

Biotransformación de residuos agroindustriales mediada por hongos del género *Pleurotus spp* para la obtención de un medio de cultivo balanceado para el crecimiento heterotrófico de *Chlorella vulgaris*

José Helí Marín Cerón

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI
2017**

Biotransformación de residuos agroindustriales mediada por hongos del género *Pleurotus spp* para la obtención de un medio de cultivo balanceado para el crecimiento heterotrófico de *Chlorella vulgaris*

José Helí Marín Cerón

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE PREGRADO EN
QUÍMICA FARMACÉUTICA**

TUTOR:

Nelson Hernando Caicedo Ortega, PhD

CO-TUTOR:

Andrés Felipe Dávalos Vélez, MSc

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI
2017**



APROBADO POR:

Nelson Hernando Caicedo, PhD
Director del Proyecto

Andrés Felipe Dávalos, MSc
Co-Director del Proyecto

Leonardo Herrera, PhD
Evaluador

AGRADECIMIENTOS

A Dios primeramente por el privilegio de la vida y la oportunidad que me brindó de estudiar tan maravillosa carrera.

A la fundación Gases de Occidente por su compromiso con la educación a través del programa Conexión U.

A mis padres, Consuelo Cerón y José Marín, por su amor y por estar siempre a mi lado apoyándome durante mi proceso de formación, especialmente en esos momentos cuando sentía que no podía más.

A la Facultad de Ciencias Naturales y a todos los profesores de la Universidad Icesi que de una u otra manera contribuyeron durante mi proceso de formación profesional y personal.

Al doctor y profesor Nelson Caicedo por sus consejos y sus aportes valiosos para el desarrollo del proyecto y por brindarme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación.

Al profesor Andrés Dávalos por su paciencia y sus contribuciones para el desarrollo del proyecto y por brindarme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación.

A David Tafur y a Eliana hidalgo por su ayuda y colaboración durante la ejecución del proyecto.

Finalmente, a Carlos Andrés Gómez de la empresa Levapan S.A. por su colaboración en el análisis de unas muestras de laboratorio.

Abreviaturas y Acrónimos

| | |
|---------|--|
| % v/v | Porcentaje volumen/volumen |
| % p/v | Porcentaje peso/volumen |
| DQO | Demanda Química de Oxígeno |
| DBO | Demanda Bioquímica de Oxígeno |
| FDA | Food and Drug Administration |
| ASOCAÑA | Asociación de Cultivadores de Caña de Azúcar de Colombia |
| FEPA | Fondo de Estabilización de Precios del Azúcar |
| GRAS | Generally Recognized As Safe |
| HPLC | High-Performance Liquid Chromatography |
| PDA | Potato-Dextrose-Agar |
| CIAT | Centro Internacional de Agricultura Tropical |
| COT | Carbono Orgánico Oxidable Total |
| PS | <i>Pleurotus sajor caju</i> |
| PO | <i>Pleurotus ostreatus</i> |
| ADH | Alcohol deshidrogenasa |

TABLA DE CONTENIDOS

| | |
|---|----|
| RESUMEN DEL PROYECTO | 12 |
| ABSTRACT | 13 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 14 |
| 2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO | 15 |
| 2.1. Planteamiento del problema y justificación | 15 |
| 2.2. Marco teórico y estado del arte | 16 |
| 2.2.1. Residuos agroindustriales | 16 |
| 2.2.1.1. Vinaza | 16 |
| 2.2.1.2. Cáscaras de chontaduro | 18 |
| 2.2.1.2.1. Almidón | 20 |
| 2.2.2. Agentes transformadores | 23 |
| 2.2.2.1. Hongos del género <i>Pleurotus spp</i> | 24 |
| 2.2.2.2. <i>Chlorella vulgaris</i> | 25 |
| 2.2.3. Técnicas analíticas y métodos de cuantificación y medición | 27 |
| 2.2.3.1. Azúcares por espectrofotometría | 27 |
| 2.2.3.2. Azúcares por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) | 28 |
| 2.2.3.3. Carbono orgánico total (COT) | 28 |
| 3. OBJETIVOS | 29 |
| 3.1. Objetivo general | 29 |
| 3.2. Objetivos específicos | 29 |
| 4. METODOLOGÍA | 29 |
| 4.1. Origen de las cepas | 30 |
| 4.2. Origen de los residuos agroindustriales | 30 |
| 4.3. Propagación y mantenimiento de las cepas | 30 |
| 4.4. Ensayos preliminares | 31 |
| 4.5. Preparación de los residuos agroindustriales | 31 |
| 4.5.1. Preparación de la vinaza | 31 |
| 4.5.2. Preparación de las cáscaras de chontaduro | 31 |
| 4.6. Pre-acondicionamiento y preparación del inóculo del hongo | 32 |
| 4.7. Preparación medio de cultivo hongos y condiciones de cultivo | 33 |
| 4.8. Pre-acondicionamiento y preparación del inóculo de la microalga | 34 |
| 4.9. Preparación medio de cultivo microalga y condiciones de cultivo | 34 |
| 4.10. Análisis relacionados con el cultivo de los hongos | 35 |
| 4.11. Análisis relacionados con el cultivo de la microalga | 36 |
| 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 36 |
| 5.1. Ensayos preliminares | 37 |
| 5.2. Cultivo de los hongos | 38 |
| 5.2.1. Determinación de azúcares | 38 |
| 5.2.2. Determinación del COT | 42 |
| 5.2.3. Cuantificación de la biomasa fúngica | 44 |
| 5.3. Cultivo de la microalga | 45 |
| 5.3.1. Seguimiento del crecimiento celular | 45 |
| 5.3.2. Cuantificación de la biomasa | 46 |
| 5.3.3. Determinación de COT | 47 |

5.4. Impacto y aplicación del proyecto 49

6. CONCLUSIONES..... 50

7. RECOMENDACIONES 51

8. REFERENCIAS..... 52

9. ANEXOS 57

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Distribución por departamentos de la producción de chontaduro en Colombia (Adaptado de Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2011)..... | 19 |
| Figura 2. Estructura de la amilosa conformada por enlaces glucosídicos α -1,4 (Ruiz, 2006)..... | 20 |
| Figura 3. Estructura de la amilopeptina conformada por enlaces glucosídicos α -1,4 y α -1,6 (Ruiz, 2006) | 21 |
| Figura 4. Hidrólisis enzimática del almidón según tipo de enlaces..... | 22 |
| Figura 5. Proceso general de la hidrólisis del almidón | 23 |
| Figura 6. Curva de crecimiento de microorganismos: (1) fase lag o de inducción; (2) fase exponencial; (3) fase estacionaria; y (4) fase de muerte o declive | 24 |
| Figura 7. Reacciones enzimáticas que generan el NADPH para cuantificar a 340 nm | 28 |
| Figura 8. Representación de la totalidad de unidades experimentales y diseño experimental con 6 tratamientos..... | 33 |
| Figura 9. Coloración del medio después del crecimiento de los hongos. (A) <i>P. ostreatus</i> y (B) <i>P. sajor caju</i> | 37 |
| Figura 10. Cromatograma de una de las muestras del décimo día de cultivo con un pico de glucosa | 39 |
| Figura 11. Micelio de los hongos en algunos de los medios al finalizar el cultivo. (A) PO en vinaza al 50% v/v; (B) PS en vinaza al 75% v/v; y (C) PO en vinaza al 100 % v/v | 40 |
| Figura 12. Cromatograma de una de las muestras del décimo día de cultivo con un pico de etanol | 41 |
| Figura 13. Separación del almidón y la biomasa de la microalga..... | 47 |

LISTA DE GRÁFICAS

- Gráfica 1.** Comparación COT de controles e hidrolizados de PS y PO por combustión húmeda.. 42
- Gráfica 2.** Comparación COT de controles e hidrolizados de PS y PO por combustión seca 43
- Gráfica 3.** Curvas de crecimiento de la microalga en los medios de vinaza al 50% v/v y vinaza al 75% v/v suplementados con hidrolizado de cáscaras de chontaduro 45
- Gráfica 4.** Comparación COT en los medios donde se cultivó la microalga..... 48

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Composición química de la vinaza | 17 |
| Tabla 2. Composición medio de acondicionamiento de <i>Chlorella vulgaris</i> | 34 |
| Tabla 3. Composición medios de cultivo ensayos con <i>C. vulgaris</i> | 35 |
| Tabla 4. Azúcares en los hidrolizados después del cultivo de los hongos | 41 |
| Tabla 5. Porcentaje de disminución COT en los medios después del cultivo de los hongos | 44 |
| Tabla 6. Porcentaje de disminución COT en los medios después del cultivo de la microalga | 48 |

LISTA DE ANEXOS

| | |
|--|----|
| Anexo 1. Composición de Macronutrientes y Micronutrientes..... | 57 |
| Anexo 2. Análisis de varianza para determinar la diferencia significativa entre los resultados obtenidos del porcentaje de disminución del COT..... | 57 |
| Anexo 3. Resultados obtenidos del kit enzimático para cuantificación de azúcares..... | 59 |

RESUMEN DEL PROYECTO

La vinaza de caña de azúcar es un co-producto líquido agroindustrial con un importante contenido de materia orgánica que la convierte en un potencial medio de cultivo para microorganismos capaces de utilizar estos compuestos. Sin embargo, se ha sugerido que la suplementación de la vinaza con otros residuos agroindustriales ricos en precursores de azúcares fermentables (C6) mejoraría el cultivo de microorganismos. El presente trabajo evaluó la implementación de una estrategia de aprovechamiento de la vinaza suplementada con cáscaras de chontaduro para el cultivo de la microalga *Chlorella vulgaris*.

Para ello, en una primera etapa se estudió la viabilidad de generar un hidrolizado rico en azúcares simples *in situ*, en tres medios formulados con diferente concentración de vinaza (50% v/v, 75% v/v y 100% v/v) y al 5% p/v de cáscaras de chontaduro. Esto a través de la hidrólisis enzimática del almidón (proveniente de las cáscaras) mediada a través del metabolismo de los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus sajor caju*. Dado que el hidrolizado alcanzado luego de 15 días de crecimiento de los hongos no mostró presencia de glucosa residual, se evaluó la generación del mismo mediante el cultivo de los hongos en un medio con solo 5% p/v de cáscaras de chontaduro. El hidrolizado obtenido en esta parte fue empleado en la segunda etapa experimental en donde se evaluó el efecto de la suplementación de la vinaza con dicho hidrolizado sobre el crecimiento de la microalga en dos medios conteniendo vinaza al 50% v/v y vinaza al 75% v/v.

Con respecto al cultivo de los hongos, se encontró que no hubo diferencias significativas en el porcentaje de disminución del carbono orgánico total (COT) alcanzado por el crecimiento de las dos cepas de los hongos. No obstante, se evidenció efecto significativo del porcentaje de vinaza empleada sobre el porcentaje de disminución de COT. La relación encontrada fue inversamente proporcional y sugiere que, a pesar del pretratamiento aplicado a la vinaza, pudo haber compuestos que afectan el crecimiento y aprovechamiento del carbono presente en esta por parte de estos microorganismos. Cabe resaltar que aun cuando no pudo estimarse los valores de biomasa fúngica lograda al final de los cultivos, el porcentaje de disminución de COT puede relacionarse con estos. Del mismo modo, a través de hallazgos analíticos se sugiere un posible efecto inductivo de la vinaza en el metabolismo de los hongos que originó la síntesis de etanol a partir de la glucosa derivada de la hidrólisis.

Finalmente, se concluyó que se obtiene un mejor resultado en la producción de azúcares cuando el hidrolizado de las cáscaras de chontaduro se genera a parte de la vinaza. Así mismo, se concluyó que el hidrolizado favoreció el crecimiento de la microalga en comparación con un medio no suplementado. Esta última afirmación soportada por valores de productividad de 0.74 (en el medio de vinaza al 50% v/v) y 0.54 (en el medio de vinaza al 75% v/v).

Palabras clave: *Chlorella vulgaris*, vinaza, *Pleurotus spp.*, cáscaras de chontaduro.

ABSTRACT

Sugarcane vinasse is an agroindustrial liquid by-product with an important organic matter content that makes it a potential culture medium for microorganisms capable of using these compounds. However, it has been suggested that supplementation of vinasse with other agroindustrial residues rich in precursors of fermentable sugars (C6) would improve the culture of microorganisms. The present work evaluated the implementation of a strategy for a better utilization of vinasse supplemented with chontaduro husks for the cultivation of the microalgae *Chlorella vulgaris*.

