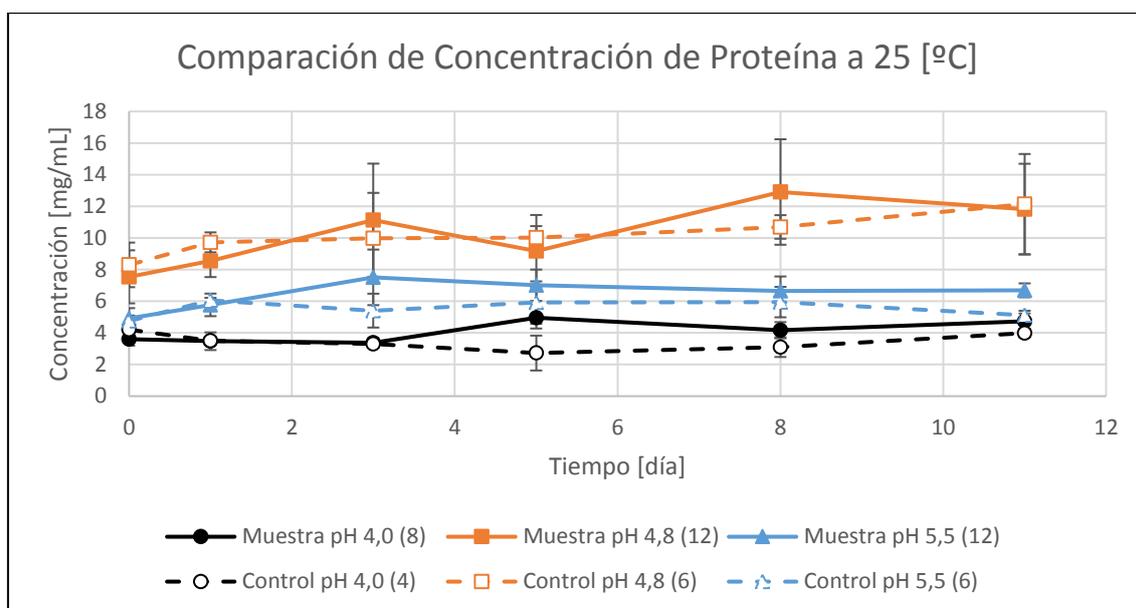


Figura 11: Gráfico comparativo de la concentración de proteínas intracelulares en función del tiempo, entre los cultivos con temperatura 25 [°C] a diferentes pH. Número de muestras para cada cultivo definido entre paréntesis en la leyenda.

Luego, al analizar las diferencias de concentración de proteínas entre las muestras inoculadas y de control mediante análisis estadístico t-student (Ver Tabla 17), se tuvo que las máximas concentraciones de proteína para cada pH inicial presentaron diferencias estadísticamente significativas, respecto a su control. Se destaca que la mitad de las diferencias de concentración posterior al tercer día de cultivo no son estadísticamente significativas. Lo anterior se debió a la alta variabilidad en el valor de concentración de las muestras obtenidas.

Tabla 17: Análisis estadístico t-student para evaluar diferencias significativas entre las concentraciones proteicas de las muestras inoculadas y de control. Caso a 25 [°C]. Si valor P es menor a 0,05, entonces la diferencia es significativa.

| Comparación de pH a 25 [°C] | | Día | | | | | |
|-----------------------------|---------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | | 0 | 1 | 3 | 5 | 8 | 11 |
| 4,0/C ⁻ | Valor P | 3,6·10 ⁻² | 9,0·10 ⁻¹ | 2,5·10 ⁻¹ | 1,4·10 ⁻³ | 9,6·10 ⁻³ | 2,1·10 ⁻² |
| | Significativo | SI | NO | NO | SI | SI | SI |
| 4,8/C ⁻ | Valor P | 3,6·10 ⁻¹ | 1,9·10 ⁻² | 5,1·10 ⁻¹ | 2,5·10 ⁻¹ | 4,8·10 ⁻² | 8,3·10 ⁻¹ |
| | Significativo | NO | SI | NO | NO | SI | NO |
| 5,5/C ⁻ | Valor P | 2,7·10 ⁻¹ | 5,8·10 ⁻¹ | 5,5·10 ⁻³ | 3,1·10 ⁻² | 4,1·10 ⁻¹ | 4,2·10 ⁻¹ |
| | Significativo | NO | NO | SI | SI | NO | NO |

Al incrementar la temperatura del cultivo a 30 [°C] (ver Figura 12), se observó que al igual que en el caso anterior, a partir del día 3 la concentración de proteínas de las muestras inoculadas se mantuvo por sobre la concentración registrada para los controles negativos.

Por otro lado, y al contrario de las muestras a 25 [°C], la mayor concentración de proteínas se registró en los cultivos con pH inicial 4,0, logrando una concentración igual a 7,61 [mg/mL] en el día 5. Luego, los cultivos con pH inicial 4,8 registraron una máxima concentración proteica igual a 5,39 [mg/mL] en el día 11, mientras que los cultivos a pH 5,5 registraron una concentración máxima de 5,29 [mg/mL] al día 3.

En cuanto a los controles negativos, en los cultivos a pH inicial 4,0 y 5,5, la concentración de proteínas ascendió y descendió en los primeros tres días. A este fenómeno se le atribuye errores experimentales asociados a la concentración inicial de *Ulva* en los cultivos que serán explicados en la sección 3.2.2.

Con base en la mayor diferencia de concentración entre muestra inoculadas y control, se obtuvo un valor igual a 3,72 [mg/mL] en el día 5 para los cultivos a pH inicial 4,0.

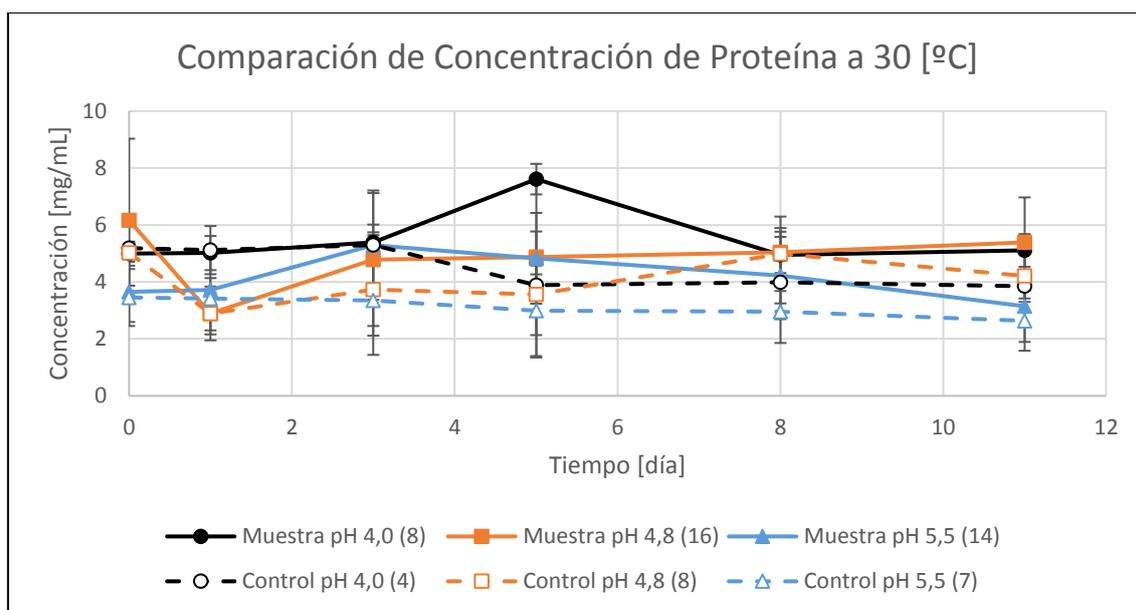


Figura 12: Gráfico comparativo de la concentración de proteínas intracelulares en función del tiempo, entre los cultivos con temperatura 30 [°C] a diferentes pH. Número de muestras para cada cultivo definido entre paréntesis en la leyenda.

Al revisar la Tabla 18, se puede apreciar que las diferencias de concentración de proteína entre las muestras inoculadas y las de control son mayoritariamente insignificantes. No obstante, y al igual que el caso de 25 [°C], los valores máximos de concentración que se obtuvieron para las muestras inoculadas si presentaron diferencias estadísticamente significativas con relación a su control negativo.

Tabla 18: Análisis estadístico t-student para evaluar diferencias significativas entre las concentraciones proteicas de las muestras inoculadas y de control. Caso a 30 [°C]. Si valor P es menor a 0,05, entonces la diferencia es significativa.

| Comparación de pH a 30 [°C] | | Día | | | | | |
|-----------------------------|---------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | | 0 | 1 | 3 | 5 | 8 | 11 |
| 4,0/C- | Valor P | $3,6 \cdot 10^{-1}$ | 1,0 | $9,1 \cdot 10^{-1}$ | $2,2 \cdot 10^{-7}$ | $6,6 \cdot 10^{-2}$ | $9,9 \cdot 10^{-4}$ |
| | Significativo | NO | NO | NO | SI | NO | SI |
| 4,8/C- | Valor P | $1,3 \cdot 10^{-1}$ | $9,1 \cdot 10^{-1}$ | $4,4 \cdot 10^{-1}$ | $3,5 \cdot 10^{-1}$ | $8,2 \cdot 10^{-1}$ | $4,7 \cdot 10^{-2}$ |
| | Significativo | NO | NO | NO | NO | NO | SI |
| 5,5/C- | Valor P | $5,9 \cdot 10^{-1}$ | $3,5 \cdot 10^{-1}$ | $1,5 \cdot 10^{-2}$ | $9,9 \cdot 10^{-3}$ | $4,1 \cdot 10^{-2}$ | $4,9 \cdot 10^{-1}$ |
| | Significativo | NO | NO | SI | SI | SI | NO |

En cuanto a lo que se obtuvo a 35 [°C] (Figura 13), los cultivos a pH inicial 4,0 fueron los que lograron una mayor concentración proteica, siendo ésta igual a 7,96 [mg/mL] al día 8. Luego, los cultivos a pH 4,8 lograron un máximo de concentración igual a 6,68 [mg/mL] al día 8, mientras que los cultivos a pH 5,5 alcanzaron un valor máximo de 6,28 [mg/mL] al día 5.

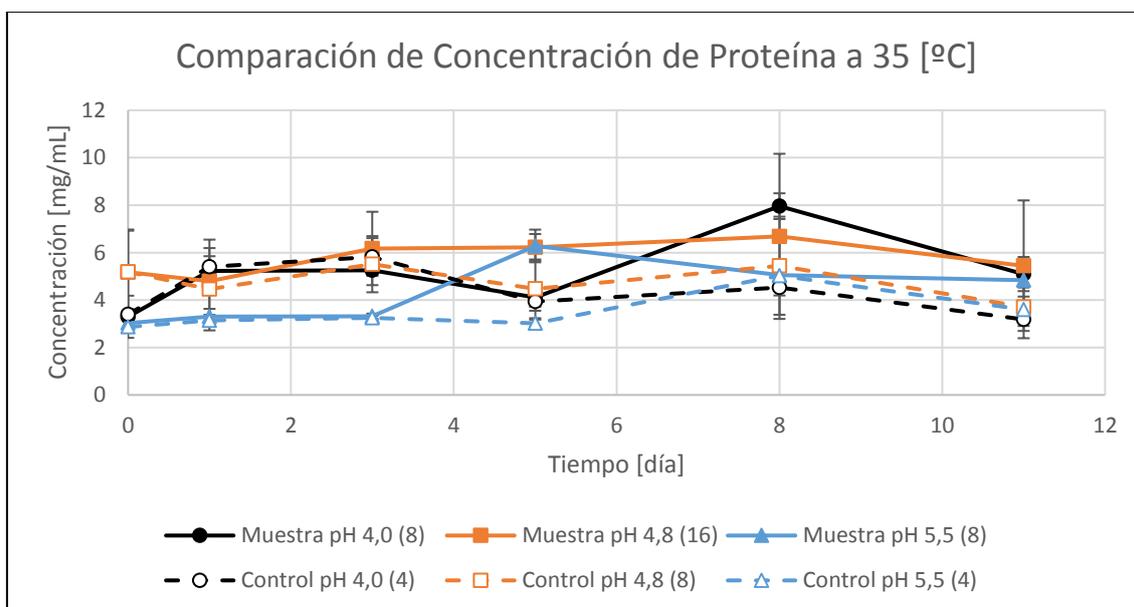


Figura 13: Gráfico comparativo de la concentración de proteínas intracelulares en función del tiempo, entre los cultivos con temperatura 35 [°C] a diferentes pH. Número de muestras para cada cultivo definido entre paréntesis en la leyenda.

Al contrario de los casos anteriores, para una temperatura de 35 [°C], la concentración de proteínas en las muestras inoculadas comenzó a superar a las concentraciones de los controles negativos a partir del día 5 y no del 3. A medida que se aumenta la temperatura de cultivo, las concentraciones máximas de las muestras inoculadas se alcanzan de manera más tardía, siendo la única excepción a la regla la condición de cultivo de 35 [°C] y pH 4,8.

Por otro lado, al analizar si las diferencias de concentración entre las muestras inoculadas y las de control son significativas, se obtuvieron resultados similares a los obtenidos en las temperaturas anteriores, donde las máximas concentraciones alcanzadas presentan diferencias estadísticamente significativas en relación con su control negativo, mientras que para la mayoría de las concentraciones las diferencias no son significantes.

Tabla 19: Análisis estadístico t-student para evaluar diferencias significativas entre las concentraciones proteicas de las muestras inoculadas y de control. Caso a 35 [°C]. Si valor P es menor a 0,05, entonces la diferencia es significativa.

| Comparación de pH a 35 [°C] | | Día | | | | | |
|-----------------------------|---------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | | 0 | 1 | 3 | 5 | 8 | 11 |
| 4,0/C- | Valor P | $6,5 \cdot 10^{-1}$ | $2,0 \cdot 10^{-1}$ | $1,3 \cdot 10^{-1}$ | $8,6 \cdot 10^{-1}$ | $3,1 \cdot 10^{-7}$ | $6,1 \cdot 10^{-4}$ |
| | Significativo | NO | NO | NO | NO | SI | SI |
| 4,8/C- | Valor P | $9,1 \cdot 10^{-1}$ | $8,7 \cdot 10^{-1}$ | $2,4 \cdot 10^{-1}$ | $3,8 \cdot 10^{-3}$ | $3,9 \cdot 10^{-1}$ | $5,7 \cdot 10^{-2}$ |
| | Significativo | NO | NO | NO | SI | NO | NO |
| 5,5/C- | Valor P | $2,6 \cdot 10^{-1}$ | $4,3 \cdot 10^{-1}$ | $3,8 \cdot 10^{-1}$ | $1,4 \cdot 10^{-6}$ | $9,5 \cdot 10^{-1}$ | $5,6 \cdot 10^{-4}$ |
| | Significativo | NO | NO | NO | SI | NO | SI |

Al evaluar si las diferencias de concentración entre muestras inoculadas y de control son significativas (Ver Tabla 19), se obtuvo que las diferencias entre las concentraciones máximas obtenidas y las de control asociadas, son estadísticamente significativas. Al igual que en caso anterior, la generalidad de las diferencias de concentración no es significativas.