For this purpose, the feasibility of generating a hydrolysate rich in simple sugars *in situ* was studied in three media formulated with different concentrations of vinasse (50% v/v, 75% v/v and 100% v/v) and 5% w/v of chontaduro husks. The above through the enzymatic hydrolysis of the starch (coming from the husks) mediated through the metabolism of the fungi *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor caju*.

Since the hydrolysate reached after 15 days of growth of the fungi did not show residual glucose, it was evaluated the generation of a new hydrolysate by cultivating the fungi in a medium with only 5% w/v of chontaduro husks. The hydrolyzate obtained in this part was used in the second experimental stage where the effect of the supplementation of vinasse with this hydrolyzate on the growth of the microalga was evaluated in two media containing 50% v/v vinasse and 75% v/v vinasse.

With respect to fungus cultivation, it was found that there was no significant difference in the percentage of total organic carbon decrease (TOC) reached by the growth of the two fungal strains. However, it was evidenced a significant effect of the percentage of vinasse used upon the percentage of TOC. The relationship found was inversely proportional and suggests that in spite of the pretreatment applied to the vinasse, there could be compounds that affect the growth and utilization of the carbon present in it by these microorganisms.

It should be noted that even though the values of fungal biomass achieved at the end of the crop could not be estimated, the percentage of COT decrease can be related to these. Likewise, it is suggested, through analytical findings, a possible inductive effect of vinasse on the metabolism of fungi that originated the synthesis of ethanol from glucose derived from hydrolysis.

Finally, it was concluded that a better result in sugar production is obtained when the hydrolysate of the chontaduro husks is generated separately from vinasse. It was also concluded that the hydrolysate favored the growth of the microalga as compared to a not supplemented medium. This last statement is supported by productivity values of 0.74 (in 50% v/v vinasse medium) and 0.54 (in 75% v/v vinasse medium).

Keywords: *Chlorella vulgaris*, vinasse, *Pleurotus spp.*, chontaduro husks

1. INTRODUCCIÓN

Los residuos agroindustriales son considerados como el conjunto de materiales sólidos o líquidos que ya no son de utilidad para el proceso que los generó y que resultan del consumo directo de materias primas agrícolas o a partir de su transformación industrial (Saval, 2012). La vinaza es un desecho agroindustrial líquido con un elevado contenido de materia orgánica que representa un gran problema de contaminación ambiental en los lugares donde se dispone para su eliminación. Ésta es generada en los procesos de transformación de las mieles de la caña de azúcar para la obtención de etanol y levadura de panadería (Ferreira et al., 2010a; Christofolletti et al., 2013).

La digestión anaerobia con microorganismos constituye, en la actualidad, una de las principales estrategias de manejo de este subproducto (Bermúdez et al., 2000); sin embargo, existen otras opciones de manejo que incluyen su uso como abono o fertilizante. Por otro lado, los componentes de la vinaza la hacen una matriz compleja que puede ser aprovechada para el cultivo de microorganismos de interés industrial como es el caso de las microalgas, pero éste último uso se ve afectado por la presencia de compuestos inhibitorios del crecimiento celular y la baja concentración de azúcares simples fermentables (asimilables) presentes en su composición.

En la región del Valle del Cauca a parte de la vinaza se generan otros residuos agroindustriales tales como las cáscaras de chontaduro. Éstas en su composición cuentan con una gran cantidad de almidón que a través de procesos de hidrólisis química o enzimática puede transformarse a azúcares simples (asimilables). Debido a lo anterior, se decidió utilizar dos cepas de hongos del género *Pleurotus spp* como agentes transformadores del almidón que facilitarían, a través de la hidrólisis enzimática, la conversión del almidón a glucosa.

Teniendo en cuenta lo anterior, este proyecto surgió como una iniciativa para la generación de una metodología enfocada al aprovechamiento de las cáscaras de chontaduro y la vinaza, ambos residuos agroindustriales, para la generación de un medio de cultivo útil en la producción de biomasa de la microalga *Chlorella vulgaris*.

Para ello, se evaluó primeramente la concentración de glucosa residual generada después de la hidrólisis fúngica *in situ* en tres medios formulados con diferentes concentraciones de vinaza (50%, 75% y 100 %v/v) y suplementados al 5 % p/v con cáscaras de chontaduro. Posteriormente, y a partir de los resultados obtenidos de la primera etapa, se decidió cultivar la microalga en dos medios formulados al 50% v/v y al 75% v/v de vinaza los cuales se suplementaron con un hidrolizado de cáscaras de chontaduro que se obtuvo de la hidrólisis fúngica del almidón presente en un medio formulado únicamente con cáscaras al 5% p/v.

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

2.1. Planteamiento del problema y justificación

En la actualidad, se considera que los residuos agroindustriales son un problema de gran impacto e inmensas consecuencias para el medio ambiente. Desafortunadamente, esta realidad se evidenció sólo tiempo después cuando comenzaron a observarse los efectos negativos que dichos residuos generaban al entorno en el cual se hacía su disposición final.

Por esta razón, y debido a la regulación por parte de las entidades del estado encargadas de la protección y conservación del medio ambiente, la industria que genera dichos residuos se interesó en desarrollar nuevas estrategias que facilitaran y mitigaran el impacto de estos residuos y que simultáneamente, a partir de ellos, se generaran nuevos productos, procesos o tecnologías que aportaran un valor agregado a la cadena productiva.

La vinaza es uno de esos desechos agroindustriales que resulta de los procesos de transformación de las mieles de la caña de azúcar para la obtención de etanol y levadura de panadería (Ferreira et al., 2010a; Christofolletti et al., 2013). Cuando su disposición final se hace de manera indiscriminada e inadecuada en suelos y afluentes hídricos genera cambios en las propiedades fisicoquímicas de los mismos, los cuales afectan el microambiente y traen consecuencias negativas sobre los suelos agrícolas y la biota en general (Christofolletti et al., 2013).

No obstante, en los últimos años se han desarrollado estrategias y metodologías que mitigan el impacto de este residuo en el ambiente y se han generado técnicas físicas y químicas a nivel de laboratorio que permiten su transformación; sin embargo, se ha observado que al momento de escalar estos procesos a nivel industrial resultan poco eficientes y muy costosos.

Debido a esto, desde que en 1980 se propuso el uso de microorganismos en la decoloración de efluentes de aguas residuales (Rodríguez et al., 1999), se han desarrollado e implementado técnicas que involucran el uso de los mismos para la biorremediación y el tratamiento de la vinaza. Puesto que los métodos biológicos resultan fáciles de escalar a nivel industrial, son eficientes y económicos en comparación con los métodos físicos y químicos, son los más estudiados e implementados en la actualidad (Ferreira et al., 2010a).

Según el reporte *“Sostenibilidad del sector azucarero colombiano 2015 - 2016”* realizado por la Asociación de Cultivadores de Caña de Azúcar de Colombia (ASOCAÑA), se estima que para la producción de 1 litro de etanol se generan de 6 a 13 litros de vinaza en promedio a nivel mundial. Según lo anterior, y con datos reportados por el Ministerio de Minas y Energía de Colombia y el Fondo de Estabilización de Precios del Azúcar (FEPA), en el año 2015 se produjeron en

Colombia aproximadamente 456.403 litros de etanol, lo que indica una generación aproximada de 2.738.418 a 5.933.239 litros de vinaza producidos sólo en este país (ASOCAÑA, 2016), indicando de esta manera que el potencial aprovechamiento de este residuo es elevado debido a la gran cantidad del mismo.

Por lo anterior, se planteó el siguiente interrogante: ¿Cómo generar una estrategia que permita aumentar la cantidad de vinaza que se puede utilizar para el cultivo heterotrófico de la microalga *Chlorella vulgaris* aprovechando las cáscaras de Chontaduro y la capacidad enzimática de los hongos del género *Pleurotus spp*?

2.2. Marco teórico y estado del arte

2.2.1. Residuos agroindustriales

Los residuos agroindustriales son el conjunto de materiales sólidos o líquidos que se generan a partir del consumo directo de materias primas agrícolas o durante los procesos de transformación industrial que éstas atraviesan para la obtención de un producto con valor comercial. Estos desechos se caracterizan por no tener una utilidad económica para el proceso que los generó y por su potencial aprovechamiento para generar subproductos con valor agregado (Saval, 2012).

Actualmente, en el ámbito mundial existe un gran interés por la conservación y protección del medio ambiente, el uso sostenible de los recursos renovables y no renovables y el aprovechamiento de los residuos de la agroindustria (Muñoz et al., 2014); sin embargo, algunos de los problemas que dificultan el manejo de los residuos agroindustriales son la falta de conciencia ambiental, la escasez de recursos económicos disponibles para su disposición final, la poca capacidad tecnológica para su tratamiento y la legislación deficiente que se tiene para su gestión (Saval, 2012).

Generalmente, las características de los residuos agroindustriales son variables y dependen del proceso que los generó y la materia prima que se utilizó; no obstante, el contenido elevado de materia orgánica es la principal característica común a todos ellos. Por esta razón, los esfuerzos se enfocan en el desarrollo de metodologías que aprovechen este alto contenido orgánico como fuente renovable en la fabricación de alimentos, biocombustibles y otros productos de interés comercial (Saval, 2012; Muñoz et al., 2014).

2.2.1.1. Vinaza

La vinaza es el subproducto final que se obtiene de las mieles de la caña de azúcar después de los procesos de transformación para la generación de etanol y levadura

de panadería (Ferreira et al., 2010a; Christofolletti et al., 2013). Este residuo es un líquido color marrón oscuro con un elevado contenido de materia orgánica soluble y sólidos en suspensión que se caracteriza por tener un pH ácido entre 3.5 y 5.0 (García & Rojas, 2006; Bautista & Durán, 1998; Bermúdez et al., 2000), una alta concentración de cationes de potasio, calcio y magnesio (Dávila et al., 2009), y la presencia de compuestos recalcitrantes e inhibitorios del crecimiento celular como los fenoles (Guerreiro et al., 2016; Robles et al., 2012; López et al., 2012).

Debido a su elevado contenido de materia orgánica, la vinaza se constituye en un residuo altamente contaminante, especialmente, si se dispone directamente en afluentes hídricos, ya que disminuye la luminosidad de las aguas, produce eutrofización del agua y contribuye con el aumento de poblaciones de insectos y vectores de enfermedades (Korndorfer, 2009).

Así mismo, este residuo presenta valores elevados de DQO y DBO lo que se traduce en un agotamiento del oxígeno disuelto en el entorno y, por lo tanto, todos los organismos que necesitan oxígeno para realizar funciones vitales se ven afectados y mueren (Dávila et al., 2009; García & Rojas, 2006; Irisarri, 2006). Por ejemplo, los peces se ven gravemente afectados pues ellos respiran el oxígeno disuelto en el agua. De esta manera, la vinaza destruye el ecosistema y el microambiente si su disposición final se hace sin tratamiento o transformación alguna.

Respecto a la composición de la vinaza (véase Tabla 1) se sabe que contiene materia orgánica e inorgánica susceptible de aprovechamiento biológico. Uno de estos componentes son los azúcares residuales, los cuales pueden ser fermentables si la vinaza proviene de destilerías para la producción de etanol o no fermentables si ésta proviene de fermentación para generar biomasa de levadura (Basanta et al., 2007).

Tabla 1. *Composición química de la vinaza*

| COMPONENTES DE LA VINAZA* | |
|---|--|
| ORGÁNICOS | INORGÁNICOS |
| Compuestos nitrogenados (como úrea), lípidos, enzimas, clorofila, lignina, ácidos orgánicos, fenoles, polifenoles, celulosa, hemicelulosa, glicerol, azúcares, melanoidinas | Sulfatos, cloruros, fosfatos, potasio, sodio, magnesio, calcio, silicatos, metales pesados |

* (Basanta et al., 2007; García & Rojas, 2006; López et al., 2012; Ferreira et al., 2010b)

Debido a la naturaleza contaminante de la vinaza se han desarrollado técnicas físicas, químicas y biológicas que disminuyen la cantidad de materia orgánica para que su disposición final tenga un menor impacto en el ambiente. Por ejemplo, un grupo de investigadores de la Universidad del Valle presentó una solicitud de patente en 2009 para un procedimiento en el que, a través de un método

electroquímico, se logra disminuir considerablemente la cantidad de materia orgánica contenida en la vinaza y, por lo tanto, disminuir su impacto ambiental (Hernández, 2009).

Por otra parte, y hablando sobre las técnicas biológicas, se ha implementado la digestión anaerobia desde 1990 en países como Cuba, México y Brasil, países en los que se observó que este proceso tiene algunas ventajas sobre los métodos fisicoquímicos, entre las que destacan la generación de biogás, la reducción de olores, bajos requerimientos de áreas de trabajo, bajo consumo de energía, fácil operación y una mayor eficiencia en el proceso de reducción de materia orgánica (Castro, 2009).

Así mismo, se ha observado que el cultivo de microorganismos en la vinaza se ve limitado por la presencia de moléculas recalcitrantes e inhibitorias del crecimiento celular como las melanoidinas y los fenoles (García & Rojas, 2006; López et al., 2012; Ferreira et al., 2010b). De esta manera, a medida que la vinaza se concentra aumenta la cantidad de estas sustancias y, por lo tanto, el efecto negativo que ejercen sobre los microorganismos es mayor.

2.2.1.2. Cáscaras de chontaduro

El chontaduro, cuyo nombre científico es *Bactris gasipaes*, es una palma nativa de centro y sur América reconocida por su fruto. Éste tiene un gran valor nutricional porque contiene diferentes macronutrientes y micronutrientes importantes para el ser humano. Algunos de estos componentes como los ácidos grasos poliinsaturados y algunos aminoácidos esenciales son indispensables para la nutrición, el crecimiento, el desarrollo hormonal y otras funciones relevantes del organismo humano (Godoy et al., 2007; Valencia, 2014).

En Colombia, la producción de chontaduro se concentra en la región pacífica (véase Figura 1), especialmente en el departamento del Valle del Cauca con una participación del 69.3% de la producción total (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2011). Así mismo, se sabe que este fruto es un componente esencial de la cultura pacífica colombiana y que representa especialmente a la cultura afrodescendiente (Valencia, 2014). Por otra parte, las cáscaras de este fruto son un importante desecho agroindustrial con un gran potencial aprovechamiento debido al elevado contenido de almidón residual, proveniente de la pulpa, y a los β -carotenos responsables de la coloración amarilla, anaranjada y roja que tienen las cáscaras.

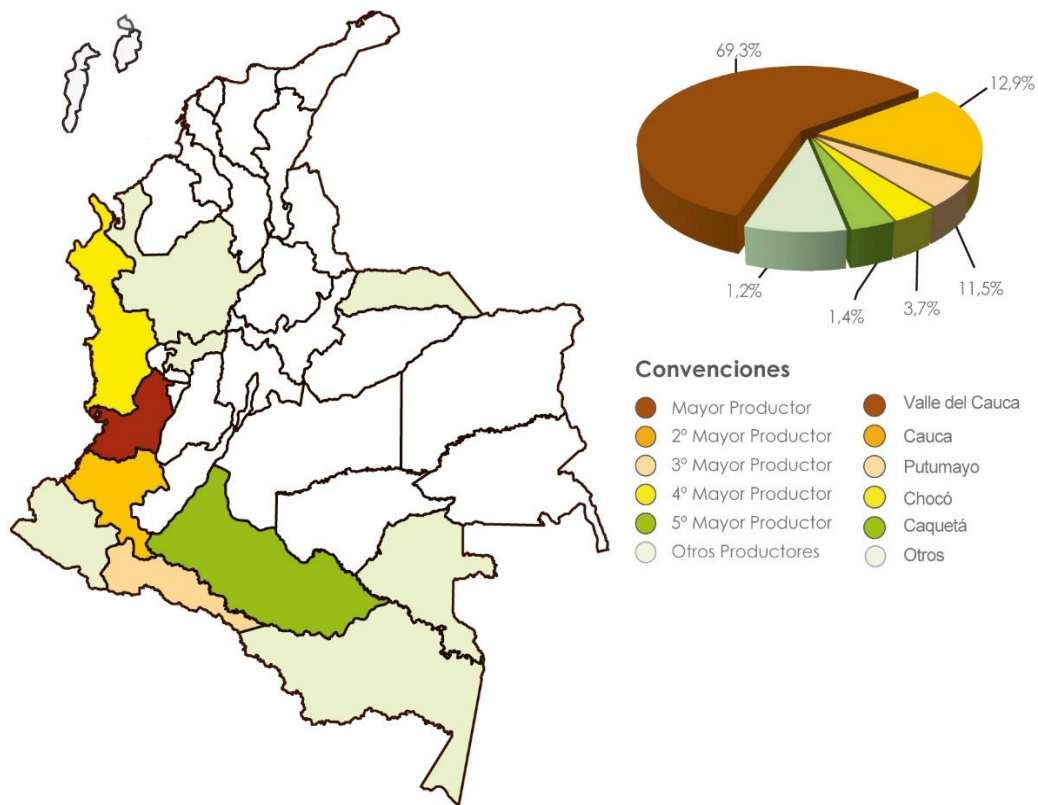


Figura 1. Distribución por departamentos de la producción de chontaduro en Colombia (Adaptado de Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2011)

Algunos de los procesos industriales que dan origen a las cáscaras de chontaduro son la producción de harina y mermelada de chontaduro. Estos productos sólo emplean la pulpa del fruto y, por lo tanto, las cáscaras son retiradas al inicio del proceso para evitar que el producto final sea afectado por las características organolépticas de la cáscara. Así mismo, las cáscaras son generadas artesanalmente de la venta callejera del fruto cocinado (Godoy et al., 2007).

Debido a la presencia de almidón en las cáscaras, éstas podrían utilizarse como un suplemento para el cultivo de microorganismos de interés industrial (Márquez, 2014), ya que a través de procesos de hidrólisis química o enzimática el almidón se puede transformar a glucosa, un azúcar fermentable y fácilmente asimilable en el metabolismo de la mayoría de microorganismos. Posiblemente, esto representaría una disminución en los costos invertidos en la fuente de carbono para el crecimiento celular durante el cultivo de los microorganismos.

En la actualidad, existen pocos estudios que evalúan el uso de las cáscaras de chontaduro como una fuente nutricional alternativa de consumo para organismos superiores y microorganismos. Uno de estos estudios evaluó su potencial uso como suplemento nutricional alternativo en la alimentación de bovinos y aves y concluyó que, debido a su contenido de carbohidratos, grasas y fibra, las cáscaras de

chontaduro resultan ser un alimento importante y considerable para el consumo en la dieta de estos organismos (Márquez, 2014).

2.2.1.2.1. Almidón

El almidón es un biopolímero formado por dos polisacáridos, la amilosa y la amilopeptina. La amilosa está formada por cadenas lineales de unidades de glucosa unidas entre sí por enlaces glucosídicos α -1,4 (véase Figura 2), mientras que la amilopeptina es un polímero altamente ramificado conformado por cadenas de glucosa ligadas con enlaces glucosídicos α -1,4 de las cuales se desprenden, por enlaces glucosídicos α -1,6, otras ramificaciones de cadenas de glucosa llamadas α -1,4-glucanos (véase Figura 3). Se sabe que aproximadamente el 20% de la composición del almidón corresponde a amilosa y el 80% a amilopeptina (Ruiz, 2006). Así mismo, se ha observado que el almidón es insoluble en agua fría y que por su elevado peso molecular tiende a precipitar en medios acuosos.

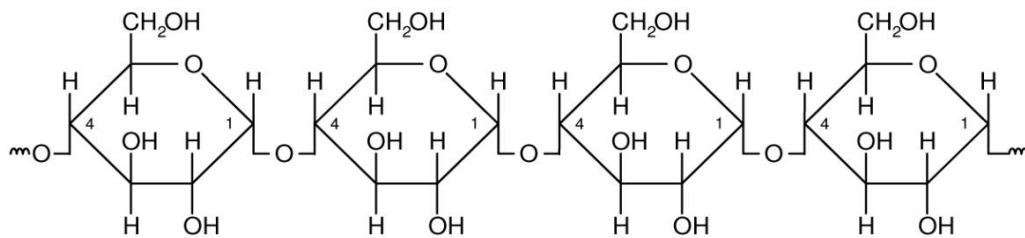


Figura 2. Estructura de la amilosa conformada por enlaces glucosídicos α -1,4 (Ruiz, 2006)

La amilosa generalmente está constituida por 200 a 20.000 moléculas de glucosa, mientras que la amilopeptina contiene entre 10.000 y 20'000.000 de unidades de glucosa (Ruiz, 2006).

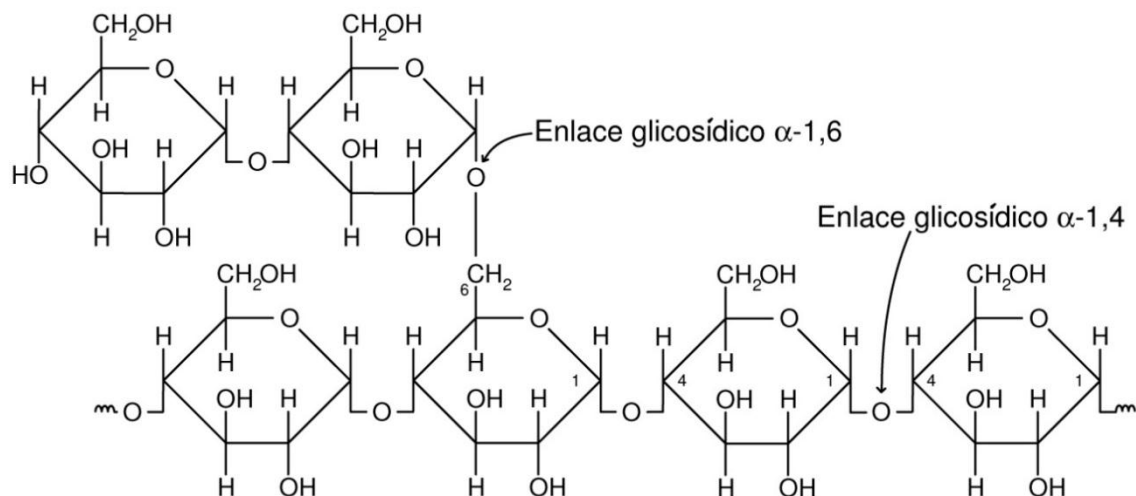


Figura 3. Estructura de la amilopeptina conformada por enlaces glucosídicos α -1,4 y α -1,6 (Ruiz, 2006)

Debido a la gran cantidad de moléculas de glucosa que conforman este biopolímero, el almidón es una fuente potencial de glucosa para todos aquellos microorganismos u organismos que tengan la capacidad enzimática para degradarlo.

La degradación del almidón por hongos ha sido muy estudiada en el género *Aspergillus spp* (Xiong et al., 2017). De estos estudios se ha concluido que las enzimas principales encargadas de la degradación del almidón en hongos son las α -amilasas [E.C. 3.2.1.1], las glucoamilasas [3.2.1.3] y las α -glucosidasas [E.C 3.2.1.20] (Xiong et al., 2017; Tsukagoshi et al., 2001; Vega, 2016).

Estas enzimas hidrolizan el almidón de manera conjunta para producir glucosa y maltosa. Las α -amilasas [E.C. 3.2.1.1] hidrolizan los enlaces α -1,4 internos de las cadenas de amilosa, mientras que las glucoamilasas [3.2.1.3] y las α -glucosidasas [E.C 3.2.1.20] hidrolizan los enlaces α -1,4 de los extremos de las cadenas de amilosa. Las glucoamilasas también hidrolizan los enlaces glucosídicos α -1,6 de las ramificaciones (Tsukagoshi et al., 2001) (véase Figura 4).