Después, la mayor diferencia de concentración proteica obtenida entre las muestras inoculadas y los controles negativos fue a pH inicial 4,0 teniendo un valor igual a 3,43 [mg/mL] al día 8. Así, independiente de la temperatura, la mayor diferencia de concentración proteica entre muestras inoculadas y controles se obtiene siempre a pH inicial 4,0. En la Tabla 20 se contrastan las condiciones de cultivo con las máximas diferencias de concentración registradas, el día en que se registró y la productividad asociada.

Tabla 20: Correlación entre las condiciones de cultivo, las máximas diferencias de concentración obtenidas y la productividad asociada.

| Exp | Condición de cultivo | | Máxima diferencia de Concentración [mg/mL] | Día obtenido | Productividad [mg/(mL·día)] |
|-----|----------------------|---------|--|--------------|-----------------------------|
| | pH inicial | T° [°C] | | | |
| 1 | 4,0 | 25 | 2,23 | 5 | 0,45 |
| 2 | 4,0 | 30 | 3,72 | 5 | 0,74 |
| 3 | 4,0 | 35 | 3,43 | 8 | 0,43 |
| 4 | 4,8 | 25 | 2,21 | 8 | 0,28 |
| 5 | 4,8 | 30 | 1,32 | 5 | 0,26 |
| 6 | 4,8 | 35 | 1,75 | 8 | 0,35 |
| 7 | 5,5 | 25 | 2,10 | 3 | 0,70 |
| 8 | 5,5 | 30 | 1,94 | 3 | 0,65 |
| 9 | 5,5 | 35 | 3,26 | 5 | 0,65 |

En todos los experimentos a excepción del caso 30 [°C] – pH inicial 4,8, el día en que se alcanzó la máxima diferencia de concentración de proteína coincide con el día que se obtuvo el máximo valor de concentración para un experimento dado. Sin embargo, el experimento que registró la mayor concentración de proteína obtenida (Caso 25 [°C] – pH inicial 4,8) no coincide con el experimento que alcanzó la máxima diferencia de concentración (Caso 30 [°C] – pH inicial 4,0).

Por último, no se puede concluir sobre los efectos del pH inicial en la concentración de proteínas, ya que por una parte el producto de que la variación de ésta última no sigue una tendencia por el aumento o disminución del pH inicial, y por otra parte la diferencia de concentración de *Ulva rigida* en los cultivos repercutió en las concentraciones de proteína analizadas. Además, las máximas diferencias de concentración de proteínas se registraron a pH inicial 4,0 y a 35 [°C], lo cual no coincide con lo descrito en bibliografía [38][40].

3.2.2. EFECTOS DE LA VARIACIÓN DE TEMPERATURA SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

Tras analizar las Figuras 14-16, se observó que, a un pH dado, el primer aumento de la concentración proteica por parte de las muestras inoculadas se da de manera temprana mientras menor sea la temperatura.

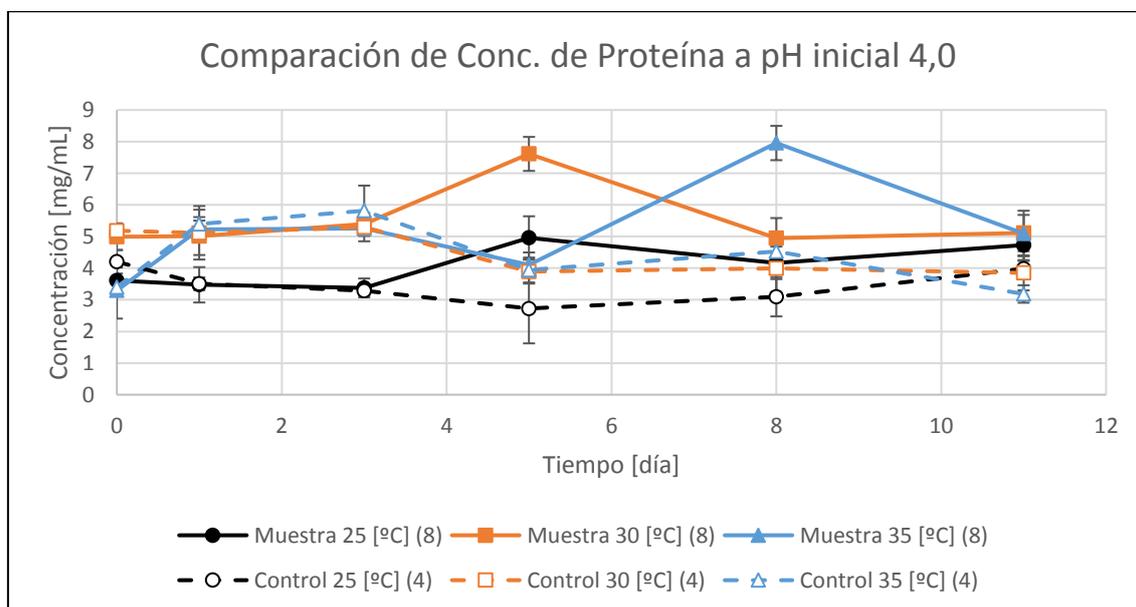


Figura 14: Gráfico comparativo de la concentración de proteínas intracelulares en función del tiempo, entre los cultivos con pH 4,0 a diferentes temperaturas. Número de muestras para cada cultivo definido entre paréntesis en la leyenda.

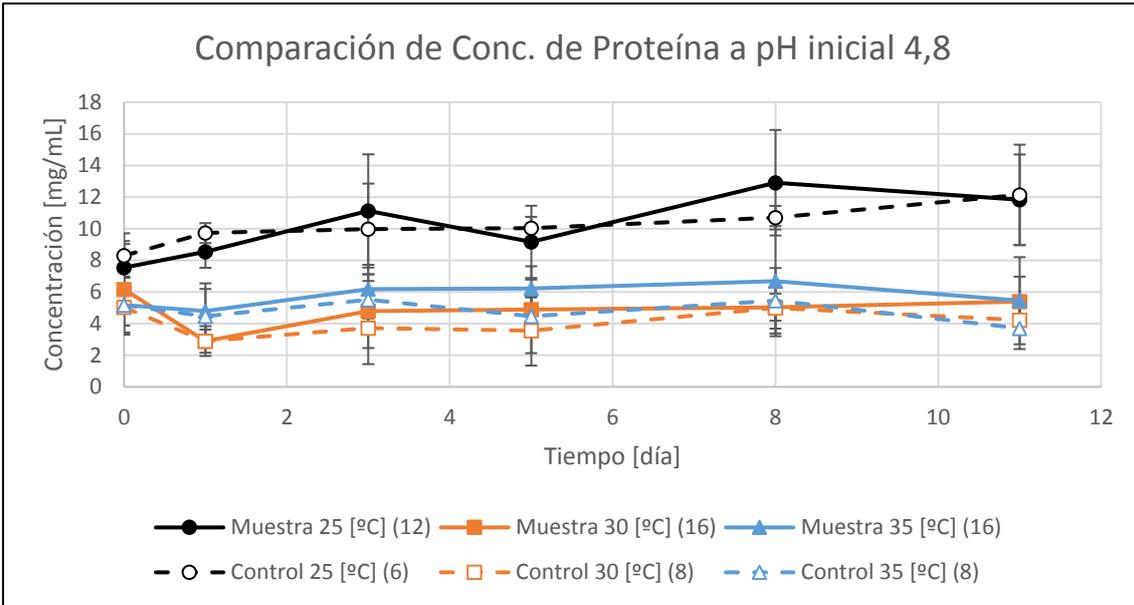


Figura 15: Gráfico comparativo de la concentración de proteínas intracelulares en función del tiempo, entre los cultivos con pH 4,8 a diferentes temperaturas. Número de muestras para cada cultivo definido entre paréntesis en la leyenda.

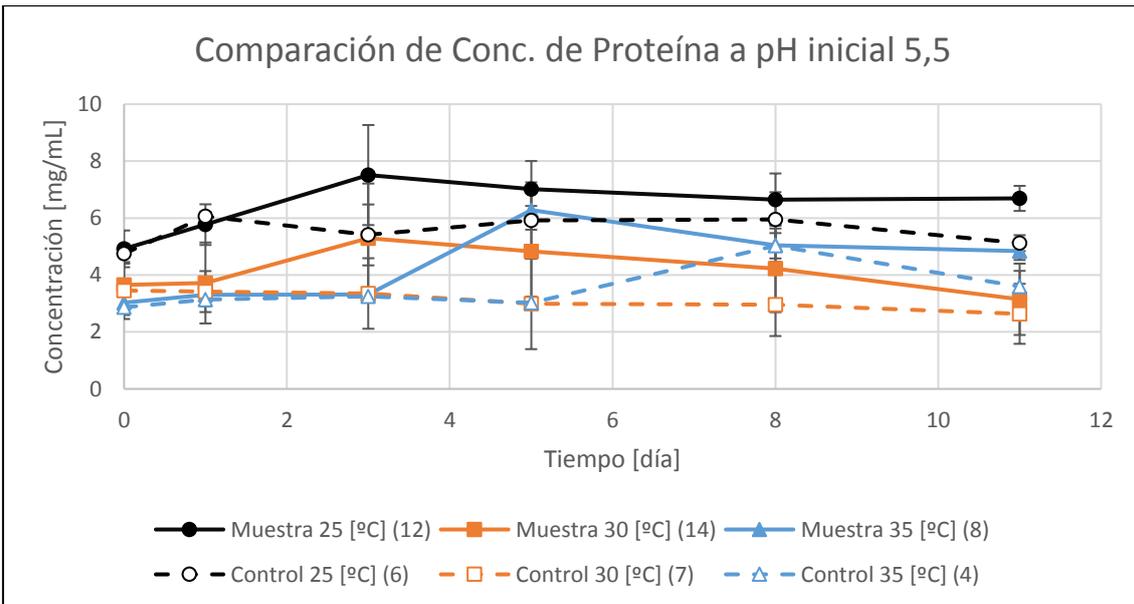


Figura 16: Gráfico comparativo de la concentración de proteínas intracelulares en función del tiempo, entre los cultivos con pH 5,5 a diferentes temperaturas. Número de muestras para cada cultivo definido entre paréntesis en la leyenda.

Por otra parte, no se puede determinar una correlación entre el aumento de temperatura y la concentración proteica máxima adicional a las mencionadas con anterioridad. Lo anterior se debe a que, para los variados pH, el aumento de temperatura no influye de la misma manera en la máxima concentración obtenida. A modo de ejemplo, para un pH 4,0 a medida que aumenta la temperatura la concentración máxima de proteína intracelular aumenta. Sin embargo, para un pH de 5,5 al incrementar la temperatura, la concentración máxima de proteína intracelular disminuye.

Al asociar las condiciones óptimas de cultivo bibliográficas para la producción de proteínas por parte de *Trichoderma reesei* RUT C-30 con lo obtenido, se tuvo que las condiciones de cultivo del experimento donde se registró la mayor concentración (25 [°C] – pH inicial 4,8) coinciden en cierto grado con las descritas en 2013 por Li et al. (26 [°C] – pH 5,0) [38], no obstante, el valor de concentración proteica obtenido por ellos fue inferior al obtenido por esta investigación (4,0 [mg/mL] versus 12,91 [mg/mL]), diferencia que se debe a la presencia inicial de proteínas por parte de la fuente de carbono.

Por otro lado, la condición de cultivo donde se obtuvo la mayor diferencia de concentración de proteína (30 [°C] – pH inicial 4,0) coincide únicamente en el nivel de pH con lo establecido por Li et al. (2013), en donde establecieron que pH 4,0 es el óptimo para la producción de biomasa y de endoglucanasas. Posteriormente, cabe destacar que los valores de concentración presentados coinciden en su gran parte con los valores bibliográficos de Ghanem (1992) [44], hallándose estos en torno a la concentración de 7,00 [mg/mL].

Luego, en función de los valores de concentración de proteína presentados, no se pueden establecer las condiciones de cultivo que maximizan la producción de estas. Lo anterior se debe a que tanto los matraces de cultivo, como las alícuotas analizadas, presentaban variaciones en las concentraciones de alga, lo cual generó que las proteínas cuantificadas dependieran de la biomasa fúngica y de los residuos de alga presentes en el medio. Se añade que, dichas variaciones de concentración de alga en los medios se vieron reflejadas tanto en las desviaciones estándar de las mediciones de concentración de proteínas, como en los niveles de significancia estadísticas entre muestra inoculadas y de control negativo.

En cuanto a las razones de las variaciones de concentración del alga, estas se deben a que el alga no es completamente soluble en agua, por lo que al trasvasijar el medio de cultivo desde el matraz madre hacia los matraces de fermentación, la concentración de *Ulva rigida* no fue igual para todos. En el caso de las alícuotas, se presentó el mismo problema cuando estas provenían de matraces que eran control negativo, o bien, de matraces inoculados que llevaban poco tiempo de cultivo (0 a 3 días).

Finalmente, para determinar la condición de cultivo que maximiza la producción de proteínas, se decidió normalizar por la suma de la masa de hongo y alga residual (masa de pellet) resultante de la centrifugación post lisis celular. Es por ello, que en la siguiente sección se presentan las variaciones de masa de pellet en función de la temperatura y del pH.

3.3. EFECTOS DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO SOBRE LA BIOMASA Y EL SUSTRATO RESIDUAL

Se entenderá el concepto de masa de pellet como aquella masa que decanta tras la etapa de centrifugación post lisis celular, la cual se compone principalmente de células de hongo *Trichoderma reesei* RUT-C30 (Biomasa) y del alga verde *Ulva rigida* (Sustrato).

A modo de simplificación de resultados, sólo se presentarán los gráficos que comprenden la variación de masa de pellet en función del tiempo para variados pH iniciales a una temperatura dada. Lo anterior debido a que para este parámetro sólo importa la diferencia de los valores de masa pellet conforme avanza el tiempo y de si éstos provienen de cultivos inoculados o de control.

Para cuantificar la masa de pellet resultante de la centrifugación post lisis celular, se midió el peso húmedo de las muestras mediante balanza. Por ende, los resultados mostrados en las Figuras 17-19 presentan un margen de error no cuantificado, correspondiente a la retención de agua por parte del pellet.