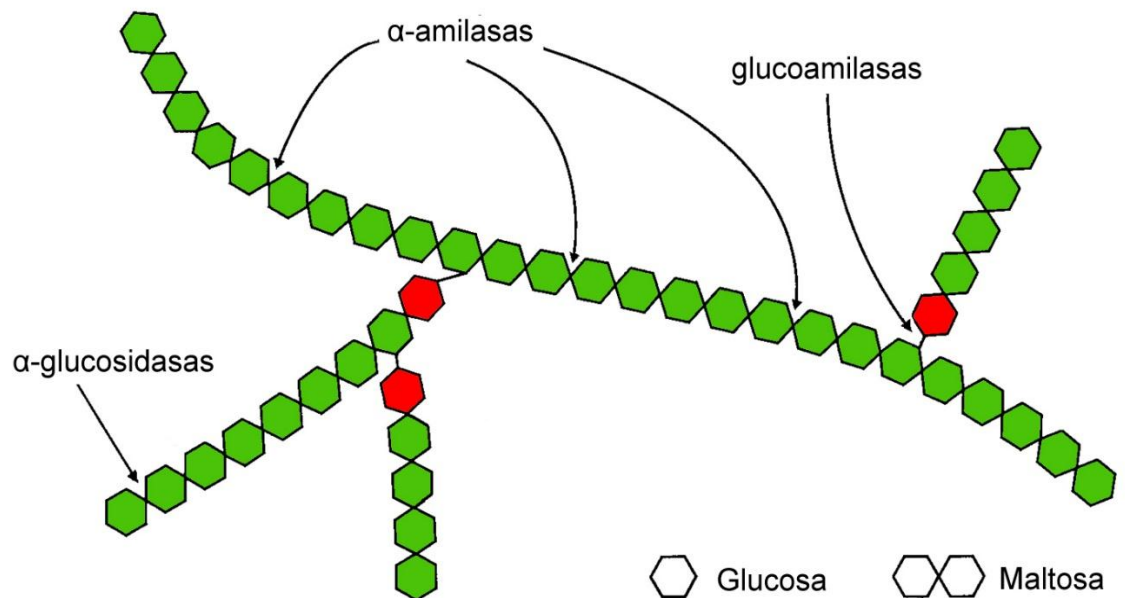


Figura 4. Hidrólisis enzimática del almidón según tipo de enlaces
(Adaptado de Montes & Quirasco, 2014)

Otros estudios sugieren que las β -amilasas [E.C. 3.2.1.2] son otras de las enzimas sintetizadas por los hongos capaces de degradar el almidón (Ray, 2002). Del mismo modo, se ha reportado que el almidón es uno de los mejores inductores para la síntesis y producción de β -amilasas (Chatterjee et al., 1992; Ray et al., 1998). Como productos de la hidrólisis mediada por estas enzimas se obtienen moléculas de maltosa y polímeros de dextrinas (Ray, 2002). Las dextrinas son consideradas polímeros intermedios entre el almidón y la glucosa. Éstos se generan de la hidrólisis parcial del almidón (Aristizábal et al., 2007; Velasco et al., 2008). La maltosa es un disacárido de glucosa que está conformado por dos moléculas de glucosa unidas entre sí por un enlace glucosídico α -1,4. Ésta puede ser hidrolizada por la acción de la α -amilasa y generar monosacáridos de glucosa.

Dependiendo de la cantidad de enzimas producidas por el hongo y la cantidad de almidón presente en el medio, éste último puede ser hidrolizado parcial o totalmente. Si el almidón es hidrolizado parcialmente, aparte de glucosa y maltosa, en el medio quedan cadenas de amilosa y amilopeptina residuales, así como polímeros de dextrinas (véase Figura 5). Del mismo modo, la hidrólisis del almidón se ve favorecida por factores físicos como las temperaturas elevadas (Velasco et al., 2008).

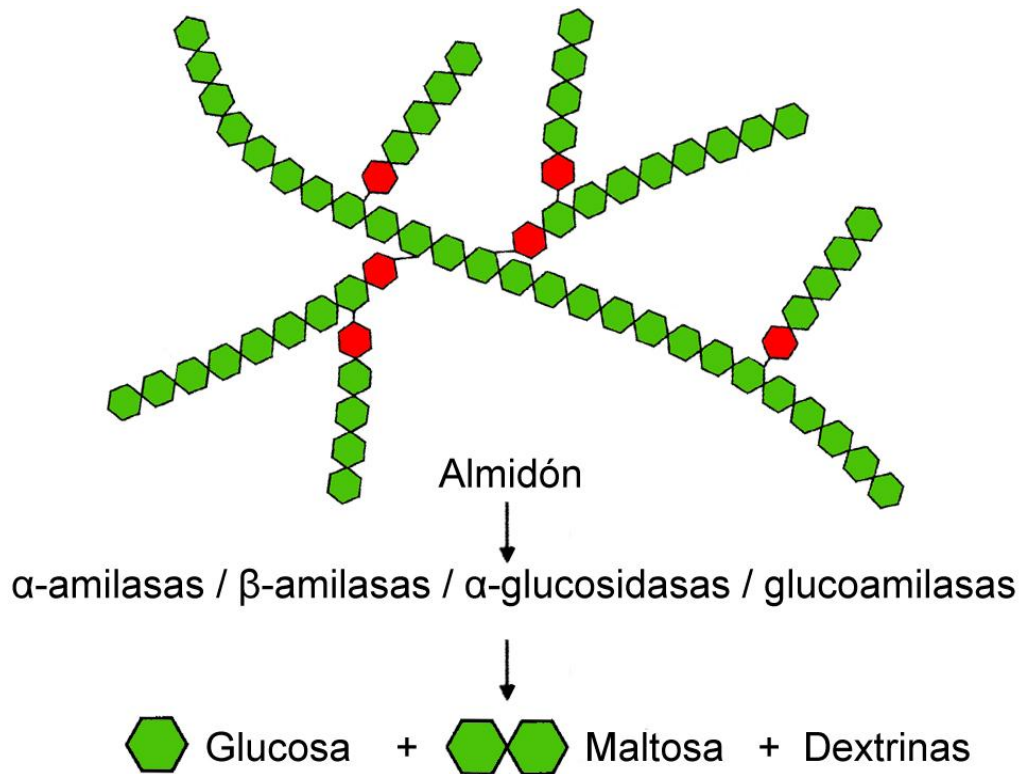


Figura 5. *Proceso general de la hidrólisis del almidón*
(Adaptado de Montes & Quirasco, 2014)

2.2.2. Agentes transformadores

Los microorganismos son un extenso e interesante grupo de seres microscópicos que evolucionaron adaptándose a las condiciones ambientales del entorno. A través del tiempo desarrollaron cambios metabólicos y genéticos que les permitieron adquirir una maquinaria enzimática capaz de aprovechar los nutrientes disponibles en su hábitat. Las microalgas y las bacterias son grupos de microorganismos estudiados para el tratamiento de efluentes industriales como la vinaza; no obstante, otros organismos que han sido implementados para el manejo de estos residuos son los hongos.

La mayoría de microorganismos como las bacterias y las microalgas tienen un ciclo de vida que puede representarse a través de una curva que grafica el tiempo versus la cantidad de células generadas. Esta curva generalmente tiene cuatro fases: fase lag o fase de inducción (1), fase exponencial (2), fase estacionaria (3) y fase de muerte o declive (4) (véase Figura 6).

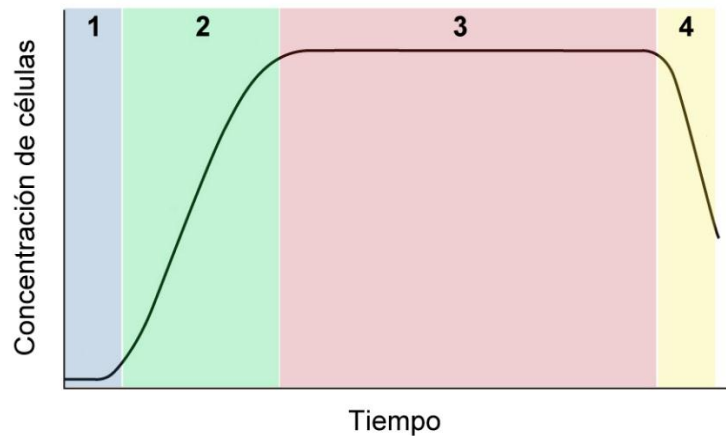


Figura 6. Curva de crecimiento de microorganismos: (1) fase lag o de inducción; (2) fase exponencial; (3) fase estacionaria; y (4) fase de muerte o declive

En la fase de inducción las células comienzan a adaptarse fisiológica y metabólicamente a las condiciones del medio. Una vez las células se adaptan al medio comienzan a crecer de manera exponencial. Posteriormente, el crecimiento exponencial se ve limitado y las células entran en la fase estacionaria donde el número de células nuevas se iguala, en teoría, al número de células que mueren. Finalmente, en la fase de declive o muerte las células pueden mantenerse vivas y metabólicamente activas, pero eventualmente mueren (Pires, 2015).

2.2.2.1. Hongos del género *Pleurotus spp*

En un estudio realizado en 1980 se propuso trabajar con hongos de la pudrición blanca para decolorar efluentes industriales y degradar los compuestos xenobióticos y recalcitrantes presentes en estos residuos (Eggen, 2000; Higson, 1991). Desde entonces se ha trabajado con estos hongos para el tratamiento de todos aquellos residuos líquidos industriales coloreados, especialmente los de la agroindustria. La vinaza es un residuo líquido color marrón oscuro que debe su coloración al alto contenido de melanoidinas, moléculas que se forman de la reacción entre carbohidratos y aminoácidos (Ferreira et al., 2010b).

El grupo de los hongos de la pudrición blanca, al que pertenecen los hongos del género *Pleurotus spp*, se caracteriza porque tienen un sistema extracelular de enzimas no específicas capaz de degradar una gran cantidad de sustratos entre los que figuran la celulosa, la hemicelulosa, la lignina y el almidón (Eggen, 2000; Luley, 2006). Este grupo se encuentra constituido por algunos hongos de la división basidiomicetos y la división ascomicetos. Éstos reciben el nombre de hongos de la

podrición blanca porque producen un cambio en la coloración de la madera de color marrón a color blanco pálido cuando degradan la lignina (Luley, 2006). Del mismo modo, se sabe que los hongos del género *Pleurotus spp* son hongos comestibles e inoos para el ser humano y que son organismos de amplio espectro en sus requerimientos nutricionales, por lo que pueden crecer en un variado número de sustratos y medios (Ramos, 1999; Tapie, 2015).

Diversos estudios se han realizado con los hongos del género *Pleurotus spp*, especialmente con la especie *Pleurotus ostreatus*, en donde se demuestra su gran capacidad para crecer y desarrollarse en residuos agroindustriales sólidos y líquidos constituidos principalmente por lignina, celulosa, hemicelulosa y almidón (Vega, 2016; Rodríguez et al., 2003; Guillén et al., 1998).

Dentro de las enzimas constituyentes del complejo multienzimático producidas por los hongos del género *Pleurotus spp* se encuentran las lacasas [EC 1.10.3.2], una subfamilia de enzimas que utilizan oxígeno para oxidar fenoles y polifenoles (Rodríguez, 2006; Kuhad et al., 1990), la manganeso peroxidasa [E.C. 1.11.1.13] (Guillén et al., 1998) y la lignina peroxidasa [E.C. 1.11.1.14] (Kuhad et al., 1990; Higuchi, 2004). Todas ellas, responsables de la degradación de la lignina, confieren a los hongos del género *Pleurotus spp* el nombre de hongos ligninocelulolíticos (Ferreira et al., 2010b).

Del mismo modo, se han estudiado las enzimas producidas por estos hongos encargadas de la degradación de la celulosa y la hemicelulosa y se identificaron las exoglucanasas [E.C. 3.2.1.91] (Kuwahara et al., 1984), las endoglucanasas [E.C. 3.2.1.4] (Ferreira et al., 2010a) y las xilanasas [E.C. 3.2.1.8] (Quiroz & Folch, 2011). Así mismo, se sabe que estos hongos producen las α -amilasas [E.C. 3.2.1.1] (Vega, 2016; Xiong et al., 2017), las glucoamilasas [3.2.1.3] (Xiong et al., 2017) y las α -glucosidasas [E.C 3.2.1.20] (Xiong et al., 2017) para hidrolizar el almidón.

Es interesante mencionar que estos hongos degradan la lignina como mecanismo para acceder a la hemicelulosa y la celulosa presente en el medio, e indirectamente reducen el efecto inhibitorio de los componentes fenólicos de la lignina (Quintero, 2012). Aún más relevante, es el hecho que los hongos excretan las enzimas *in situ* a la matriz donde son cultivados. Debido a esto, este proyecto pretendió aprovechar la capacidad enzimática de los hongos para convertir el almidón en glucosa, y de esta manera suplementar la matriz de vinaza.