Por otra parte, producto del cambio en los volúmenes de solución de lisis de 0,5 [mL] a 0,25 [mL], algunos resultados presentaron menores magnitudes de masa de pellet, como en el caso de los cultivos que se llevaron a cabo a 25 [°C] y pH 4,0 que presentaron la mitad de masa en comparación a los cultivos que se llevaron a cabo a pH 4,8 y 5,5. Así, se procedió a normalizar la masa de pellet por el volumen de lisis, con la finalidad de generar un parámetro comparativo.

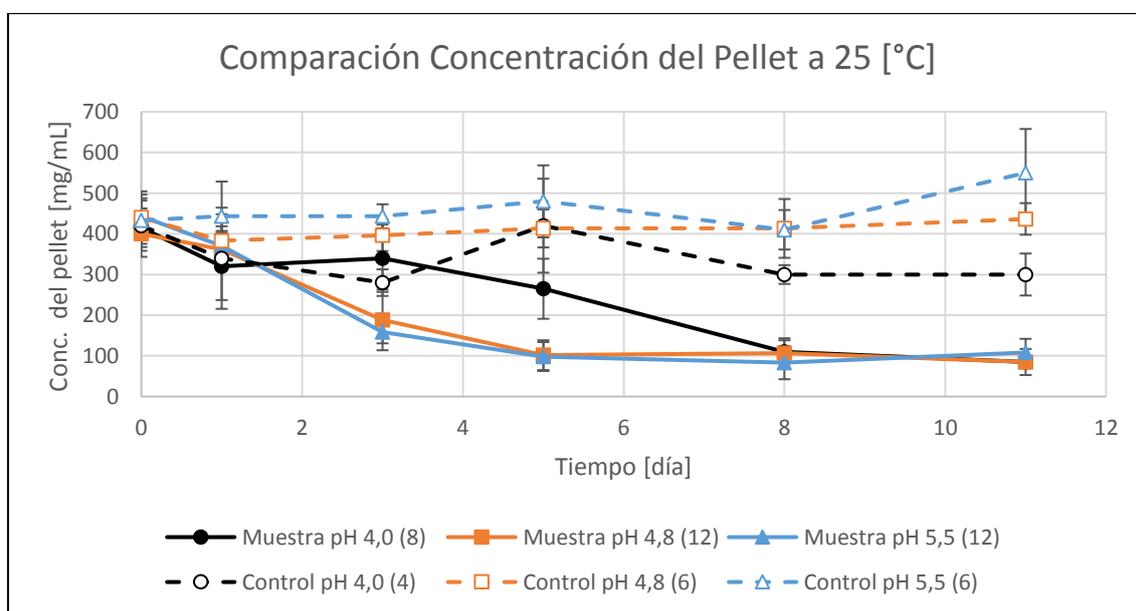


Figura 17: Gráfico comparativo de la concentración del pellet en función del tiempo, entre los cultivos con temperatura 25 [°C] a diferentes pH iniciales. Número de muestras para cada cultivo definido entre paréntesis en la leyenda.

Respecto al comportamiento de la concentración de pellet en función del tiempo, e independiente de la condición de cultivo, se observó que para las muestras inoculadas la concentración de pellet disminuía conforme avanzó el tiempo, alcanzando un valor constante a partir del día 5 u 8. Lo anterior se respalda al revisar las curvas de las Figuras 17-19.

Por otra parte, en base a la composición del pellet tras pasar los días, la masa referente al alga disminuye dado que es consumida por el hongo filamentoso, mientras que la biomasa referente al hongo aumenta.

Al analizar el comportamiento de los niveles de la concentración de pellet en los casos con pH inicial 4,0 (para toda temperatura), se observó que estos alcanzaban concentraciones similares a los casos con pH inicial igual a 4,8 y 5,5 tras el día 8. Se observó que siempre a pH inicial 4,0 la disminución de la concentración del pellet se retrasaba, por ende, se infiere que a este pH la capacidad de *Trichoderma reesei* para consumir *Ulva rigida* se reduce.

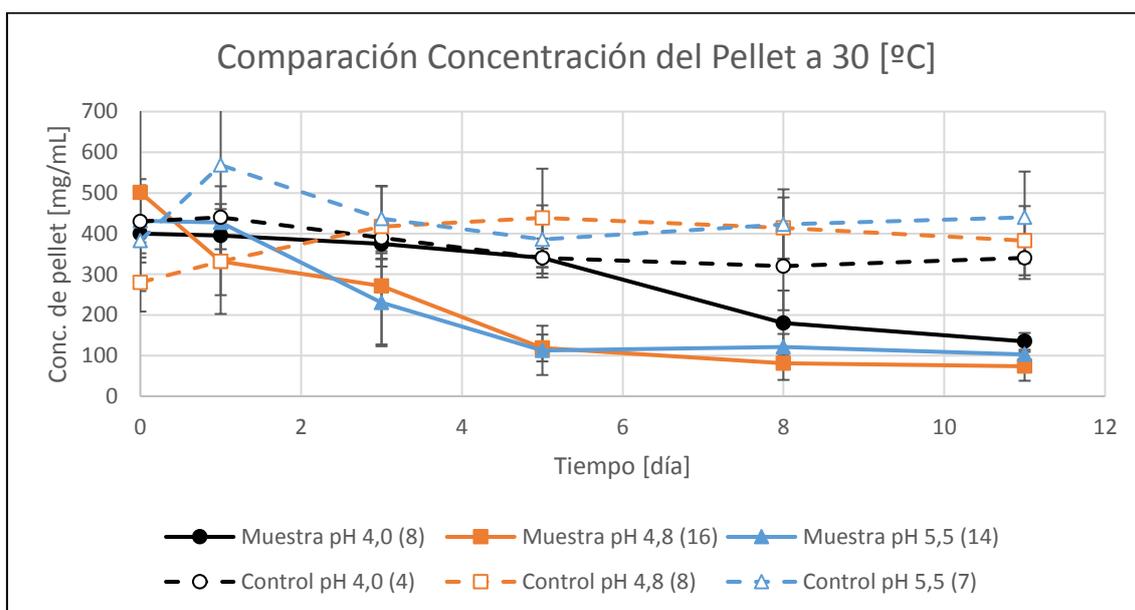


Figura 18: Gráfico comparativo de la concentración de pellet en función del tiempo, entre los cultivos con temperatura 30 [°C] a diferentes pH iniciales. Número de muestras para cada cultivo definido entre paréntesis en la leyenda.

Referente a la concentración del pellet registrada para los controles negativos, se esperaba que ésta presentase un comportamiento constante a lo largo del tiempo para todos los experimentos, sin embargo, ésta presentó fluctuaciones en sus valores que se atribuyeron a las diferencias de concentración de las muestras analíticas.

Al tratar de relacionar la concentración del pellet resultante de la centrifugación post lisis celular con las condiciones de cultivo, se puede apreciar que a medida que aumenta el pH, la masa pellet de las muestras inoculadas alcanza un valor constante de manera más temprana, dicho valor oscila alrededor de los 100 [mg/mL] para todas las condiciones. En el caso de la concentración de pellet evaluado a diferentes temperaturas, no se aprecia una relación clara.

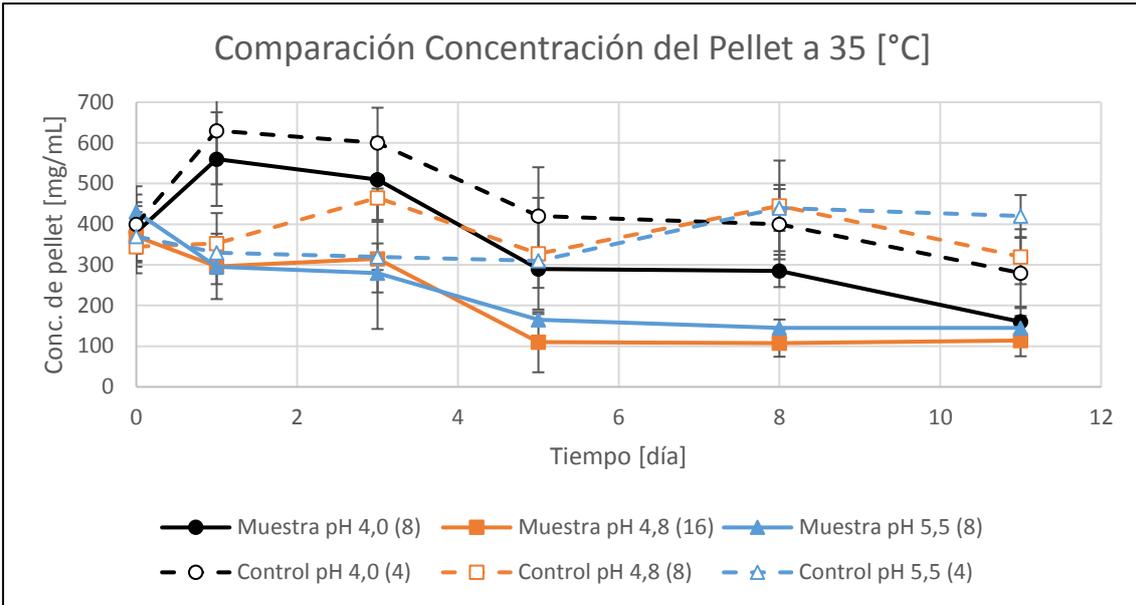


Figura 19: Gráfico comparativo de la concentración de pellet en función del tiempo, entre los cultivos con temperatura 35 [°C] a diferentes pH iniciales. Número de muestras para cada cultivo definido entre paréntesis en la leyenda.

Por otra parte, al registrar la variación de pH en función del tiempo, se encontró una relación entre el día en que la concentración del pellet de las muestras inoculadas alcanza valores constantes y el día en que el pH se alcaliniza. Así, en las Figuras 20-22, se contrastan los valores de concentración del pellet de las muestras inoculadas con las variaciones de pH asociadas.

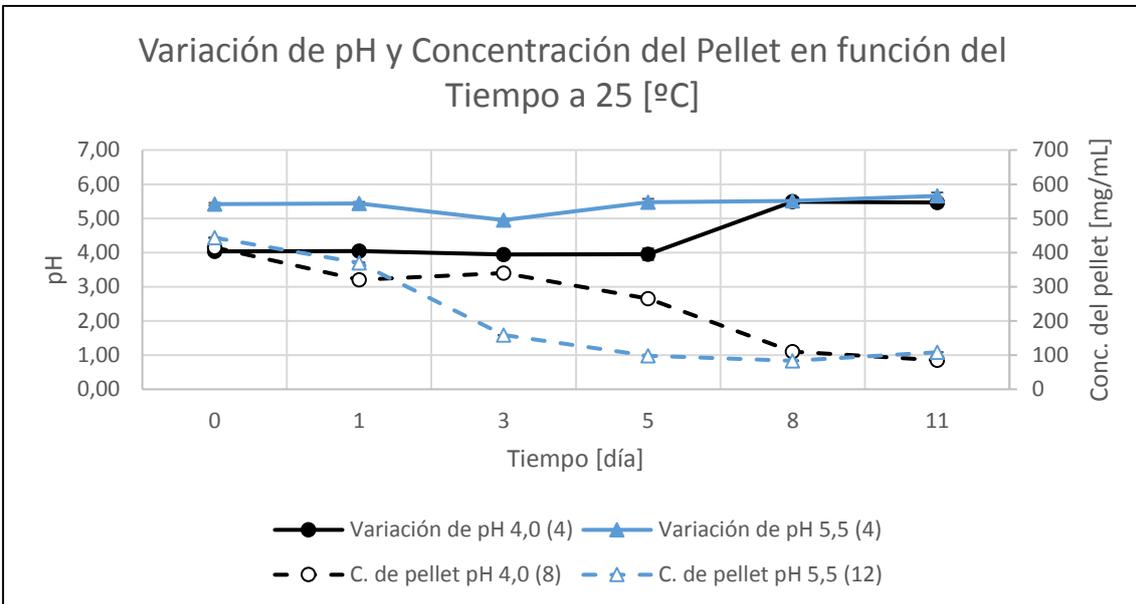


Figura 20: Gráfico comparativo de variación de pH y concentración de pellet en función del tiempo, entre los cultivos inoculados a diferentes pH iniciales y a temperatura constante de 25 [°C]. Número de muestras para cada cultivo definido entre paréntesis en la leyenda.

Se enfatiza que para los cultivos que estuvieron bajo las condiciones de 25 [°C] y a pH inicial 4,8, no se registraron valores de pH a través de los días, producto que la medición de este parámetro comenzó en experimentos posteriores. No obstante, y en base al comportamiento del resto de los experimentos, se puede establecer que la variación de pH en los primeros días disminuye, y posterior al día 3 o 5 éste tendería a elevarse.

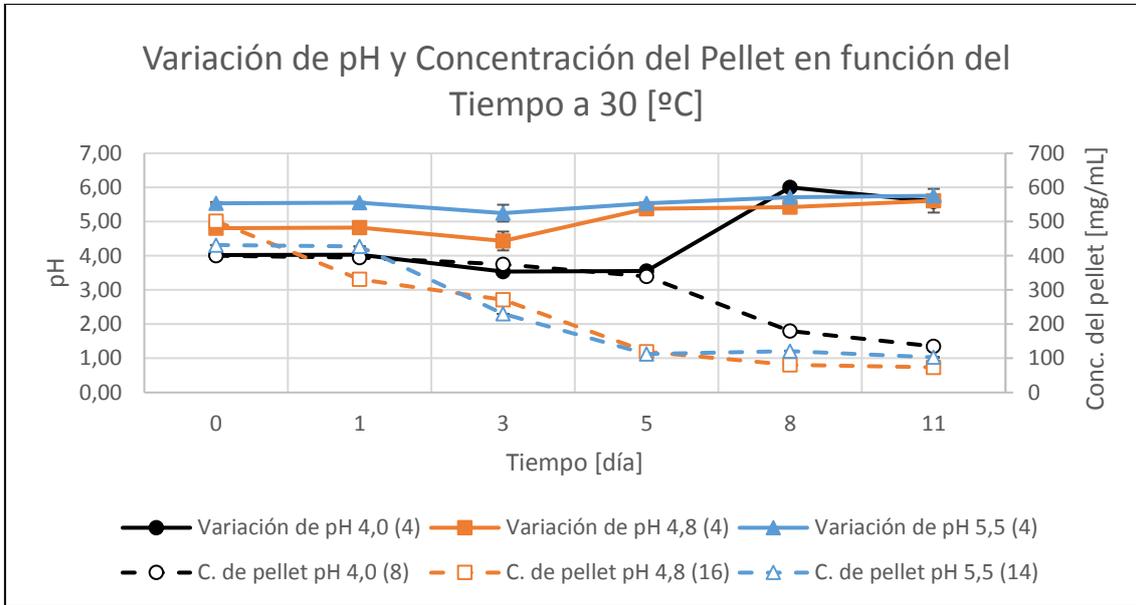


Figura 21: Gráfico comparativo de variación de pH y concentración de pellet en función del tiempo, entre los cultivos inoculados a diferentes pH iniciales y a temperatura constante de 30 [°C]. Número de muestras para cada cultivo definido entre paréntesis en la leyenda.