2.2.2.2. *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris es una microalga unicelular eucariota, de forma circular, fotosintética, emparentada filogenéticamente con las plantas, pero con un metabolismo y una fisiología menos compleja (Converti et al., 2009; Liang, 2009). Se caracteriza porque tiene un metabolismo heterotrófico y autotrófico, es decir, que tiene la capacidad de crecer en ausencia de luz y con carbono orgánico como fuente

de energía, así como tiene la capacidad de crecer en presencia de luz como fuente de energía y con carbono inorgánico como fuente de carbono (Tijani et al., 2015; Converti et al., 2009; Cabeza, 2010; Díaz & Díaz, 2012). Adicionalmente, este microorganismo tiene la capacidad de combinar estos dos tipos de metabolismo y crecer de manera mixotrófica (Cabeza, 2010).

Inicialmente, las microalgas se usaban sólo como alimento para la industria acuícola. De esta manera, se conoce el reporte que en el año 1999 la producción de estos microorganismos fue de 1000 toneladas: 62% para moluscos, 21% para camarones y 16% para peces (Converti et al., 2009). Posterior a un mejor entendimiento de estos microorganismos, y después que Harder y von Witch propusieran en 1942 el uso de diatomeas para la producción urgente y necesaria de grasa durante la segunda guerra mundial, se realizaron diferentes experimentos, financiados por el departamento de energía de los Estados Unidos, que demostraron la utilidad de las microalgas como fuente para la obtención de combustible líquido (Liang, 2009; Sheehan et al., 1998).

Fue a partir de estos acontecimientos que el estudio de las microalgas para la obtención de combustible aumentó y la mayoría de experimentos se enfocó, principalmente, a la consecución más alta posible de lípidos como materia prima para la producción de biodiesel a través del mecanismo de transesterificación (Widjaja et al., 2008). De esta manera, se han tratado de utilizar diferentes medios de cultivo que favorezcan y optimicen el crecimiento de las microalgas.

Teniendo en cuenta lo anterior, en años más recientes se ha estudiado la capacidad de las microalgas verdes para crecer en vinazas, como medio de cultivo, debido a que algunos de los usos industriales desarrollados para el manejo de este residuo no aprovechan la gran cantidad de materia orgánica que contiene y, por lo tanto, se ha propuesto que el uso de las vinazas como medio de cultivo heterotrófico para las microalgas representa una buena oportunidad para la producción de biomasa algal (Arjonilla & Gaspar, 2015). Así mismo, se ha estudiado la capacidad de estos microorganismos como agentes biorremediadores, ya que tienen la capacidad de remover del medio en el cual crecen el nitrógeno, el amonio, el fósforo y algunos metales pesados como el zinc y el cadmio (Arjonilla & Gaspar, 2015).

Un dato interesante de *Chlorella vulgaris* es que está aprobada por la FDA como un microorganismo GRAS (*Generally Recognized As Safe*), lo que significa que está avalada para el consumo humano y su uso en diferentes productos alimenticios (U.S. Food and Drug Administration, 2011). En la actualidad, esta microalga es utilizada como suplemento alimenticio para humanos, como alimento en la acuicultura y es usada como materia prima en productos farmacéuticos y cosméticos. Así mismo, es utilizada para la producción de aditivos alimenticios y biodiesel. Aún más, como dato interesante, numerosos estudios demuestran los beneficios de *Chlorella vulgaris* para la salud (U.S. Food and Drug Administration, 2011).

2.2.3. Técnicas analíticas y métodos de cuantificación y medición

2.2.3.1. Azúcares por espectrofotometría

La espectrofotometría es una técnica analítica derivada de los métodos espectroscópicos, es decir, todos aquellos métodos que aprovechan la interacción de la materia con la radiación. Esta técnica mide la cantidad de radiación absorbida por una muestra, a una determinada longitud de onda, y permite obtener información cuantitativa y cualitativa sobre la muestra. Así mismo, esta técnica tiene su fundamento en la Ley de Beer, o también llamada ley de absorción, que en términos generales establece una relación directa entre la cantidad de radiación absorbida y la cantidad de analito o analitos (especies químicas que absorben la radiación) presentes en la muestra. Por lo tanto, y a través de una ecuación de regresión lineal que se obtiene de una curva de calibración, se relaciona la concentración del analito en la muestra con el valor de absorbancia que reporta el espectrofotómetro (equipo que mide absorbancia) (Skoog et al., 2005).

Uno de los requisitos, y el más importante, para poder utilizar esta técnica es que la especie química que se está cuantificando debe tener grupos o enlaces químicos que absorban la radiación y generen un cambio en la distribución electrónica de la molécula, de lo contrario no se podría cuantificar el analito de manera directa.

Los azúcares como la glucosa no se pueden cuantificar directamente por esta técnica porque no tienen grupos o enlaces químicos excitables por la radiación. Por ello, su determinación se hace de manera indirecta. Actualmente, existen diferentes maneras de cuantificar la glucosa de manera indirecta por espectrofotometría a través de métodos colorimétricos y enzimáticos.

Uno de los métodos enzimáticos utilizados mide indirectamente la glucosa a través de la medición del NADPH ya que esta molécula absorbe radiación en los 340 nm. Este método se utiliza porque la cantidad de NADPH que se forma después de las reacciones enzimáticas que convierten la glucosa a gluconato-6-fosfato es estequiométricamente equivalente a la cantidad de glucosa presente en la muestra (véase Figura 7).

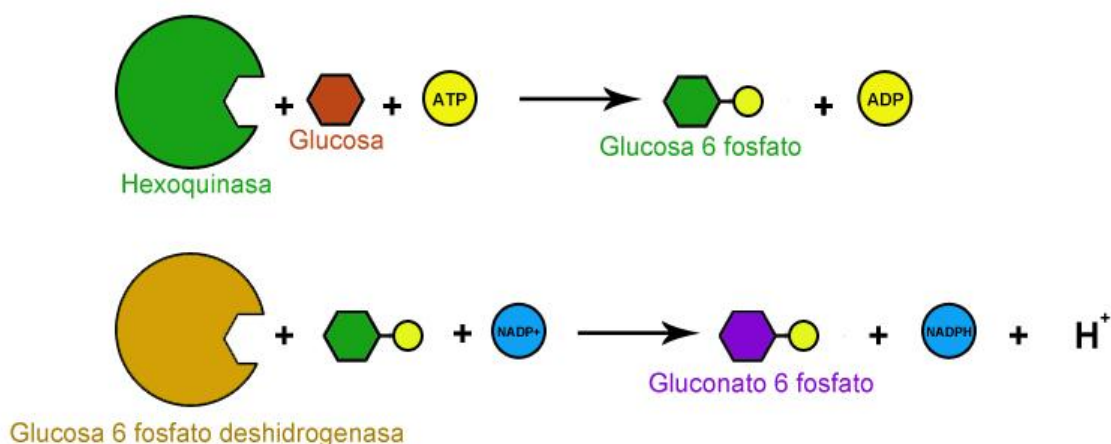


Figura 7. Reacciones enzimáticas que generan el NADPH para cuantificar a 340 nm

2.2.3.2. Azúcares por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución o HPLC, por sus siglas en inglés (*High-Performance Liquid Chromatography*), es una de las técnicas analíticas más utilizadas para separar, cuantificar y determinar moléculas y compuestos presentes en materiales orgánicos, inorgánicos y biológicos (Skoog et al., 2005).

El principio de esta técnica consiste en la separación de los componentes de una muestra. Para ello, una fase móvil transporta la muestra a través de una columna que contiene la fase estacionaria en donde los componentes se van separando a diferentes tiempos dependiendo de su interacción y afinidad por ambas fases, así como de su naturaleza y estructura química. Una vez los componentes son separados, éstos pasan por un detector que genera una señal en función de la concentración y del tiempo en el que se detectó cada componente.

La detección de azúcares como la glucosa mediante esta técnica ha sido ampliamente desarrollada utilizando detectores de índice de refracción. Este tipo de detectores miden la diferencia del índice de refracción entre el solvente puro y el solvente con la muestra (Foitzich, 2013; Skoog et al., 2005).

2.2.3.3. Carbono orgánico total (COT)

La medición del carbono orgánico oxidable total (COT) permite conocer la cantidad de carbono en forma de materia orgánica contenida en una muestra determinada. Todos los métodos utilizados para determinar este parámetro tienen dos objetivos

en común: oxidar el carbono orgánico a dióxido de carbono y posteriormente medirlo. Dentro de los métodos más usados para medir el COT destacan la combustión seca, la combustión húmeda, la pérdida de peso por ignición y su determinación por métodos colorimétricos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Desarrollar a escala de laboratorio una estrategia de biotransformación de la vinaza de caña de azúcar y cáscaras de chontaduro mediada por hongos del género *Pleurotus spp* para la generación de un medio de cultivo que favorezca el crecimiento heterotrófico de la microalga *Chlorella vulgaris*.

3.2. Objetivos específicos

- 3.2.1. Determinar la formación de glucosa a partir de la hidrólisis, mediada por los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus sajor caju*, del sustrato conformado por las diferentes proporciones de vinaza y cáscaras de chontaduro establecidas.
- 3.2.2. Evaluar el efecto de los hidrolizados generados, como medios de cultivo, sobre el crecimiento heterotrófico de *Chlorella vulgaris*.

4. METODOLOGÍA

Este proyecto se desarrolló en dos etapas consecutivas para dar cumplimiento a los objetivos específicos propuestos. La primera etapa correspondió al cultivo de los hongos (*Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus sajor caju*), la cual dio paso a la segunda, que fue el cultivo heterotrófico de la microalga (*Chlorella vulgaris*). De esta manera, y en términos generales, se buscó evaluar la posibilidad de utilizar los hongos como un pretratamiento para enriquecer con azúcares al medio de cultivo donde crecería la microalga.

Se implementó un diseño estadístico factorial 3×2 en el que se consideraron dos factores (la especie de hongo y la concentración (porcentaje v/v) de vinaza en el medio de cultivo) para dar cumplimiento al primer objetivo. Así mismo, se estableció como variable de respuesta la concentración de glucosa generada en los medios de cultivo y se determinó la cantidad de carbono orgánico total después del cultivo de los hongos.

Posteriormente, para dar cumplimiento al segundo objetivo se realizó un seguimiento del crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* y se cuantificó la biomasa generada. Además, se determinó la cantidad de carbono orgánico total en los medios después del cultivo de la microalga.

4.1. Origen de las cepas

Las cepas de los hongos *Pleurotus spp* provienen de una donación al profesor Nelson Caicedo de parte del Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé) en Chinchiná, Caldas. Por su parte, la cepa de la microalga *Chlorella vulgaris* proviene de la colección UTEX referenciada con el número 385 de la Universidad de Texas en Austin Estados Unidos.

4.2. Origen de los residuos agroindustriales

La vinaza se obtuvo concentrada (53 % de sólidos) de la compañía Levapan S.A ubicada en la ciudad de Tuluá. Por otro lado, las cáscaras de chontaduro se obtuvieron al norte de la ciudad de Cali en una venta informal del fruto de chontaduro ubicada en el sector de “la chontadurera”.

4.3. Propagación y mantenimiento de las cepas

Los hongos se mantuvieron y se propagaron en placas Petri con medio de cultivo PDA (*Potato-Dextrose-Agar*) a una temperatura de 29°C.

De cada placa Petri crecida se preparaba una suspensión de esporas en cabina de flujo laminar la cual era utilizada como inóculo para el cultivo de otras placas. Esta suspensión se preparaba con solución Tween 80 al 0.01% v/v. Para preparar la suspensión se adicionaba 1 mL de la solución de Tween sobre la superficie de la placa con el hongo. Luego, se raspaba la superficie con ayuda de un asa estéril hasta observar que las esporas iban quedando suspendidas en el líquido. Finalmente, se tomaban 500 µL de aquella suspensión y se adicionaban en la superficie del nuevo medio de cultivo en donde se propagaría el hongo.

Por su parte, la microalga se mantuvo en botellas de vidrio (con capacidad para 250 mL) con medio CHU-13 líquido a una temperatura de 24°C. El contenido de cada botella donde estaban creciendo se trasvasaba en cabina de flujo laminar a tubos *Falcon*. Posteriormente, estos tubos se llevaban a centrifugar por 10 min a 3500 rpm. Luego, se descartaba el sobrenadante y el pellet (de biomasa) se concentraba en un volumen pequeño de solución salina 0.9% estéril. Finalmente, la biomasa obtenida en cada tubo *Falcon* se juntaba y se adicionaba a otras botellas con medio CHU-13 nuevo. Si se requería una concentración específica de células/mL en la biomasa concentrada se hacía un conteo en cámara de Neubauer para llevarla al valor deseado.