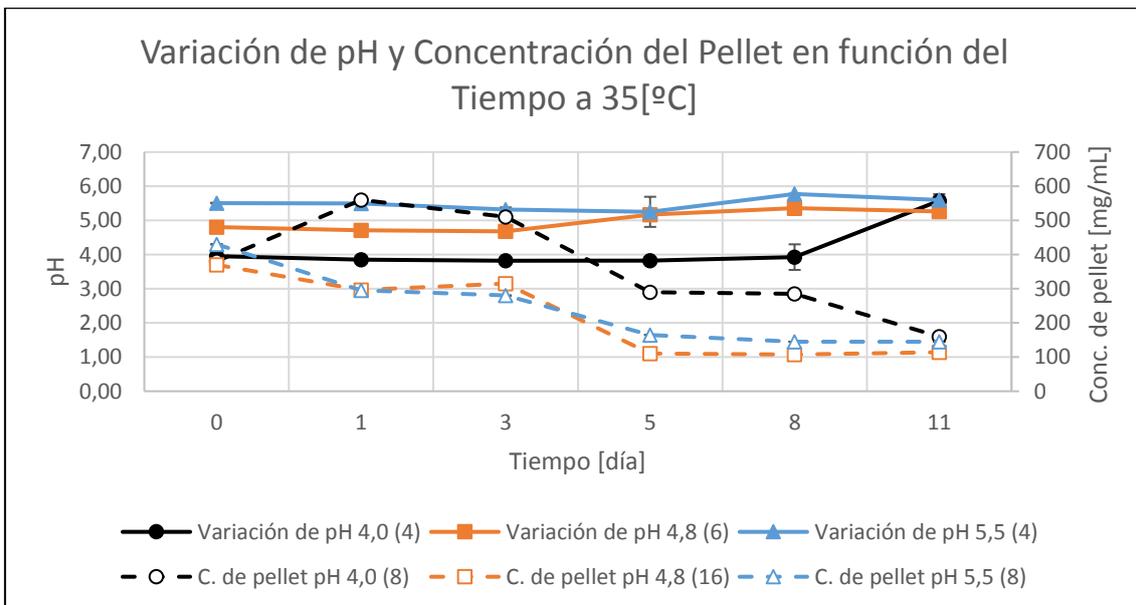


Figura 22: Gráfico comparativo de variación de pH y masa de pellet en función del tiempo, entre los cultivos inoculados a diferentes pH iniciales y a temperatura constante de 35 [°C]. Número de muestras para cada cultivo definido entre paréntesis en la leyenda.

En cuanto al efecto del pH inicial, se obtuvo que, para valores iniciales de 4,0, la elevación de pH hasta valores cercanos a 5,5 se da de manera más tardía que para los cultivos a pH inicial de 4,8 y 5,5, siendo comúnmente entre los días 8-11 para el primer caso, y entre los días 3-5 para el resto.

Posteriormente, en base en los efectos de la temperatura en la variación de pH, se observó que a medida que la temperatura asciende, la elevación de pH se retrasa para los cultivos con pH inicial 5,5 y 4,0. El fenómeno no se puede evidenciar para los cultivos a pH inicial 4,8, debido a que no se tienen registros de pH para el caso a 25 [°C]. Sin embargo, se cree que el retraso de la alcalinización se debió a que al aumentar de temperatura del medio disminuyó la producción de proteínas extracelulares y/o metabolitos secundarios que se liberan al medio extracelular.

Lo descrito en el párrafo anterior se fundamenta, con lo observado por Duff et al. (1987), quienes establecieron que para temperaturas superiores a 30 [°C] la producción de tanto de celulasas, como de proteínas extracelulares, disminuye. Además, y a diferencia de lo obtenido en esta investigación, Duff et al. (1987) obtuvieron un decaimiento constante del pH durante el cultivo, no obstante, los cultivos presentaban tanto *Trichoderma reesei* RUT C-30, como *Aspergillus phoenicis* ATCC 329 [40].

Se observó que, independiente del valor del pH inicial de los medios inoculados, éste tendió a subir y/o mantenerse en valores cercanos a 5,5 al pasar de los días. Lo anterior advierte que el hongo filamentoso es capaz de regular el pH del medio a valores cercanos a 5,5, tras el consumo del alga en cuestión. Sin embargo, y como se verá en la sección 3.4, a pesar de que el pH inicial fue ajustado a valores cercanos a 5,5, éste igual jugó un rol importante para la determinación de las condiciones favorables de cultivo.

Finalmente, se concluye que la disminución de la masa residual se debió principalmente a la degradación del *Ulva rigida* por parte del hongo, mientras que el aumento del pH en los cultivos se debió a la producción de proteínas extracelulares. Además, el aumento del pH a valores en torno a 5,5 coincidió cuando la masa residual mantuvo valores cercanos a 100 [mg/mL]

3.4. EFECTOS DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO SOBRE RELACIÓN MÁSCA

Las relaciones máscas que se presentan a continuación son una normalización de la concentración de proteínas obtenidas en función de la masa de pellet. El método de cálculo se detalla en el Anexo D.

La normalización tuvo como objetivo plantear la cantidad de proteína producida en función de la masa lisada. Así, se pudo comparar las alícuotas que presentaban menor biomasa lisada y producían niveles de proteína semejantes alícuotas que presentaban una mayor biomasa masa lisada. Además, para el análisis de este parámetro se consideraron los efectos del pH inicial y de la temperatura de cultivo.

Así, al normalizar, las relaciones másicas son capaces de mostrar una diferencia notable entre la cantidad de proteína producidas por los hongos y la cantidad ya presente en las algas del control negativo. Al analizar los gráficos de las Figuras 23-28, se pudo detectar con claridad el comportamiento constante de los controles negativos, tendencia que no era clara en las mediciones de concentración de proteína. En contraste, los resultados de relación másica para las muestras inoculadas presentaron fases de producción de proteínas similares a las de crecimiento celular.

3.4.1. EFECTOS DE LA VARIACIÓN DEL pH INICIAL SOBRE LA RELACIÓN MÁSCICA

Al analizar la Figura 23, se obtuvo que para las muestras con un pH inicial de 4,0 y 4,8 no alcanzaron la fase estacionaria, sino que presentaron un crecimiento lineal hasta el día 11. Se espera que alcancen la fase estacionaria en días posteriores.

Por otra parte, para los cultivos a temperatura de 25 [°C], el valor máximo de la relación másica obtenida por las muestras inoculadas a pH inicial de 4,8 fue para el día 11 con un promedio de 165,86 [mg/g] y una desviación estándar de 91,24 [mg/g]. Luego, la máxima relación másica para las muestras inoculadas a pH inicial de 5,5 fue para el día 8 con un promedio de 93,44 [mg/g] y una desviación estándar de 34,84 [mg/g]. Por último, la máxima relación másica promedio para las muestras a pH 4,0 fue de 56,55 [mg/g], con una desviación de 8,88 [mg/g] para el día 11.

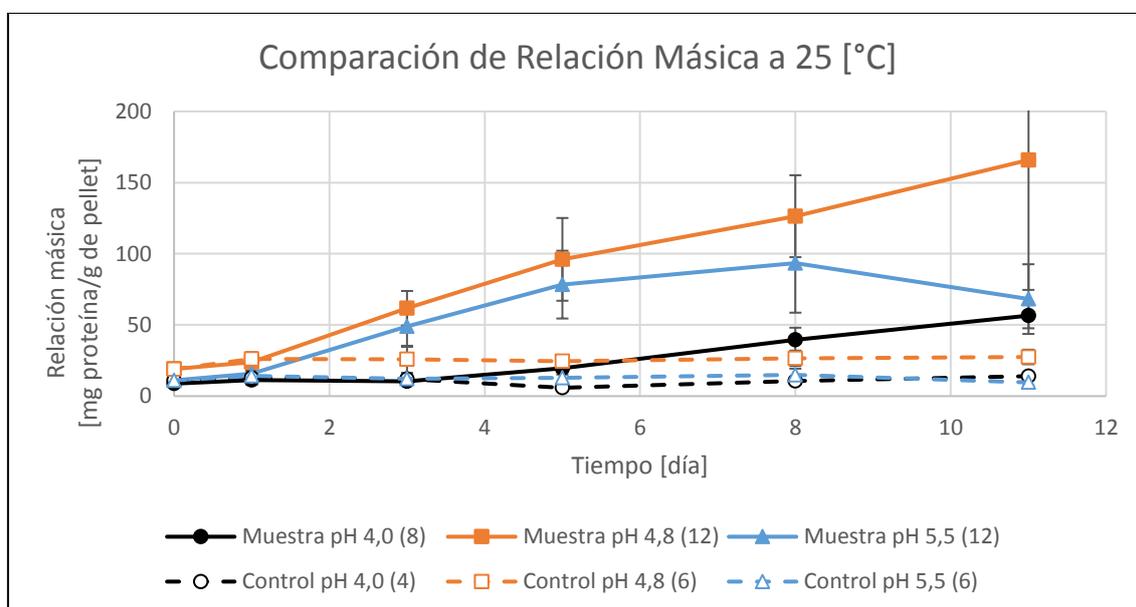


Figura 23: Gráfico comparativo de la relación másica en función del tiempo, entre los cultivos con temperatura 25 [°C] a diferentes pH iniciales. Número de muestras para cada cultivo definido entre paréntesis en la leyenda.

En base a las altas desviaciones estándar obtenidas para las relaciones másicas, se procedió a realizar un análisis t-student que comparase las diferencias entre los valores de relación másica obtenidos para las distintas condiciones de pH inicial a 25 [°C]. Así, al ver los valores de la Tabla 21, se pudo establecer que las máximas relaciones másicas obtenidas para los casos de pH 4,8 y 5,5 difieren significativamente de las relaciones másicas de los casos con diferente pH en un mismo día, 11 y 8 respectivamente. Por el contrario, la máxima relación másica obtenida para pH inicial 4,0 (Obtenida en el día 11), difiere significativamente de la relación másica obtenida para el caso de pH 4,8 el mismo día, pero no a la obtenida para el caso a pH inicial 5,5.

Tabla 21: Análisis estadístico t-student para evaluar diferencias significativas entre las relaciones másicas de las muestras inoculadas a diferentes pH inicial según día. Caso a 25 [°C]. Si valor P es menor a 0,05, entonces la diferencia es significativa.

| Comparación de pH a 25 [°C] | | Día | | | | | |
|-----------------------------|---------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | | 0 | 1 | 3 | 5 | 8 | 11 |
| 4,0/4,8 | Valor P | $2,3 \cdot 10^{-6}$ | $1,6 \cdot 10^{-7}$ | $7,4 \cdot 10^{-4}$ | $1,3 \cdot 10^{-6}$ | $1,4 \cdot 10^{-7}$ | $1,6 \cdot 10^{-3}$ |
| | Significativo | SI | SI | SI | SI | SI | SI |
| 4,0/5,5 | Valor P | $1,6 \cdot 10^{-4}$ | $1,0 \cdot 10^{-3}$ | $1,1 \cdot 10^{-6}$ | $2,3 \cdot 10^{-6}$ | $2,0 \cdot 10^{-4}$ | $1,5 \cdot 10^{-1}$ |
| | Significativo | SI | SI | SI | SI | SI | NO |
| 4,8/5,5 | Valor P | $4,3 \cdot 10^{-5}$ | $9,7 \cdot 10^{-7}$ | $2,7 \cdot 10^{-2}$ | $1,2 \cdot 10^{-1}$ | $1,9 \cdot 10^{-2}$ | $3,5 \cdot 10^{-3}$ |
| | Significativo | SI | SI | SI | NO | SI | SI |

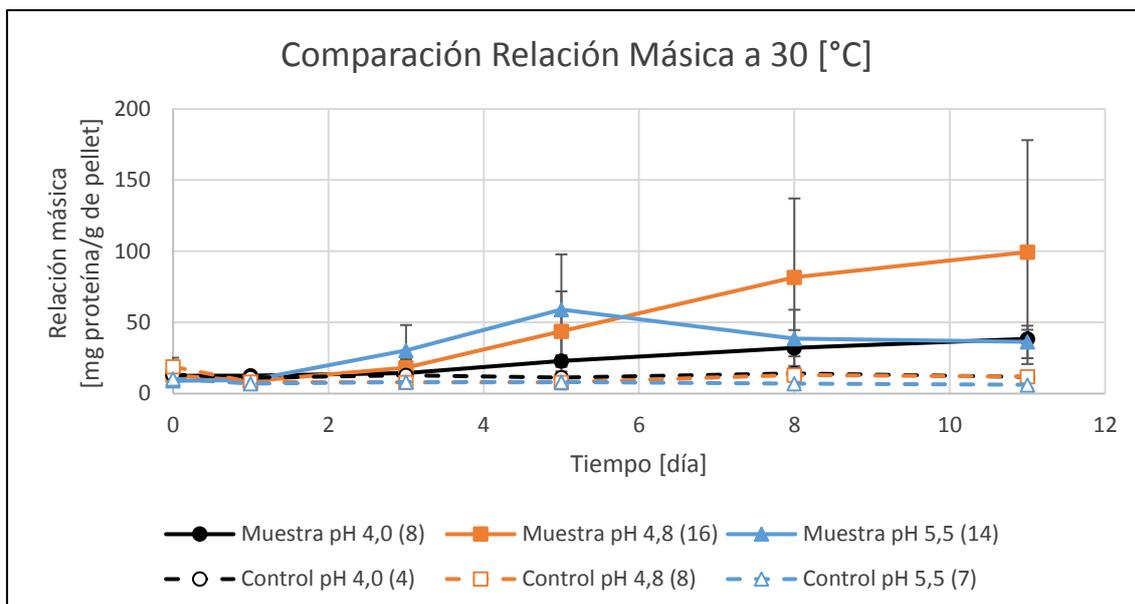


Figura 24: Gráfico comparativo de la relación másica en función del tiempo, entre los cultivos con temperatura 30 [°C] a diferentes pH iniciales según día. Número de muestras para cada cultivo definido entre paréntesis en la leyenda.