4.4. Ensayos preliminares

Las cepas de los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus sajor caju* se cultivaron en medios líquidos conformados por stock de vinaza al 100 %v/v, correspondiente a una dilución 1:10 de la vinaza concentrada preparada en agua. Algunos de estos medios se suplementaron con cáscaras de chontaduro al 5 % p/v. El crecimiento se mantuvo durante 18 días con agitación a 180 rpm y una temperatura de 29°C.

Estos ensayos se realizaron con la finalidad de corroborar si las cepas adquiridas podían crecer en una concentración de vinaza al 100% v/v y observar su capacidad de decoloración de la vinaza. Así mismo, quería observarse el efecto de las cáscaras de chontaduro en el crecimiento del hongo.

4.5. Preparación de los residuos agroindustriales

4.5.1. Preparación de la vinaza

La vinaza se diluyó en un factor 1:10 y se preparó en solución de buffer fosfato pH 4.5 1M. Esta dilución constituye lo que en este trabajo se denomina vinaza “stock” y se realiza porque del proceso fermentativo industrial se obtiene la vinaza en esa dilución, pero posteriormente, y por efectos de conservación, la vinaza se concentra diez veces para evitar su degradación biológica o fisicoquímica. Después de este paso, la vinaza se centrifugó tres veces durante 15 min y a 4000 rpm para retirar en cada repetición el pellet generado y para trabajar solamente con el sobrenadante obtenido. Este paso se realiza para retirar la mayor cantidad posible de sólidos presentes en la vinaza los cuales precipitan y forman el pellet.

Posteriormente, al sobrenadante de vinaza se le adicionó hidróxido de calcio [Ca(OH)₂] en una concentración de 3 g/L y se dejó en agitación constante durante una hora. Después de esto, la vinaza se trasvasó para retirar el precipitado generado y se centrifugó nuevamente una sola vez a 4000 rpm durante 15 min. Este procedimiento se realizó con el fin de retirar posibles moléculas iónicas insolubles presentes en la vinaza con capacidad inhibitoria del crecimiento celular. Esto se logra porque estas moléculas forman sales insolubles cuando se adiciona el Ca(OH)₂ y precipitan. Por último, se midió el pH y se ajustó en el rango de 5.0 a 6.0.

Finalmente, y después de todo lo anterior, la vinaza se almacenó 1 día a 8 °C para su posterior uso en la preparación del medio de cultivo.

4.5.2. Preparación de las cáscaras de chontaduro

Las cáscaras de chontaduro se secaron en un horno a 80°C durante 7 horas. Posteriormente, se calculó la cantidad de cáscaras de chontaduro correspondiente

al 5% p/v para cada medio de cultivo. Después, se pesó por separado la cantidad respectiva en vasos de precipitado de vidrio y se calentó durante 10 min a 50°C con un volumen de buffer fosfato pH 4.5 1M suficiente para cubrir las cáscaras.

Luego, el contenido se dejó enfriar durante 5 min y se licuó por separado en un vaso de licuadora pequeño que trituró y disminuyó el tamaño de las cáscaras. Posteriormente, se filtró por separado el “licuado” de cáscaras con un filtro de colar café para retirar los sólidos y dejar sólo la fase líquida. Finalmente, se utilizó el filtrado para mezclarlo con la vinaza.

4.6. Pre-acondicionamiento y preparación del inóculo del hongo

Las cepas de los hongos se cultivaron en placas Petri con medios sólidos constituidos por vinaza y cáscaras de chontaduro con el objetivo de adaptarlas a la matriz de vinaza.

A partir de los hongos crecidos en medio PDA se generaron los inóculos iniciales que se cultivaron en medio con vinaza al 10% v/v. Después que se cultivaron los hongos en el medio de vinaza al 10% v/v se preparó a partir de estas últimas placas otro inóculo que se cultivó en medio con vinaza al 50% v/v. Finalmente, los hongos se cultivaron en medio con vinaza al 100% v/v con los inóculos que provinieron de las placas con vinaza al 50% v/v. Así mismo, todos los medios (50%, 75% y 100% v/v) de vinaza que se utilizaron estuvieron suplementados con cáscaras de chontaduro al 5% p/v. De esta manera se adaptó progresivamente la cepa de los hongos a una concentración de vinaza del 100%.

De las placas cultivadas en vinaza al 100% v/v se preparó una suspensión de esporas la cual se cultivó en un medio líquido de vinaza al 3% v/v y cáscaras de chontaduro al 4% p/v durante 6 días. Este último cultivo se denominó el cultivo iniciador y se mantuvo a 29°C con agitación constante a 80 rpm. Para ello, se cultivaron en 18 Erlenmeyers de 100 mL los inóculos (9 para *P. ostreatus* y 9 para *P. sajor caju*) que se adicionaron a los 18 Erlenmeyers de 250 mL en donde se realizó el ensayo final.

Para que todos los medios quedaran inoculados con una cantidad similar de esporas/mL se hicieron conteos en cámara de Neubauer de ambas suspensiones de esporas (una de *P. ostreatus* y la otra de *P. sajor caju*). A partir de los valores obtenidos se calculó el volumen necesario para que las esporas quedaran en el medio con el mismo factor exponencial de esporas/mL. Finalmente, todos los 18 Erlenmeyers se inocularon con 500 µL de la suspensión correspondiente y quedaron en un factor de 10⁴ esporas/mL.

4.7. Preparación medio de cultivo hongos y condiciones de cultivo

Se prepararon tres medios de cultivo líquidos con cáscaras de chontaduro al 5% p/v y con vinaza al 50 %v/v, 75% v/v y 100 %v/v. Para ello, fue necesario mezclar la vinaza con las cáscaras de chontaduro. Después de mezclar se midió el pH y se ajustó a 5.5 en todos los medios con hidróxido de sodio 8M. Finalmente, los tres medios de cultivo (50%, 75% y 100% v/v) se esterilizaron y se sirvieron en cabina de flujo laminar en 21 erlenmeyers de 250 mL. En cada erlenmeyer se sirvieron 85 mL de medio. En total se obtuvieron 7 erlenmeyers con vinaza al 50% v/v, 7 con vinaza al 75% v/v y 7 con vinaza al 100% v/v.

Posteriormente, a 18 de esos erlenmeyers se adicionaron los inóculos de *P. ostreatus* y *P. sajor caju* cultivados en los erlenmeyers de 100 mL y quedaron 3 medios como controles negativos (uno para cada concentración de vinaza). Con la adición de los inóculos el volumen final contenido en los erlenmeyers de 250 mL fue 100 mL (85 mL de medio + 15 mL de inóculo). De esta manera, se inocularon 9 medios con *P. ostreatus* y los otros 9 con *P. sajor caju* y se obtienen 6 tratamientos (véase Figura 8).

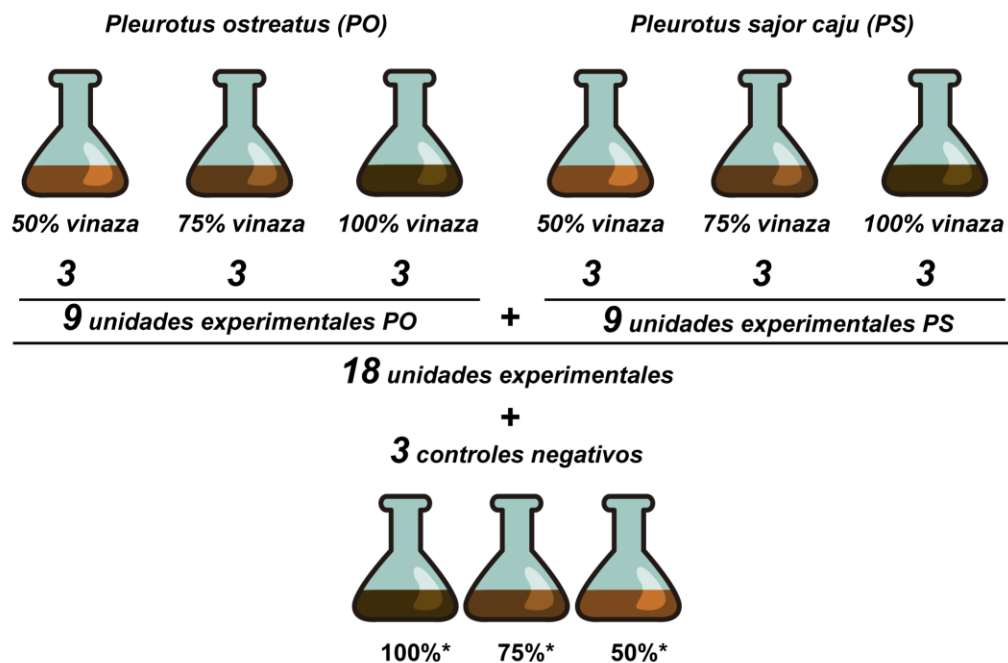


Figura 8. Representación de la totalidad de unidades experimentales y diseño experimental con 6 tratamientos

Finalmente, estos cultivos se mantuvieron 18 días a 29°C con agitación constante a 80 rpm. Durante este tiempo se hizo un seguimiento y ajuste al pH, así como se implementó un control gravimétrico. Del mismo modo, en el día 2 del cultivo se

adicionaron a los 18 medios inoculados 430 μ L de solución de Sulfato de Cobre 700 mM como mecanismo de inducción de la maquinaria enzimática característica de los hongos de la podredumbre blanca.

4.8. Pre-acondicionamiento y preparación del inóculo de la microalga

De las botellas con microalga cultivada en medio CHU 13 líquido se obtuvo la biomasa que se adaptó a la matriz de vinaza para su posterior utilización en los ensayos finales. Para ello, se preparó un medio de cultivo cuya composición se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2. *Composición medio de acondicionamiento de Chlorella vulgaris*

| COMPONENTE | PROPORCIÓN (%) | CANTIDAD |
|------------------------|----------------|---------------|
| Macronutrientes | 2.0 | 3.4 mL |
| Micronutrientes | 2.0 | 3.4 mL |
| Vinaza | 2.0 | 3.4 mL |
| Tween | 2.0 | 3.4 mL |
| Antibacterial orgánico | 0.1 | 170.0 μ L |
| Antibiótico | 0.1 | 170.0 μ L |
| Agua estéril Tipo 1 | 91.8 | 156.06 mL |

Al momento de preparar el medio de cultivo todos los componentes estaban estériles. El medio se preparó en cabina de flujo laminar y se sirvió en dos botellas estériles (170 mL en cada una). A cada botella se adicionaron 5 mL de biomasa concentrada a un factor de 10^6 células/mL y se ajustó el pH a 8.0 con hidróxido de sodio 2M y ácido cítrico 2M. Finalmente, los cultivos se mantuvieron 5 días con aireación constante y con un seguimiento y ajuste del pH.

4.9. Preparación medio de cultivo microalga y condiciones de cultivo

Se prepararon dos medios de cultivo líquidos (250 mL cada uno) que diferenciaron en la cantidad de vinaza e hidrolizado de cáscaras de chontaduro formulados. La composición de ambos medios se presenta en la Tabla 3. Todos los componentes estaban estériles, se mezclaron en cabina de flujo laminar y se sirvieron en 1 bioreactor cada uno (botella de vidrio con sistema de aireación). El pH se ajustó en ambos medios con solución de hidróxido de sodio 2M y ácido cítrico 1M y quedó en 7.9 para el medio 1 (vinaza al 50% v/v) y 8.0 para el medio 2 (vinaza al 75% v/v).