Para el caso de la relación másica a 30 [°C] (Ver Figura 24), se observó que las muestras a pH 4,8 alcanzan la fase estacionaria justo al día 11, siendo además en éste día donde se alcanzó la máxima relación másica con un valor promedio de 99,41 [mg/g], y una desviación estándar de 78,64 [mg/g]. Se plantea la necesidad de realizar más experimentos para esta condición de cultivo, dado el alto valor de la desviación estándar registrado para el día 11.

Por otra parte, para los casos de pH inicial 4,0 y 5,5, se alcanzaron valores promedio de relación másica iguales a 38,47 [mg/g] al día 11 y 59,07 [mg/g] al día 5, respectivamente. Luego, las muestras a pH 5,5 alcanzaron la fase estacionaria en el día 5, mientras que las muestras a pH inicial 4,0 sólo presentan la fase de crecimiento lineal, al igual que en el caso anterior.

Tabla 22: Análisis estadístico t-student para evaluar diferencias significativas entre las relaciones másicas de las muestras inoculadas a diferentes pH inicial. Caso a 30 [°C]. Si valor P es menor a 0,05, entonces la diferencia es significativa.

| Comparación de pH a 30 [°C] | | Día | | | | | |
|-----------------------------|---------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | | 0 | 1 | 3 | 5 | 8 | 11 |
| 4,0/4,8 | Valor P | $7,6 \cdot 10^{-1}$ | $9,2 \cdot 10^{-5}$ | $2,3 \cdot 10^{-2}$ | $1,0 \cdot 10^{-2}$ | $3,2 \cdot 10^{-3}$ | $7,4 \cdot 10^{-3}$ |
| | Significativo | NO | SI | SI | SI | SI | SI |
| 4,0/5,5 | Valor P | $1,9 \cdot 10^{-3}$ | $2,9 \cdot 10^{-2}$ | $5,1 \cdot 10^{-3}$ | $4,0 \cdot 10^{-3}$ | $4,3 \cdot 10^{-1}$ | $6,3 \cdot 10^{-1}$ |
| | Significativo | SI | SI | SI | SI | NO | NO |
| 4,8/5,5 | Valor P | $1,3 \cdot 10^{-2}$ | $6,3 \cdot 10^{-1}$ | $2,6 \cdot 10^{-2}$ | $2,2 \cdot 10^{-1}$ | $9,2 \cdot 10^{-3}$ | $6,0 \cdot 10^{-3}$ |
| | Significativo | SI | NO | SI | NO | SI | SI |

Luego, al realizar un análisis estadístico t-student (Ver Tabla 22), se obtuvo que la máxima relación másica para el caso de pH inicial 4,8 difiere significativamente de las relaciones másicas obtenidas para el mismo día a pH inicial 4,0 y 5,5. Además, se obtuvo que la máxima relación másica para pH inicial 4,0 no difiere significativamente de la relación másica a pH inicial 5,5 en el día 11. Luego, la diferencia entre la máxima relación másica a pH 5,5 con la obtenida a pH inicial 4,8 para el mismo día fue insignificante. Esto último se cree que se debe a la alta variabilidad de los resultados a pH inicial 5,5 en el día 5, lo que sugiere realizar nuevos experimentos bajo las mismas condiciones.

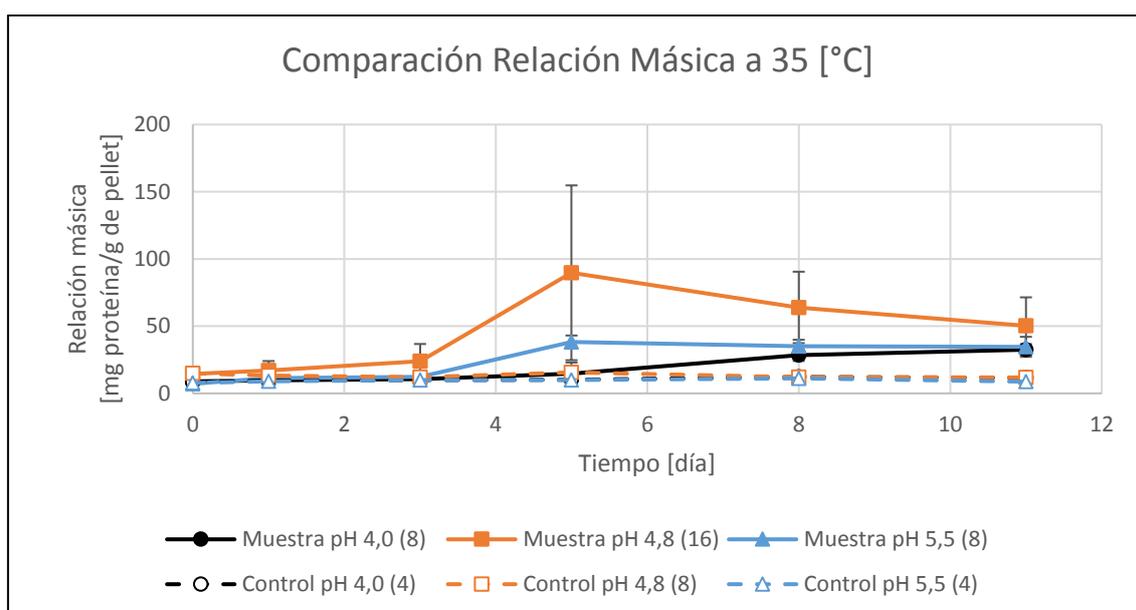


Figura 25: Gráfico comparativo de la relación másica en función del tiempo, entre los cultivos con temperatura 35 [°C] a diferentes pH iniciales según día. Número de muestras para cada cultivo definido entre paréntesis en la leyenda.

En el caso de las relaciones másicas a temperatura de 35 [°C] (Ver Figura 25), nuevamente se obtuvo que el valor máximo de las relaciones másicas fue a pH 4,8, siendo este igual a 89,71 [mg/g] al día 5, y con una desviación estándar de 65,04 [mg/g]. Debido al valor de la desviación estándar se propone realizar más experimentos entorno a esta condición para verificar el valor obtenido. No obstante, a pesar del valor obtenido para el día 5, se observó que el comportamiento de la relación másica para días posteriores es siempre superior al resto de las condiciones, por lo que se cumplió que a pH 4,8 se obtienen los mayores valores para la relación másica en comparación a pH 4,0 y 5,5.

Al igual que en los casos anteriores, se obtuvo que las muestras que fueron cultivadas con un pH inicial de 5,5 lograron obtener una mayor relación másica que las cultivadas a pH 4,0, siendo 38,24 [mg/g] el máximo valor promedio de relación másica para los cultivos a pH 5,5 al día 5, y 32,50 [mg/g] para los cultivos a pH inicial 4,0 al día 11.

En este contexto, los inóculos cultivados a pH 4,8 alcanzaron la fase estacionaria al día 5, al igual que los cultivados a pH inicial 5,5. Luego, las muestras cultivadas a pH 4,0 siguieron mostrando un comportamiento lineal hasta el día 11.

Tabla 23: Análisis estadístico t-student para evaluar diferencias significativas entre las relaciones másicas de las muestras inoculadas a diferentes pH inicial. Caso a 35 [°C]. Si valor P es menor a 0,05, entonces la diferencia es significativa.

| Comparación de pH a 35 [°C] | | Día | | | | | |
|--------------------------------|---------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | | 0 | 1 | 3 | 5 | 8 | 11 |
| 4,0/4,8 | Valor P | $1,4 \cdot 10^{-2}$ | $1,5 \cdot 10^{-3}$ | $8,4 \cdot 10^{-4}$ | $3,4 \cdot 10^{-4}$ | $7,7 \cdot 10^{-5}$ | $5,1 \cdot 10^{-3}$ |
| | Significativo | SI | SI | SI | SI | SI | SI |
| 4,0/5,5 | Valor P | $1,4 \cdot 10^{-1}$ | $1,8 \cdot 10^{-1}$ | $1,8 \cdot 10^{-1}$ | $4,2 \cdot 10^{-8}$ | $8,8 \cdot 10^{-3}$ | $4,9 \cdot 10^{-1}$ |
| | Significativo | NO | NO | NO | SI | SI | NO |
| 4,8/5,5 | Valor P | $7,0 \cdot 10^{-5}$ | $9,3 \cdot 10^{-3}$ | $2,3 \cdot 10^{-3}$ | $6,5 \cdot 10^{-3}$ | $6,2 \cdot 10^{-4}$ | $1,6 \cdot 10^{-2}$ |
| | Significativo | SI | SI | SI | SI | SI | SI |

Posteriormente, tras un análisis t-student, se estableció que las máximas relaciones másicas para el pH inicial 4,8 y para el pH inicial 5,5 difieren significativamente con relación a sus pares. Luego, y nuevamente, la máxima relación másica a pH inicial 4,0 no difirió significativamente de la relación másica a pH inicial 5,5.

Al observar las Figuras 23-25, se advirtió que el principal efecto de la variación del pH inicial a una temperatura dada fue que la relación máxima alcanzó su máximo valor cuando el pH inicial fue 4,8, seguido siempre por la máxima relación másica a pH inicial 5,5. Adicionalmente, al aumentar el pH inicial a una temperatura dada, se logró el estado estacionario de manera más temprana.

Finalmente, se concluye que la condición de pH inicial que maximizó la relación másica fue la de pH inicial 4,8. Lo anterior coincide con lo descrito por Ghose (1987), quién establece que la condición de pH que optimiza la producción de celulasas por parte de *Trichoderma reesei* es la de pH igual a 4,8. Además, el valor de 4,8 para pH inicial se acerca al establecido por Li et al. (2013), el cual fue de 5,0. Sin embargo, y a diferencia de la literatura, en esta investigación el pH varió a lo largo de toda la fase de cultivo, estabilizándose en la mayoría de los casos en torno al valor 5,5. Esto último se acerca a lo establecido por Wen et al.(2005), quienes establecen que el pH óptimo para la producción de celulasas es 5,7, y sugiere la necesidad de realizar nuevos experimentos que mantengan el pH inicial constante a lo largo de la fase de cultivo para así tener una correlación concreta del efecto del pH en la producción de proteínas..

3.4.2. EFECTOS DE LA VARIACIÓN DE TEMPERATURA SOBRE LA RELACIÓN MÁSCA

Los valores máximos de relación másica presente en los gráficos de las Figuras 26-28, son los mismos observados en la sección anterior. Por lo tanto, en esta sección se ahondará en los efectos cualitativos de los cambios de temperatura a un pH inicial dado sobre la relación másica.

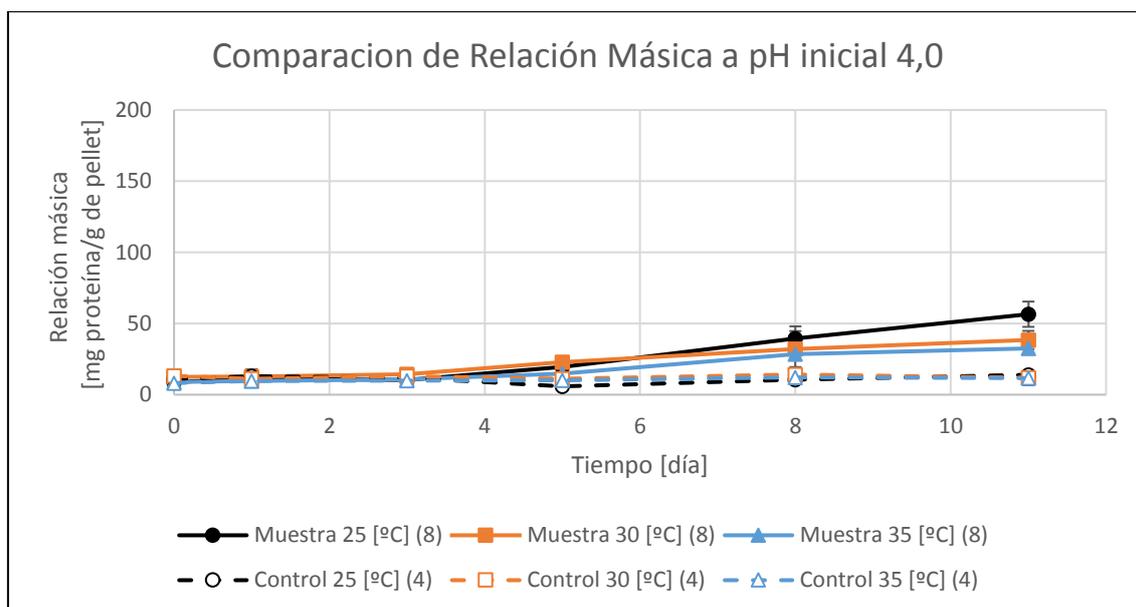


Figura 26: Gráfico comparativo de la relación másica en función del tiempo, entre los cultivos con pH 4,0 a diferentes temperaturas. Número de muestras para cada cultivo definido entre paréntesis en la leyenda.

Partiendo con la comparación a pH inicial igual 4,0 (Ver Figura 26), se observó que a medida que aumentaba la temperatura de 25 [°C] a 35 [°C], la relación másica disminuye en magnitud. Además, las muestras para este pH no mostraron llegar al estado estacionario.

Tabla 24: Análisis estadístico t-student para evaluar diferencias significativas entre las relaciones másicas de las muestras inoculadas a diferentes temperaturas según día. Caso a pH inicial 4,0. Si valor P es menor a 0,05, entonces la diferencia es significativa.

| Comparación de T° a pH inicial 4,0 | | Día | | | | | |
|------------------------------------|---------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | | 0 | 1 | 3 | 5 | 8 | 11 |
| 25/30 [°C] | Valor P | $2,1 \cdot 10^{-5}$ | $2,4 \cdot 10^{-1}$ | $1,1 \cdot 10^{-4}$ | $1,5 \cdot 10^{-1}$ | $1,8 \cdot 10^{-1}$ | $3,6 \cdot 10^{-4}$ |
| | Significativo | SI | NO | SI | NO | NO | SI |
| 25/35 [°C] | Valor P | $8,9 \cdot 10^{-1}$ | $2,7 \cdot 10^{-1}$ | $7,3 \cdot 10^{-1}$ | $3,6 \cdot 10^{-2}$ | $4,8 \cdot 10^{-3}$ | $7,0 \cdot 10^{-6}$ |
| | Significativo | NO | NO | NO | SI | SI | SI |
| 30/35 [°C] | Valor P | $1,0 \cdot 10^{-2}$ | $1,3 \cdot 10^{-2}$ | $2,8 \cdot 10^{-4}$ | $1,2 \cdot 10^{-3}$ | $4,6 \cdot 10^{-1}$ | $4,4 \cdot 10^{-2}$ |
| | Significativo | SI | SI | SI | SI | NO | SI |

Mediante el análisis estadístico t-student, se determinó que las máximas relaciones másicas presentan valores significativamente diferentes entre sí, a pesar de que dicha diferencia es menor a la que a pH iniciales superiores.

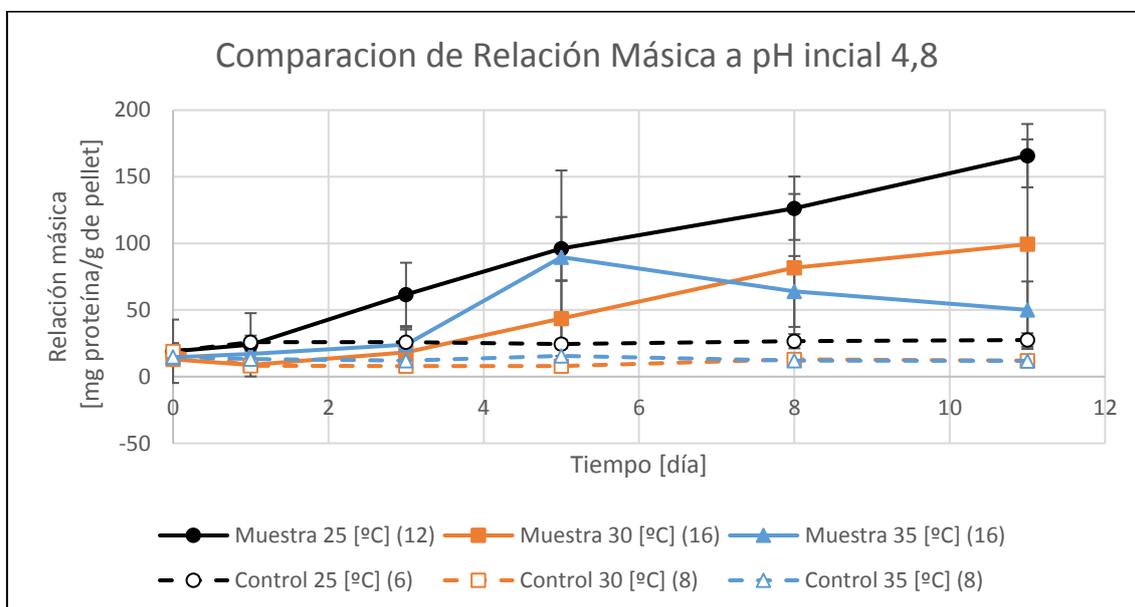


Figura 27: Gráfico comparativo de la relación másica en función del tiempo, entre los cultivos con pH 4,8 a diferentes temperaturas. Número de muestras para cada cultivo definido entre paréntesis en la leyenda.

Luego, a pH inicial 4,8 (Ver Figura 27), se obtuvo que logró el máximo valor de relación másica disminuye a medida que se aumenta la temperatura.

Tabla 25: Análisis estadístico t-student para evaluar diferencias significativas entre las relaciones másicas de las muestras inoculadas a diferentes temperaturas según día. Caso a pH inicial 4,8. Si valor P es menor a 0,05, entonces la diferencia es significativa.

| Comparación de T° a pH inicial 4,8 | | Día | | | | | |
|------------------------------------|---------------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | | 0 | 1 | 3 | 5 | 8 | 11 |
| 25/30 [°C] | Valor P | $1,3 \cdot 10^{-3}$ | $1,4 \cdot 10^{-13}$ | $9,4 \cdot 10^{-9}$ | $5,6 \cdot 10^{-5}$ | $1,1 \cdot 10^{-2}$ | $4,9 \cdot 10^{-7}$ |
| | Significativo | SI | SI | SI | SI | SI | SI |
| 25/35 [°C] | Valor P | $2,4 \cdot 10^{-2}$ | $2,6 \cdot 10^{-3}$ | $2,2 \cdot 10^{-8}$ | $7,3 \cdot 10^{-1}$ | $2,9 \cdot 10^{-6}$ | $1,0 \cdot 10^{-3}$ |
| | Significativo | SI | SI | SI | NO | SI | SI |
| 30/35 [°C] | Valor P | $3,8 \cdot 10^{-1}$ | $3,0 \cdot 10^{-4}$ | $1,2 \cdot 10^{-1}$ | $1,7 \cdot 10^{-2}$ | $2,6 \cdot 10^{-1}$ | $2,7 \cdot 10^{-2}$ |
| | Significativo | NO | SI | NO | SI | NO | SI |

Respecto del tiempo en que se demoran las muestras en alcanzar el estado estacionario, hay indicios de que a medida que aumenta la temperatura, el estado estacionario se alcanza de manera más temprana, como se ve en la Figura 27, en donde para una temperatura de 35 [°C] las muestras alcanzaron el estado estacionario al día 5. En cambio, las muestras a temperatura de 30 [°C] y 25 [°C] no alcanzaron dicha fase.

Al revisar la Tabla 25, se da cuenta que la máxima relación másica alcanzada a 25 [°C] se diferencia significativamente de sus pares en el mismo día. Por el contrario, la máxima relación másica alcanzada a 35 [°C] no fue significativamente diferente a la relación másica a 25 [°C] en el día 5, debido a su alta variabilidad. Luego, por transitividad este tampoco será significativamente diferente a la máxima relación másica a 30 [°C], pero si en relación con la alcanzada a 25 [°C]. Así, la correlación “relación másica-temperatura” vista en la Figura 27 debe ser verificada realizando nuevas tandas de experimentos que disminuyan las desviaciones estándar obtenidas.

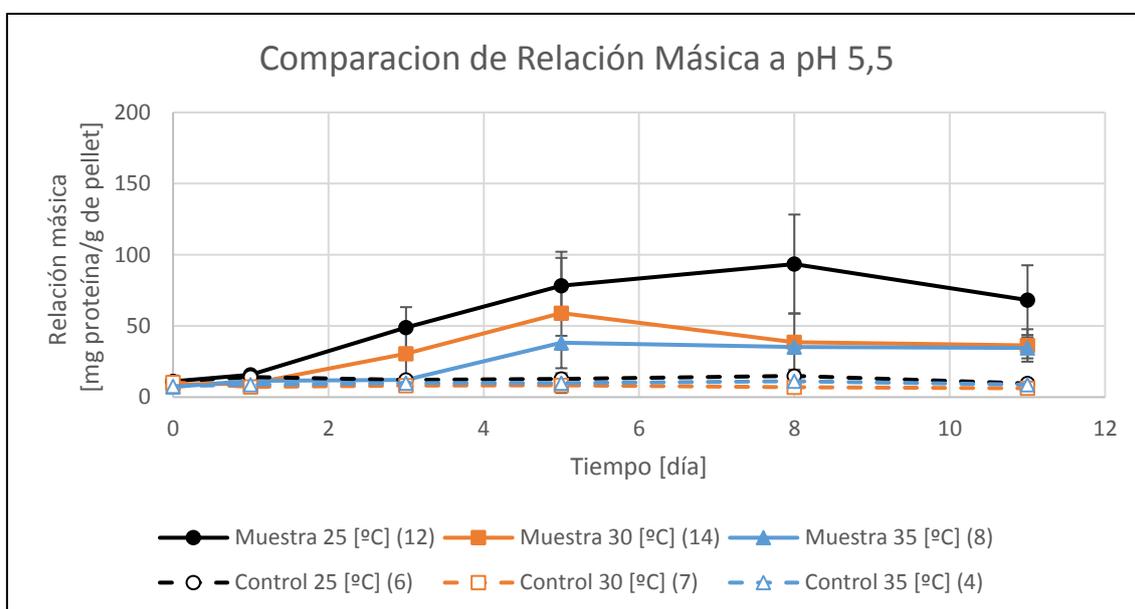


Figura 28: Gráfico comparativo de la relación másica en función del tiempo, entre los cultivos con pH 5,5 a diferentes temperaturas. Número de muestras para cada cultivo definido entre paréntesis en la leyenda.

Luego, al comparar las relaciones másicas a pH inicial 5,5 (Ver Figura 28), se obtuvo nuevamente que a medida que aumenta la temperatura disminuye el máximo valor promedio de la relación másica. Sin embargo, y al igual que en caso anterior (Ver Tabla 26), los máximos valores de relación másica alcanzados a 30 [°C] y 35 [°C] no presentan diferencias significativas, lo cual nuevamente sugiere la necesidad de realizar nuevos experimentos que ayuden a disminuir las desviaciones estándar y la variabilidad de los datos.

Tabla 26: Análisis estadístico t-student para evaluar diferencias significativas entre las relaciones másicas de las muestras inoculadas a diferentes temperaturas según día. Caso a pH inicial 5,5. Si valor P es menor a 0,05, entonces la diferencia es significativa.

| Comparación de T° a pH inicial 5,5 | | Día | | | | | |
|---------------------------------------|---------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | | 0 | 1 | 3 | 5 | 8 | 11 |
| 25/30 [°C] | Valor P | $3,5 \cdot 10^{-2}$ | $3,1 \cdot 10^{-4}$ | $8,0 \cdot 10^{-3}$ | $1,5 \cdot 10^{-1}$ | $4,2 \cdot 10^{-5}$ | $8,9 \cdot 10^{-4}$ |
| | Significativo | SI | SI | SI | NO | SI | SI |
| 25/35 [°C] | Valor P | $7,1 \cdot 10^{-8}$ | $4,4 \cdot 10^{-4}$ | $1,7 \cdot 10^{-6}$ | $9,5 \cdot 10^{-5}$ | $1,1 \cdot 10^{-4}$ | $5,7 \cdot 10^{-4}$ |
| | Significativo | SI | SI | SI | SI | SI | SI |
| 30/35 [°C] | Valor P | $7,0 \cdot 10^{-2}$ | $1,9 \cdot 10^{-1}$ | $2,1 \cdot 10^{-3}$ | $6,8 \cdot 10^{-2}$ | $5,7 \cdot 10^{-1}$ | $7,2 \cdot 10^{-1}$ |
| | Significativo | NO | NO | SI | NO | NO | NO |

Por otra parte, se notó de manera más clara que, a medida que aumenta la temperatura, el estado estacionario se alcanza más temprano. Esto último se refleja en la Figura 28, en donde para las muestras a 25 [°C] se alcanza al día 8, mientras que para las muestras a 30 [°C] y 35 [°C] se alcanza al día 5.

En síntesis, sobre los resultados obtenidos en esta sección, se estableció en base a los valores promedio de relación másica que, a medida que se aumenta la temperatura a un pH inicial dado, los valores de relación másica disminuyen. Sin embargo, al fijarse en los análisis t-student, se plantea la necesidad de generar nuevos experimentos para los casos de 30 [°C] y 35 [°C] que ayuden a disminuir la variabilidad de los datos y las desviaciones estándar obtenidas, para así poder establecer con mayor seguridad el comportamiento de la relación másica en función de la temperatura.

Se debe mencionar que, tanto para las comparaciones a temperatura fija, como para las comparaciones a pH inicial dado, se obtuvo que el máximo valor de relación másica coincidió con el inicio del estado estacionario cuando este se alcanzaba.

Debido que, para todos los casos de pH inicial se obtuvo que la máxima relación másica se alcanzaba a 25 [°C], y que los valores obtenidos diferían significativamente a la de sus pares en el mismo día y del resto de máximas relaciones másicas, se puede concluir que la temperatura que favorece la producción de proteínas en *Trichoderma reesei* RUT C-30 es la de 25 [°C]. Luego, este valor coincide con el obtenido por Wen et al. (2005), quienes establecen que la temperatura óptima para la producción de celulasas es de 25,5 [°C], y con lo establecido por Duff y Murray (1996) quienes establecen que la actividad celulolítica se maximiza en el rango 22-25 [°C] [39][40].

Finalmente se destaca que, para obtener una relación más precisa de los efectos de la temperatura y pH con la producción de proteína, se debe multiplicar las relaciones másicas obtenidas por la masa residual de los matraces de cultivo.

3.5. ASPECTOS METODOLÓGICOS PARA CONSIDERAR EN EL TRABAJO EXPERIMENTAL

A lo largo de la fase experimental se registraron sucesos asociados tanto a la heterogeneidad de las muestras, como a las metodologías utilizadas. A modo de ejemplo, la preparación de los medios de cultivo se realizó en matraces de 1 [L], para luego trasvasijar 50 [mL] del contenido en matraces de 125 [mL], dado que el alga no es soluble en agua y se encuentra en suspensión, existió un factor de error (no cuantificado) en donde algunos matraces pudieron presentar concentraciones superiores a 25 [g/L]. Este error pudo haber sido reducido, incluso eliminado, si se hubiese introducido en cada matraz de 125 [mL] la cantidad de *Ulva rigida* correspondiente a 25 [g/L].

Por otra parte, se vio que la heterogeneidad de los cultivos provoca que la toma de alícuotas no sea totalmente representativa, por lo que se tomó la medida de usar una minipimer para reducir dicho error. Sin embargo, dicha mejora se ve reducida cuando las alícuotas que representan una misma condición de cultivo y día provienen de matraces distintos. Esto último se ve reflejado en la variabilidad de los valores de masa de pellet para un día y condición determinada presentados en las Figura 19, lo mismo se aplica para las mediciones de concentración de proteína.

Siguiendo la línea de aspectos metodológicos a considerar, el hecho de medir la masa de pellet mediante peso húmedo también generó variabilidad en los valores registrados, en especial en las masas de pellet que provenían de alícuotas extraídas de cultivos de control y de cultivos inoculados tempranos (entre 0 y 3 días), ya que estos eran los que presentaban mayor cantidad de material suspendido, por lo que la retención de agua es mayor. Se establece que si las mediciones de biomasa se hubiesen realizado mediante peso seco no hubiese habido una alta variabilidad de los datos, se hubiese encontrado una relación masa residual/condición de cultivo, y se hubiese reducido la variabilidad de los valores de relación másica.

Se plantea como error metodológico, el no haber medido la masa residual de los cultivos en matraz, dado que con este parámetro se podría haber determinado a partir de la relación másica, la cantidad de proteínas intracelulares.

Por último, también existieron errores de manipulación, que están relacionados con la extracción de sobrenadante de las muestras lavadas y pre-lavadas, dado que para los cultivos inoculados tempranos (días 1 y 3) y de control, el material suspendido tras la centrifugación era propenso a resuspensión tras leves agitaciones, por lo que un reducido porcentaje (no cuantificado) de la masa decantada se extraía junto al sobrenadante. Para el caso de las muestras inoculadas entre los días 5 y 11, no se extraía masa proveniente del pellet junto al sobrenadante, puesto que la masa decantada se mantenía fija pese a sufrir agitaciones. Este punto también explica por qué la variabilidad de las masas de pellet era menor tras el día 5 para las muestras inoculadas en comparación a las muestras de control y muestras inoculadas anteriores al día 5.