Tabla 3. Composición medios de cultivo ensayos con *C. vulgaris*

| COMPONENTE | PROPORCIÓN (%) | |
|------------------------|----------------|-------------|
| | Medio 1 | Medio 2 |
| Macronutrientes* | 2.0 | 2.0 |
| Micronutrientes* | 2.0 | 2.0 |
| Vinaza | 50.0 | 75.0 |
| Tween | 2.0 | 2.0 |
| Antibacterial orgánico | 0.1 | 0.1 |
| Antibiótico | 0.1 | 0.1 |
| Hidrolizado | 43.8 | 18.8 |

*Su composición se encuentra en el Anexo 1

El hidrolizado se preparó con cáscaras de chontaduro al 5% p/v en solución de buffer fosfato pH 4.5 1M con las cepas de los hongos y se cultivó durante 15 días. Posteriormente, y cuando finalizó el cultivo, el micelio del hongo que se formó se retiró a través de filtración y se descartó. Finalmente, el hidrolizado sin micelio se esterilizó y se decantó en cabina de flujo laminar para retirar el almidón que precipitó después de la esterilización.

Después de preparar los medios, a cada uno se adicionaron 5.2 mL de la biomasa obtenida del cultivo de pre-acondicionamiento. Para ello, la biomasa se concentró en solución salina 0.9% estéril a un factor de 10^6 células/ mL (según el procedimiento mencionado en el ítem 4.3 *Propagación y mantenimiento de las cepas*). Finalmente, ambos cultivos se mantuvieron 18 días con aireación constante y con un seguimiento y ajuste del pH y del peso (control gravimétrico).

4.10. Análisis relacionados con el cultivo de los hongos

Durante el cultivo de los hongos en los medios con cáscaras de chontaduro al 5% p/v y vinaza al 50% v/v, 75 %v/v y 100% v/v se midió la concentración de azúcares en los días 0, 5, 10 y 15. Para ello, se implementaron dos técnicas analíticas: 1) espectrofotometría con un método enzimático y 2) cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La medición espectrofotométrica se realizó con el kit enzimático de Megazyme *Maltose, Sucrose and D-glucose* que mide indirectamente los azúcares a través de la absorción del NADPH a 340 nm (el fundamento teórico se explica al final del ítem 2.2.3.1 *Azúcares por espectrofotometría*). La medición se realizó según el procedimiento adjunto en el kit (Megazyme, 2015).

Por otro lado, la medición de los azúcares por cromatografía líquida se realizó en los laboratorios de análisis instrumental de compañía Levapan S.A. según el método

996.04 AOAC modificado. Las características y parámetros del análisis que se implementaron se listan a continuación:

- Sistema de cromatografía líquida Isocrático Waters
- Detector Waters de índice de refracción 2410
- Automuestreador Waters 717 plus
- Bomba Waters 515
- Columna Waters Sugar Pak I 6.5x300 mm
- Insertos Waters Sugar Pak II
- Fase móvil: Solución EDTA 0.0001 M
- Condiciones operación: Flujo 0.5 ml/min; Temperatura columna: 75°C
- Temperatura automuestreador 18°C

Para medir los azúcares por ambas técnicas en los días 5, 10 y 15 se tomó 1 mL de medio de cada unidad experimental y se adicionó en un tubo Eppendorf. El día 0 se tomó 1 mL únicamente a los medios antes de repartirse en los Erlenmeyers y se midió sólo por espectrofotometría. Luego, se diluyó cada muestra en un factor de 1:100. En el caso del método enzimático se utilizaron las muestras diluidas y en el caso de la cromatografía se utilizaron sin diluir. Adicionalmente, en el caso del método enzimático se hizo una corrección a los valores de absorbancia medidos debido a la interferencia de la matriz de vinaza.

De igual manera, cuando finalizó el cultivo se determinó el carbono orgánico total (servicio que se contrató con el laboratorio de análisis químico *AGRILAB*) y se intentó cuantificar la biomasa obtenida del hongo a través del método de peso seco.

4.11. Análisis relacionados con el cultivo de la microalga

Durante el tiempo de cultivo de la microalga se realizó un seguimiento de su crecimiento según el método desarrollado por Jiménez-Tafur (2017). Para ello, se muestreó diariamente los 5 primeros días de cultivo y posteriormente cada 2 a 3 días hasta finalizar el cultivo a los 18 días.

Posteriormente, y al finalizar el cultivo, se cuantificó la biomasa obtenida de la microalga, así como se determinó el contenido de carbono orgánico total (este último análisis lo realizó el laboratorio de servicios analíticos del *CIAT*).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El hecho que la vinaza carece de azúcares simples asimilables por la microalga *Chlorella vulgaris* fue el punto de partida para proponer suplementarla con una fuente de azúcares asimilables. Debido a esto, se propuso utilizar las cáscaras de

chontaduro (específicamente el almidón que las compone) como materia prima para la obtención de esos azúcares, a través de la hidrólisis enzimática mediada por los hongos del género *Pleurotus spp.* De esta manera, inicialmente se planeó un proceso de dos etapas que involucrara la generación de los azúcares en la vinaza *in situ* y luego, el crecimiento de la microalga en el hidrolizado obtenido del cultivo de los hongos. Todo lo anterior, partiendo del supuesto que los hongos hidrolizarían el almidón y generarían azúcares, que después serían metabolizados y asimilados por la microalga.

5.1. Ensayos preliminares

De los ensayos preliminares con los hongos se concluyó que las cepas adquiridas de *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus sajor caju* tuvieron la capacidad de crecer en los medios líquidos de vinaza al 100% v/v y, por lo tanto, el diseño experimental planteado sería factible. Del mismo modo, se determinó la necesidad de preparar el medio de cultivo en una solución amortiguadora del pH (buffer), ya que en agua el pH se tuvo que ajustar todos los días debido a un cambio abrupto en el mismo como consecuencia del metabolismo de los hongos. De esta manera, se decidió trabajar con solución de buffer fosfato pH 4.5 1M.

Así mismo, se observó que ambos hongos tuvieron la capacidad de decolorar el medio; sin embargo, se percibió que la cepa de *P. ostreatus* tuvo una mayor capacidad para decolorar el medio con respecto a *P. sajor caju* ya que la tonalidad del color del medio donde creció *P. ostreatus* se tornó más clara (véase Figura 9).

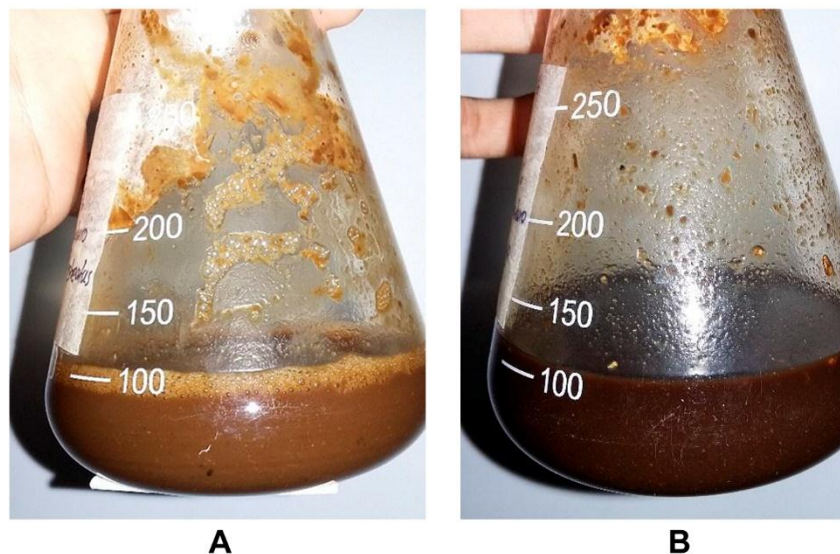


Figura 9. Coloración del medio después del crecimiento de los hongos. (A) *P. ostreatus* y (B) *P. sajor caju*

5.2. Cultivo de los hongos

5.2.1. Determinación de azúcares

Inicialmente, se propuso que la cuantificación de los azúcares formados en el hidrolizado se mediría por espectrofotometría a través de un método enzimático. Debido a esto se implementó el kit enzimático de Megazyme *Maltose, Sucrose and D-glucose* que determina glucosa, maltosa y sacarosa.

Se esperaba cuantificar en el quinto día de cultivo principalmente glucosa y en una mínima cantidad maltosa y sacarosa. Cuando se revisaron los resultados de las mediciones espectrofotométricas se notó que este método estaba presentando inconsistencias frente a los resultados reales esperados (principalmente por reportar presencia de glucosa y maltosa desde el día 0 en los controles negativos) y a la repetibilidad entre los resultados reportados para las repeticiones de un mismo tratamiento. Los resultados obtenidos con el kit enzimático se reportan en el Anexo 3.

Por lo anterior, se optó como alternativa cuantificar los azúcares por cromatografía líquida. Por ello, se analizaron algunas de las muestras y se corroboró que el kit generó datos erróneos sobre la concentración de azúcares residuales (no metabolizados) en los hidrolizados. Esto presumiblemente puede explicarse por la interferencia colorimétrica de la matriz de vinaza que influyó en los valores de absorbancia medidos a pesar que se aplicaron los respectivos blancos.

Analizando los resultados obtenidos de la cromatografía se comprobó que no había azúcares residuales en las muestras del quinto día de cultivo. Así mismo, se observó que en algunas de las muestras del décimo día de cultivo apareció un pico pequeño en los cromatogramas cercano al tiempo de retención de la glucosa (véase Figura 10). Por otro lado, en todos los cromatogramas aparece un pico grande entre 5.00 y 7.00 min que corresponde a polímeros de dextrinas que son retenidos en la columna.

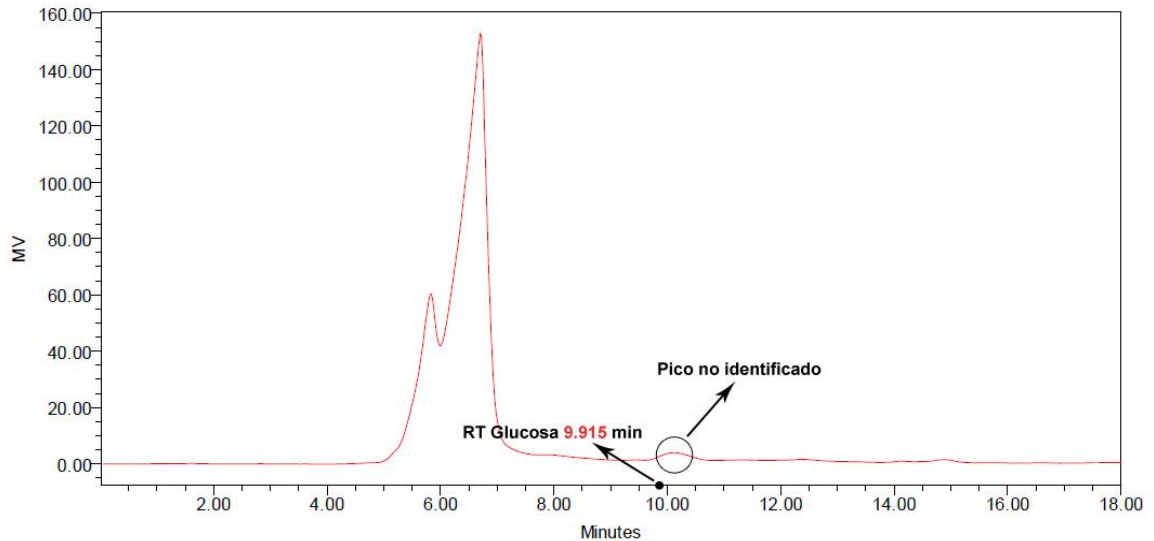


Figura 10. *Cromatograma de una de las muestras del décimo día de cultivo con un pico de glucosa*

Estos hallazgos se pueden explicar desde un punto de vista del método analítico y desde un punto de vista del microorganismo.

Desde el punto de vista analítico y del método se supo que la curva de calibración se hizo con estándares de los azúcares en agua. Por lo tanto, el tiempo de retención se estableció en base a una matriz de agua. Debido a que la matriz de agua es diferente a la matriz de vinaza se concluyó que los tiempos de retención de los azúcares estarían desplazados por el efecto de otros compuestos presentes en la matriz. Por lo tanto, se puede afirmar que el pico pequeño es glucosa. Aunque ésta no fue cuantificada automáticamente por el equipo.

Desde el punto de vista del microorganismo la evidencia de ausencia de azúcares en los medios sugiere que el hongo fue capaz de hidrolizar enzimáticamente el almidón como parte de su actividad metabólica y que en los momentos de muestreo aún permanecía en un estado de consumo de azúcares simples. Por ende, se puede suponer correctamente que aún permanecía en una fase exponencial de crecimiento. De esta manera, las muestras que se tomaron el quinto día de cultivo reflejan esta fase de crecimiento, caracterizada por una actividad metabólica elevada y un alto consumo de nutrientes, como la glucosa.