4. CONCLUSIONES

A modo de síntesis de las secciones anteriores, se vio que la concentración de proteínas alcanzó su máximo valor cuando la condición de cultivo fue de 25 [°C] y pH inicial igual a 4,8. Por otra parte, la mayor diferencia entre control negativo y muestra inoculada, además de la mayor productividad, se presentó cuando las condiciones de cultivo fueron de 30 [°C] y pH inicial igual a 4,0. Sin embargo, debido a la variabilidad de los datos de concentración de proteína para una misma condición de cultivo y día, y de que se evidenció que las masas de pellet resultantes de las lisis celulares eran desiguales para las alícuotas analizadas, se procedió a normalizar las concentraciones de proteína por las masas de pellet de la centrifugación post lisis celular.

A partir de la normalización de la concentración de proteína con la masa de pellet presente en las alícuotas analizadas, parámetro que se denominó relación másica, se logró establecer que a medida que disminuía la temperatura y el pH inicial fuese 4,8, se lograba maximizar la relación másica. Así, se logró establecer que la condición de cultivo que favorece la producción de proteínas es la condición de cultivo de temperatura de 25 [°C] y pH inicial igual a 4,8. Luego, para establecer la cantidad total de proteínas producidas se debe multiplicar la relación másica por la cantidad de biomasa y masa de alga de residual, en peso seco.

Referente a los efectos de la temperatura sobre las concentraciones de proteína, al aumentar la temperatura ocurre que aumenta tanto el tiempo requerido para lograr el primer incremento de concentración, como para alcanzar la máxima concentración. En cuanto a los efectos en la relación másica, se tiene que, al aumentar la temperatura, tanto el tiempo para llegar a estado estacionario, como la magnitud de este, disminuyen. Sin embargo, se requiere de la generación de nuevos experimentos que reduzcan la variabilidad de los datos y confirmen el fenómeno anteriormente descrito mediante análisis estadísticos.

En el caso de los efectos del pH inicial sobre los cultivos, se tuvo al aumentar el pH inicial, el tiempo requerido para mantener constante la concentración de pellet disminuye. Se adiciona que, al aumentar el pH inicial, el tiempo para llegar a estado estacionario de las relaciones másicas disminuye.

En cuanto a la cantidad de proteínas intracelulares que produce *Trichoderma reesei* RUT-C30 utilizando *Ulva rigida* como fuente de carbono, ésta no pudo ser cuantificada con exactitud, puesto que las concentraciones de proteína obtenidas dependían de la cantidad de la biomasa fúngica y de la masa de sustrato retenidas en el pellet, la cual no era igual para todas las muestras de una misma condición y día. Es por ello, que mediante un análisis cualitativo de las relaciones másicas, sólo se puede establecer que *Trichoderma reesei* RUT-C30 aumenta y/o mantiene los niveles de proteína intracelular ya presentes en el alga a través del tiempo.

Por otro lado, a pesar de que los resultados de relación másica indiquen que 25 [°C] es la temperatura que maximiza la relación, hace falta corroborar si una temperatura menor logra mejorar dicho parámetro. Además, en vista de las variaciones de pH presentadas en las Figuras 20-22, en donde para todos los

casos el pH varió en torno a 5,5 al día 11 post inoculación, se cree prudente la necesidad de generar experimentos que mantengan las condiciones de pH constantes a través del tiempo utilizando amortiguadores, para así tener una correlación de “relación másica - pH del medio” concreta.

La variabilidad de los datos, y la significancia estadística de estos, están directamente relacionados con la inestabilidad de las suspensiones en el medio de cultivo utilizado. Para reducir errores en las mediciones y reducir la variabilidad de los datos, se recomienda trabajar con la masa de sustrato y con el volumen de cultivo exactos para cada matraz. Además, para reducir errores de medición, se aconseja medir en peso seco las masas residuales tanto de los matraces, como de las alícuotas utilizadas.

Finalmente, se concluye que se logró sentar las bases que permiten determinar las condiciones de temperatura y pH que favorecen la producción de proteínas en *Trichoderma reesei* RUT C-30, haciendo mejoras tanto en la preparación, como en el tratamiento de los cultivos. Por último, se deja como propuesto, la elaboración de experimentos que ayuden a determinar la tasa de crecimiento del hongo bajo las condiciones de cultivo estudiadas junto con sus rendimientos (biomasa/sustrato, producto/sustrato y producto/biomasa), con la finalidad de escalar la producción de proteínas a volúmenes industriales.

5. RECOMENDACIONES

En base a lo mencionado en la sección 3.5, para evitar que los matraces de cultivo contengan concentraciones de alga iniciales diferentes, se recomienda verter el contenido de 1,25 [g] (equivalente a los gramos de alga necesarios para mantener una concentración de 25 [g/L] en cultivos de 50 [mL]) de manera individual, y no preparar el contenido algal total en un matraz que trasvasije su contenido.

Dado que *Trichoderma reesei* RUT-C30 también produce proteínas extracelulares, se debe medir la concentración del sobrenadante generado tras la centrifugación pre-lavado, con la finalidad de tener los datos necesarios para realizar el balance de masa del alga, y poder medir los efectos de las condiciones de cultivo sobre la producción de proteínas extracelulares, comparando estos efectos con los mencionados en literatura. Cabe destacar que tanto los balances de masa, como las concentraciones de proteína medidas, serán representativas siempre y cuando se asegure de inicio que los matraces utilizados presenten el mismo volumen de cultivo y la misma concentración inicial de *Ulva rigida*.

Para ver la factibilidad comercial de las proteínas intracelulares de *Trichoderma reesei* RUT-C30 como suplemento alimenticio, se deben realizar estudios del perfil aminoacídico de las proteínas producidas y un análisis de mercado que extrapole los datos de producción obtenidos. Se deja de lado el estudio de la producción de micotoxinas, dado que se ha registrado que las cepas de *Trichoderma reesei* no producen micotoxinas [41].

Se propone estudiar una tercera variable, como pueden ser la concentración inicial de *Ulva rigida*, la agitación del medio y/o la intensidad lumínica que incide en las muestras. Lo anterior para poder generar un modelo de optimización mediante superficie de respuesta de Box Behken.

Por último, para poder entregar un valor confiable sobre la cantidad de proteínas que se produjeron a partir de un cultivo, se deben reducir los errores asociados a: 1) la concentración inicial del alga, 2) la homogeneidad de los medios de cultivo, y 3) siempre trabajar con alga de la misma procedencia.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] A. W. Speedy, “Overview of world feed protein needs and supply”, *Protein Sources Anim. Feed Ind.*, vol. 2020, n° April 2000, pp. 9–27, 2002.
- [2] Naciones Unidas, “Una población en crecimiento”, 2015. [En línea]. Disponible en: <https://www.un.org/es/sections/issues-depth/population/index.html>. [Accedido: 09-ene-2019].
- [3] E. Summary, “FAO’s Director-general on how to feed the world in 2050”, *Popul. Dev. Rev.*, vol. 35, n° 4, pp. 837–839, 2009.
- [4] SalmonChile, “Producción”, 2016. [En línea]. Disponible en: <http://www.salmonchile.cl/es/produccion.php>. [Accedido: 09-ene-2019].
- [5] British Nutrition Foundation, “Protein”, *Protein*, 2012. [En línea]. Disponible en: <https://www.nutrition.org.uk/nutritionscience/nutrients-food-and-ingredients/protein.html?start=4>. [Accedido: 09-ene-2019].
- [6] EL AGRO, “Salmón chileno, proteína del futuro”, 2018. [En línea]. Disponible en: <http://elagro.radioagricultura.cl/2018/08/01/salmon-chileno-la-proteina-del-futuro/>. [Accedido: 09-ene-2019].
- [7] Prochile, “Anuario de las exportaciones chilenas 2018”, pp. 1–57, 2018.
- [8] A. Bakke-McKellep y S. Refstie, “Alternative Protein Sources and Digestive Function Alterations in Teleost Fishes”, en *Feeding and Digestive Functions of Fishes*, 1ª ed., J. Cyrino, D. Bureau, y B. Kapoor, Eds. Boca Ratón: CRC Press, 2008, pp. 445–478.
- [9] OCDE-FAO, “PESCADOS Y MARISCOS: Situación del mercado y Aspectos relevantes de la proyección”, 2017.
- [10] G. and Baeverfjord y A. Krogdahl, “Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., distal intestine: a comparison with the intestines of fasted fish.”, *Pol. Przegl. Chir.*, vol. 43, n° 7, pp. 1139–1143, 1971.
- [11] OCDE-FAO, “Concentrados de proteína de soja (SPC)”, pp. 1–9, 2010.
- [12] S. Lall y S. Anderson, “Amino acid nutrition of salmonids: Dietary requirements and bioavailability Amino acid nutrition of salmonids: Dietary requirements and bioavailability”, *Zaragoza : CIHEAM*, vol. 63, n° 63, pp. 73–90, 2005.
- [13] H. House, O. Parade, M. Lane, y B. Potters, “Available amino acid content of fish meals”, *Int. Assoc. fish meal Manuf.*, n° I, p. 2, 1970.
- [14] G. E. Berge, E. Lied, H. Sveier, y H. Norda, “Dietary inclusion of crystalline D - and L -methionine : effects on growth , feed and protein utilization , and digestibility in small and large Atlantic salmon (*Salmon salar* L .)”, *Aquac. Nutr.*, vol. 7, pp. 169–181, 2001.
- [15] S. Nordrum, “Effects of methionine , cysteine and medium chain triglycerides on nutrient digestibility , absorption of amino acids along the

- intestinal tract and nutrient retention in Atlantic salmon *Salmo salar* L. / under pair-feeding regime”, *Elsevier-Aquaculture*, vol. 186, pp. 341–360, 2000.
- [16] M. Espe, R. Mansingh, B. Liaset, A. El-Mowafi, y Z.-Y. Du, “Methionine limitation results in increased hepatic FAS activity, higher liver 18 : 1 to 18 : 0 fatty acid ratio and hepatic TAG accumulation in Atlantic salmon, *Salmo salar*”, *Springer-Amino Acids*, vol. 30, n° 2, pp. 449–460, 2010.
- [17] G. Eikeland, M. Goodman, M. Espe, y E. Lied, “Intestinal absorption of amino acids in fish: kinetics and interaction of the in vitro uptake of L - methionine in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)”, *Elsevier-Aquaculture*, vol. 229, pp. 265–273, 2004.
- [18] T. Willke, “Methionine production—a critical review”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 98, n° 24, pp. 9893–9914, 2014.
- [19] V. Smetacek y A. Zingone, “Green and golden seaweed tides on the rise”, *Nature*, vol. 504, n° 7478, pp. 84–88, 2013.
- [20] M. Ohno, C. Werlinger, S. Shimada, y M. Hiraoka, “A green tide problem caused by *Enteromorpha* sp. in Dichato, Chile.”, en *Actas del 17º Simposio Internacional de Algas, Ciudad del Cabo, Sudáfrica, 28 de enero-2 de febrero de 2001*, 2003, vol. 1, pp. 243–248.
- [21] O. Fernandez y A. Neira, “Proliferación de alga se toma playas de Algarrobo y afecta a vecinos y turistas”, *La Tercera*, 2010. [En línea]. Disponible en: <https://www.latercera.com/noticia/proliferacion-de-alga-se-toma-playas-de-algarrobo-y-afecta-a-vecinos-y-turistas/>. [Accedido: 09-ene-2019].
- [22] Seco S.A., “Nosotros”, 2019. [En línea]. Disponible en: <http://www.secosa.cl/nosotros/>. [Accedido: 09-ene-2019].
- [23] Instituto de Fomento Pesquero - SUBPESCA, “Evaluación y propuesta de modificación de normativa ambiental vigente para los centros de cultivo de algas”, 2013.
- [24] V. Dellarossa, “Bio-remediación de ambientes marinos intervenidos por la actividad acuícola a través de cultivos integrados de macroalgas y crustáceos en la X región.”, *Inf. Final*, p. 262, 2010.
- [25] Departamento de análisis sectorial - Subsecretaría de pesca y acuicultura, “Informe sectorial de pesca y acuicultura”, 2018.
- [26] M. García-Garibay, L. Gómez Ruiz, y E. Cruz-Guerrero, “Single cell-protein”, *Encycl. Food Sci. Nutr.*, vol. 1, n° 2, pp. 5277–5284, 2003.
- [27] N. Felix y R. A. Brindo, “Evaluation of raw and fermented seaweed, *Ulva lactuca* as feed ingredient in giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*”, *Int. J. Fish. Aquat. Stud.*, vol. 1, n° 3, pp. 199–204, 2014.
- [28] M. Uchida, K. Nakata, y M. Maeda, “Conversion of *Ulva* fronds to a hatchery diet for *Artemia nauplii* utilizing the degrading and attaching abilities of *Pseudoalteromonas espejiana*”, *J. Appl. Phycol.*, vol. 9, pp. 541–549, 1997.

- [29] Germoplama, “Algas Verdes - Lechuga de Mar”, 2015. [En línea]. Disponible en: http://www.macroalgasdelsur.cl/germoplasma/lechuga_mar.html.
- [30] F. E. Msuya y A. Neori, “Effect of water aeration and nutrient load level on biomass yield , N uptake and protein content of the seaweed *Ulva lactuca* cultured in seawater tanks”, pp. 1021–1031, 2008.
- [31] R. Pezoa-Conte, “Fractionation of marine algae to its constituents towards valuable chemicals and energy products .”, Universidad Åbo Akademi, 2017.
- [32] Centro de estudios en ciencia y tecnología de los alimentos - Usach, “Informe de analisis n°40/2019”, 2019.
- [33] R. Peterson y H. Nevalainen, “Trichoderma reesei RUT-C30 – thirty years of strain improvement”, *Microbiol. Soc.*, vol. 158, pp. 58–68, 2012.
- [34] M. Mandels y D. Ryu, “Cellulases : biosynthesis and applications”, *Elsevier-Enzyme Microb. Technol.*, vol. 2, pp. 91–102, 1980.
- [35] T. M. Pakula, M. Laxell, A. Huuskonen, J. Uusitalo, M. Saloheimo, y M. Penttilä, “The effects of drugs inhibiting protein secretion in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. Evidence for down-regulation of genes that encode secreted proteins in the stressed cells”, *J. Biol. Chem.*, vol. 278, n° 45, pp. 45011–45020, 2003.
- [36] A. Singh *et al.*, “Heterologous protein expression in *Hypocrea jecorina*: A historical perspective and new developments”, *Biotechnol. Adv.*, vol. 33, n° 1, pp. 142–154, 2015.
- [37] J. Domingues, J. Queiroz, J. Cabral, y L. Fonseca, “The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30”, *Elsevier-Enzyme Microb. Technol.*, vol. 26, pp. 394–401, 2016.
- [38] C. Li, Z. Yang, R. He, D. Zhang, S. Chen, y L. Ma, “Effect of pH on cellulase production and morphology of *Trichoderma reesei* and the application in cellulosic material hydrolysis”, *J. Biotechnol.*, pp. 1–8, 2013.
- [39] Z. Wen, W. Liao, y S. Chen, “Production of cellulase by *Trichoderma reesei* from dairy manure”, *Elsevier-Bioresource Technol.*, vol. 96, pp. 491–499, 2005.
- [40] S. J. B. Duff, D. G. Cooper, y O. M. Fuller, “Effect of media composition and growth conditions on production of cellulase and B-glucosidase by a mixed fungal fermentation.”, *Elsevier-Enzyme Microb. Technol.*, vol. 9, pp. 47–52, 1987.
- [41] M. Paloheimo, T. Haarmann, S. M. Mäkinen, y J. Vehmaanperä, “Production of Industrial Enzymes in *Trichoderma reesei*”, *Springer Int.*, pp. 23–57, 2016.
- [42] S. L. Woo *et al.*, “*Trichoderma* -based Products and their Widespread Use in Agriculture”, *Open Micol. J.*, vol. 8, pp. 71–126, 2014.

- [43] H. A. A. Omer, F. A. F. Ali, y S. M. Gad, "Replacement of Clover Hay by Biologically Treated Corn Stalks in Growing Sheep Rations", *J. Agritultural Sci.*, vol. 4, n° 2, pp. 257–268, 2012.
- [44] K. M. Ghanem, "Single Cell Protein Production From Beet Pulp By Mixed Culture", *Qatar Univ. Sci. J.*, vol. 12, pp. 85–88, 1992.
- [45] E. Mustalahti, M. Saloheimo, y J. J. Joensuu, "Intracellular protein production in *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) with hydrophobin fusion technology", *N. Biotechnol.*, vol. 30, n° 2, pp. 262–268, 2013.
- [46] M. Torrent *et al.*, "Eukaryotic protein production in designed storage organelles", *BMC Biol.*, vol. 7, pp. 1–14, 2009.
- [47] W. Smith, J. Jäntti, M. Oja, y M. Saloheimo, "Comparison of intracellular and secretion-based strategies for production of human α -galactosidase A in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*", *BMC Biotechnol.*, vol. 14, n° 1, pp. 1–12, 2014.
- [48] M. Schmoll, E. U. Esquivel-Naranjo, y A. Herrera-Estrella, "Trichoderma in the light of day – Physiology and development", *Fungal Genet. Biol.*, vol. 47, n° 11, pp. 909–916, 2010.
- [49] M. M. Bradford, "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding", *Anal. Biochem.*, vol. 72, pp. 248–254, 1976.
- [50] P. M. Campbell y T. J. V Higgins, "Transgenic peas expressing an α -amylase inhibitor gene from beans show altered expression and modification of endogenous proteins", *Electrophoresis*, vol. 30, pp. 1863–1868, 2009.

7. ANEXOS

7.1. ANEXO A: RESULTADOS PRELIMINARES DE LA PRIMERA FASE

En la primera fase de la etapa 5 del proyecto, en donde se realizó la determinación de las condiciones favorables para la producción de proteínas unicelulares de *Trichoderma reesei* RUT-C30 en tubos Falcon, se obtuvo que el hongo crecía generando una aglomeración esférica de radio igual al radio interno del tubo.

Tabla 27: Condiciones de cultivo para determinación de concentración inicial óptima de *Ulva rigida*.

| Corrida | Conc. Alga [g/L] | Conc. YNB [g/L] | pH | Temperatura [°C] |
|---------|------------------|-----------------|-----|------------------|
| 1 | 15 | 3,35 | 5,7 | 30 |
| 2 | 25 | | | |
| 3 | 35 | | | |

Para el estudio del crecimiento y producción de proteínas, se debió establecer una concentración inicial de *Ulva rigida* óptima. Para ello, se realizaron experimentos bajo las condiciones descritas en la Tabla 27, haciendo que las muestras experimentales fermentaran durante 14 días. Las proteínas producidas en este tramo de tiempo fueron cuantificadas mediante el método de Kjeldahl. Se destaca que la proteína medida corresponde tanto a proteína extracelular, como proteína intracelular. Luego, los resultados experimentales se presentan en el gráfico de la Figura 29.

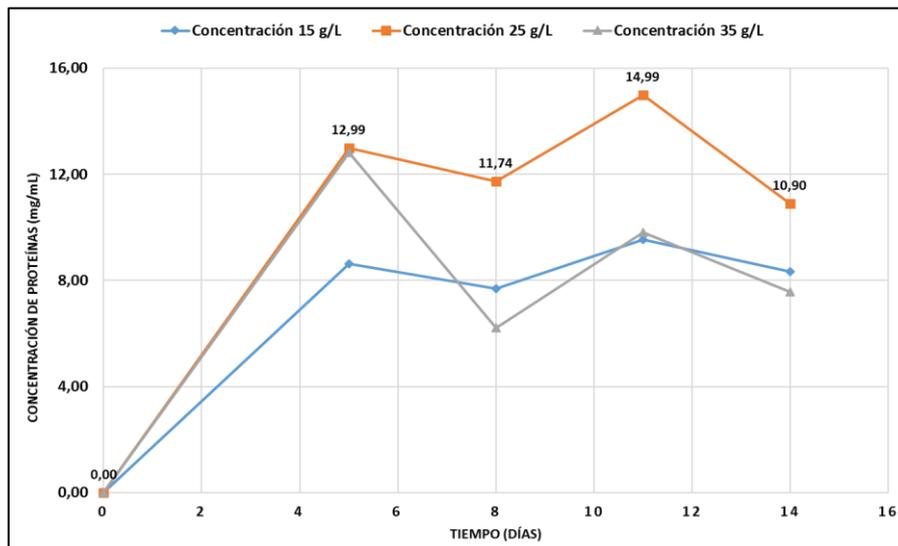


Figura 29: Gráfico de concentración de proteína soluble en función de la concentración de *Ulva rigida* inicial y del tiempo. Producción mediante *Trichoderma reesei* RUT-C30.

A partir de los resultados expuestos en la Figura 29, se puede concluir que la producción de proteína soluble se maximiza cuando la concentración inicial de *Ulva rigida* gira en torno a los 25 [g/L].

7.2. ANEXO B: EJEMPLO DE CÁLCULO - CURVA DE CALIBRACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

A continuación, en la Tabla 28 se presentan los valores de absorbancia obtenidos para las muestras de BSA utilizadas para generar la curva de calibración.

Tabla 28: Absorbancias medidas a 595 [nm] para diferentes concentraciones de BSA. Caso 30 [°C] – pH 4,0 – Día 0 – Parte 1.

| BSA [mg/mL] | Absorbancia | Absorbancia - blanco |
|-------------|-------------|----------------------|
| 0,00 | 0,35 | 0,00 |
| 1,00 | 0,44 | 0,08 |
| 2,00 | 0,62 | 0,26 |
| 3,00 | 0,70 | 0,35 |
| 4,00 | 0,78 | 0,43 |
| 5,00 | 0,86 | 0,51 |
| 6,00 | 0,92 | 0,56 |
| 7,00 | 1,02 | 0,67 |

Al analizar la Figura 30, se establece como valor blanco a la absorbancia que representa a la concentración de BSA igual a 0 [mg/mL], para este caso, se habla de la absorbancia de 0,35. Luego, dicho valor es restado en todas las absorbancias medidas (representado bajo el nombre de absorbancia-blanco). Es así como, mediante los valores de concentración de BSA y de absorbancia-blanco, se procede a graficar la curva de calibración BSA versus absorbancia (Ver Figura 30).

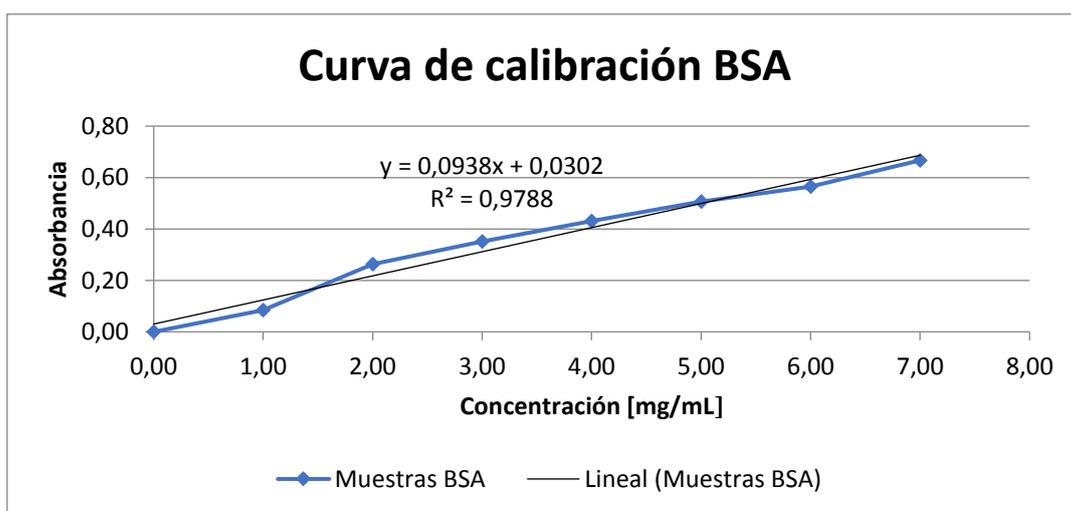


Figura 30: Curva de calibración de absorbancia en función de Albúmina de Suero Bovino (BSA). Caso 30 [°C] - pH 4,0 - Día 1 - Parte 1.

Consecutivamente, a partir de la ecuación de la línea de tendencia (curva de calibración), se puede obtener la concentración de proteína (valor x) mediante el valor de la absorbancia medida (valor y).

A modo de ejemplo, las mediciones de absorbancia registradas para las muestras inoculadas y de control en las condiciones de 30 [°C] y pH inicial 4,0 se presentan la Tabla 29. Así, al tomar la ecuación de la recta presente en la Figura 30 y el primer valor de absorbancia-blanco, se procede a calcular la concentración la primera alícuota del matraz n^o1:

$$\text{Concentración} \left[\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right] = \frac{\text{Absorbancia} - 0,0302}{0,0938 \left[\frac{\text{mL}}{\text{mg}} \right]} = \frac{0,5 - 0,0302}{0,0938} \left[\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right] = 4,97 \left[\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right]$$

Tabla 29: Absorbancias medidas a 595 [nm] para las muestras analíticas de los matraces inoculados y control, junto con las concentraciones de proteína que representan.
Caso 30 [°C] – pH 4,0 – Día 0 – Parte 1.

| Matraz | Muestra (alícuota) | Absorbancia | Absorbancia - blanco | Concentración [mg/mL] |
|--------|--------------------|-------------|----------------------|-----------------------|
| 1 | 1 | 0,85 | 0,50 | 4,97 |
| | 2 | 0,89 | 0,53 | 5,36 |
| 2 | 3 | 0,73 | 0,38 | 3,68 |
| | 4 | 0,80 | 0,45 | 4,44 |
| C- | 1 | 0,91 | 0,55 | 5,54 |
| | 2 | 0,88 | 0,52 | 5,24 |

Finalmente, se debe procede de la misma manera para cada una de las absorbancias medidas.

7.3. ANEXO C: EJEMPLO DE ANÁLISIS - MEDICIONES DE PARÁMETROS

Las mediciones de los parámetros de pH y masa de pellet se presentan a continuación en las Tablas 30 y 31. Se destaca que los valores promedio y de desviación estándar de estas tablas se utilizan en las secciones de resultados.

Tabla 30: Mediciones de masa de pellet para la condición de cultivo de 30 [°C] y pH inicial 4,0.

| Día | Masa de Pellet [g] | | | | | | | | Prom | Desv. Est. |
|-----|--------------------|-------|----------|-------|----------|-------|----------|-------|------|------------|
| | Matraz 1 | | Matraz 2 | | Matraz 3 | | Matraz 4 | | | |
| | Al. 1 | Al. 2 | Al. 3 | Al. 4 | Al. 5 | Al. 6 | Al. 7 | Al. 8 | | |
| 0 | 0,10 | 0,09 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,11 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,01 |
| 1 | 0,11 | 0,10 | 0,09 | 0,10 | 0,09 | 0,09 | 0,11 | 0,10 | 0,10 | 0,01 |
| 3 | 0,08 | 0,09 | 0,09 | 0,10 | 0,09 | 0,10 | 0,09 | 0,11 | 0,09 | 0,01 |
| 5 | 0,09 | 0,09 | 0,08 | 0,10 | 0,10 | 0,08 | 0,07 | 0,07 | 0,08 | 0,01 |
| 8 | 0,06 | 0,04 | 0,06 | 0,08 | 0,03 | 0,02 | 0,04 | 0,03 | 0,04 | 0,02 |
| 11 | 0,04 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,04 | 0,03 | 0,04 | 0,03 | 0,01 |

Tabla 31: Mediciones de masa de pellet para la condición de cultivo de 30 [°C] y pH inicial 4,0.

| Día | Variación de pH | | | | | |
|-----|-----------------|----------|----------|----------|------|------------|
| | Parte 1 | | Parte 2 | | Prom | Desv. Est. |
| | Matraz 1 | Matraz 2 | Matraz 3 | Matraz 4 | | |
| 0 | 0,23 | 0,26 | 0,15 | 0,25 | 0,24 | 0,04 |
| 1 | 0,27 | 0,26 | 0,30 | 0,25 | 0,27 | 0,02 |
| 3 | 0,29 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,26 | 0,02 |
| 5 | 0,23 | 0,22 | 0,23 | 0,25 | 0,24 | 0,01 |
| 8 | 0,29 | 0,27 | 0,25 | 0,21 | 0,26 | 0,03 |
| 11 | 0,26 | 0,28 | 0,27 | 0,30 | 0,27 | 0,02 |

7.4. ANEXO D: EJEMPLO DE CÁLCULO - RELACIÓN MÁSICA

Mediante la ecuación de relación másica que se presentó en la Sección 2.5, se procederá a ejemplificar el cálculo del parámetro, con los valores referentes a concentración y masa de pellet de la alícuota 1 en día 0 que fueron presentados en las Tablas 29 y 30 respectivamente. Se añade que el volumen de alícuota para esta condición de cultivo fue de 0,25 [mL]. Así:

$$Relación\ másica_{Al_1} \left[\frac{mg\ proteína}{g\ pellet} \right] = \frac{4,97 \left[\frac{mg\ proteína}{mL} \right]}{0,10 [g\ pellet]} \cdot 0,25 [mL] = 11,36 \left[\frac{mg\ proteína}{g\ pellet} \right]$$