Por otro lado, las muestras tomadas el décimo día de cultivo reflejan una incipiente fase estacionaria en algunos de los medios. Por ello fue que se observó el pico de glucosa residual en algunos cromatogramas. Sin embargo, puede ser que el hongo nunca alcanzó plenamente la fase estacionaria de crecimiento en la mayoría de los medios y finalmente metabolizó toda la glucosa disponible en el medio para generar biomasa y CO_2 .

La afirmación que el hongo quedó en la fase exponencial se puede soportar en el hecho que durante todo el cultivo no se observó la formación de una capa gruesa y compacta de micelio sobre la superficie del medio líquido (véase Figura 11), ya que de otros ensayos realizados en el laboratorio se aprendió que cuando se observa esa morfología del micelio (que cubre toda la superficie del medio con una capa gruesa) a nivel macroscópico el hongo no crece más (porque está en la fase estacionaria y su actividad metabólica es menor en comparación con la de la fase exponencial). En la imagen se observa que la superficie del medio no está cubierta completamente por el micelio de los hongos (de color blanco).

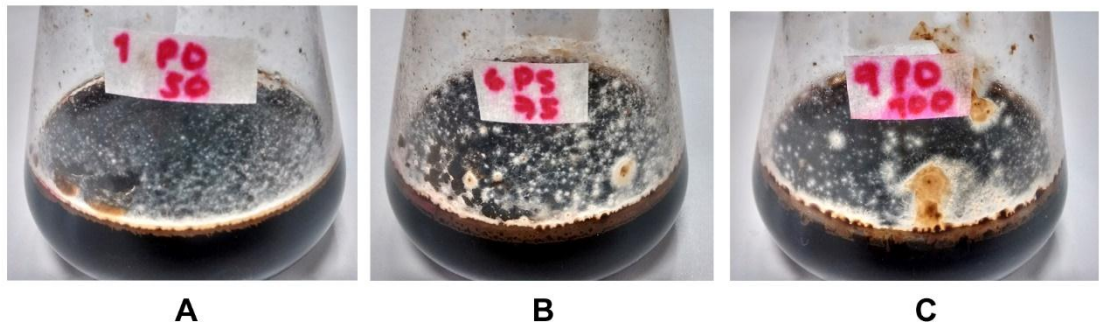


Figura 11. *Micelio de los hongos en algunos de los medios al finalizar el cultivo. (A) PO en vinaza al 50% v/v; (B) PS en vinaza al 75% v/v; y (C) PO en vinaza al 100 % v/v*

Por otra parte, y a continuación, se discute sobre un hallazgo interesante y completamente inesperado con los resultados de las muestras tomadas a partir del décimo día de cultivo.

Cuando se analizaron los cromatogramas de las muestras del décimo día de cultivo se observó que en todas las muestras inoculadas con hongo aparece un pico no identificado cercano al tiempo de retención correspondiente a la elución del etanol (véase Figura 12). Al observar este pico, y teniendo en cuenta que la matriz de vinaza desplazó los tiempos de retención, se concluyó que los hongos produjeron metabólicamente etanol. Así mismo, este hallazgo también soporta el hecho que no haya glucosa residual en el medio porque el hongo la metaboliza a etanol.

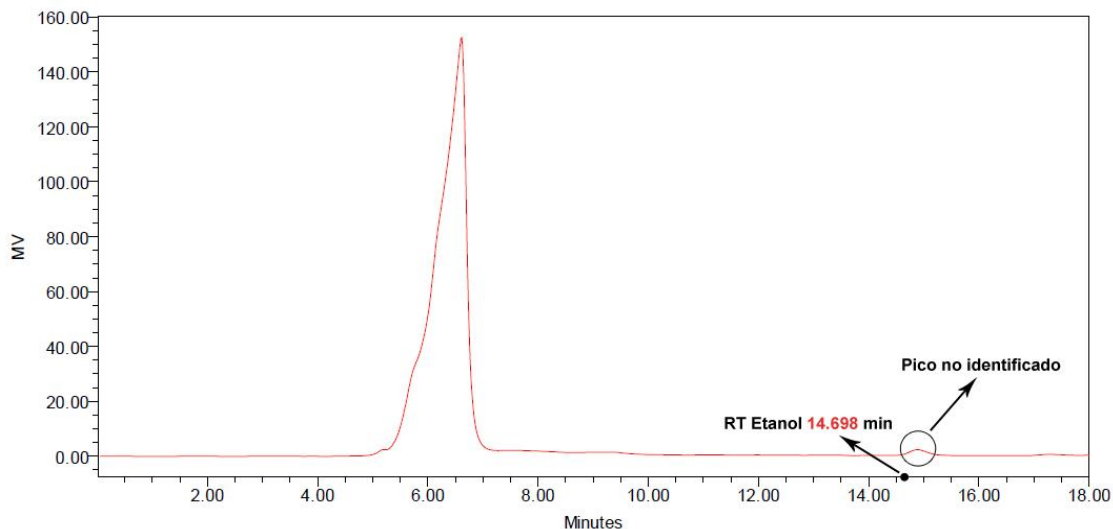


Figura 12. Cromatograma de una de las muestras del décimo día de cultivo con un pico de etanol

El hecho que los hongos superiores, como los del género *Pleurotus*, conviertan azúcares a etanol es un proceso muy poco estudiado y poco común; sin embargo, no es descabellado pensar que en determinadas condiciones estos hongos modifican su maquinaria enzimática para producir etanol a través de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) [EC 1.1.1.1]. En realidad, un estudio publicado por Okamura-Matsui et al. (2003) comprueba que *Pleurotus ostreatus* produce esta enzima, pero que tiene una baja actividad.

Por todo lo anterior, la presencia de etanol en algunos de los medios sugiere que el hongo sufrió una inducción enzimática para la producción de la ADH y, bajo el supuesto que el hongo no estuvo limitado por O₂, se sugiere que algún componente de la vinaza es el responsable de esta inducción.

Para verificar si la vinaza fue la responsable de esta inducción enzimática y comprobar si el hongo bajo otras condiciones produce etanol, se hizo un ensayo donde se cultivaron los hongos durante 15 días en medios conformados sólo por cáscaras de chontaduro al 5% p/v y después se midió por HPLC la cantidad de azúcares y etanol presentes en el hidrolizado. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Azúcares en los hidrolizados después del cultivo de los hongos

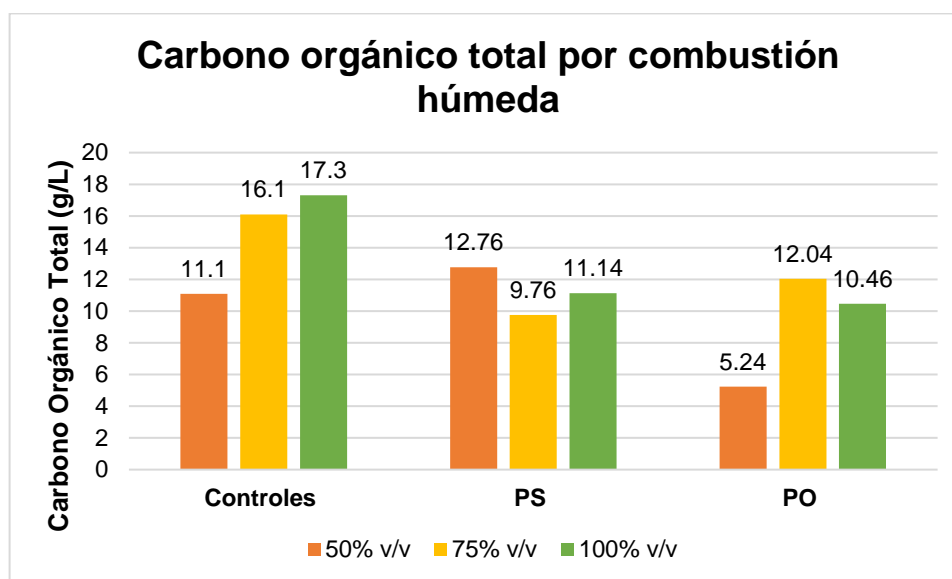
| MUESTRA | RESULTADO |
|--------------------|-------------------|
| Hidrolizado PS (1) | 0.41 g/L glucosa |
| Hidrolizado PO (2) | 0.75 g/L glucosa |
| Hidrolizado PO (1) | 0.09 g/L sacarosa |
| Hidrolizado PS (2) | 0.27 g/L glucosa |

*(1) y (2) hacen referencia a que el cultivo se hizo por duplicado para cada hongo

Los resultados obtenidos en ese ensayo sugieren que los hongos no consumen todos los azúcares que hidrolizan y confirman que no hubo formación de etanol. De esta manera, los resultados soportan la hipótesis que la vinaza indujo en los hongos una desviación de su metabolismo normal y los llevó a producir etanol a través de la ADH. Por otro lado, estos hidrolizados posteriormente se mezclaron y se utilizaron por su contenido de azúcares para el ensayo con la microalga.

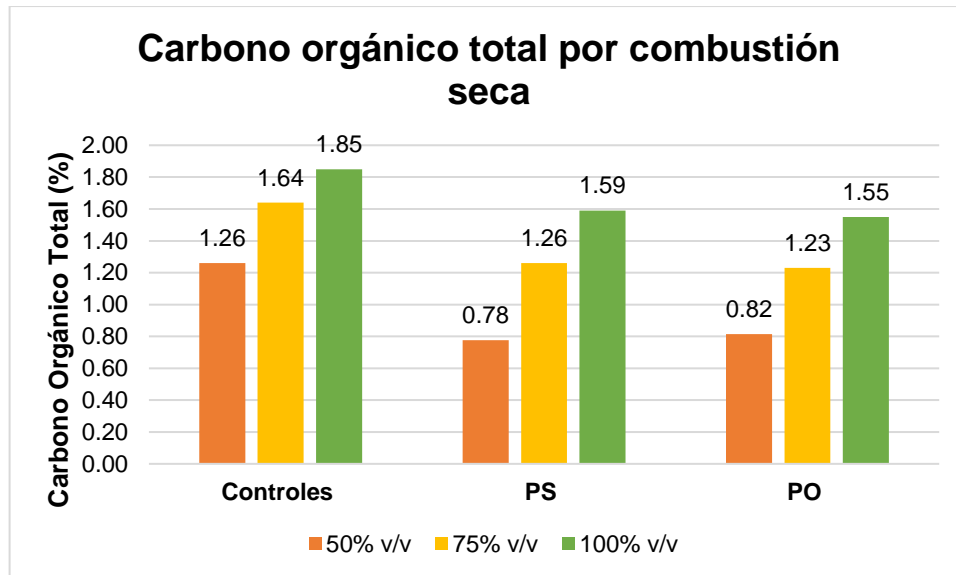
5.2.2. Determinación del COT

Después que se cultivaron los hongos se midió la cantidad de carbono orgánico oxidable total (COT) por el método de combustión húmeda a algunos de los hidrolizados y a los controles negativos para determinar la diferencia antes y después del cultivo de los hongos. Para ello, los controles negativos se utilizaron como referencia del valor inicial y los hidrolizados como referencia del valor final. Los resultados se presentan en la Gráfica 1.



Gráfica 1. Comparación COT de controles e hidrolizados de PS y PO por combustión húmeda

De otro lado, y para confirmar los resultados anteriores, se volvió a hacer el análisis con otros de los hidrolizados (véase Gráfica 2).



Gráfica 2. Comparación COT de controles e hidrolizados de PS y PO por combustión seca

Para el caso de los controles, los resultados muestran que existe una relación directamente proporcional entre la concentración de vinaza y la cantidad de COT medida. De esta manera, cuando aumenta la concentración de vinaza entonces aumenta la cantidad de COT. Estos resultados son coherentes pues la vinaza tiene una gran carga orgánica y a medida que aumenta su concentración en la composición del medio aumenta la carga orgánica.

Para los primeros resultados, al comparar los valores obtenidos para los hidrolizados se observa que el contenido de COT disminuyó en todos los medios (vinaza al 50%, 75% y 100% v/v) respecto a los controles, exceptuando el medio de vinaza al 50% v/v inoculado con PS en el que este valor aumentó. El resultado del hidrolizado donde el COT aumentó no tiene coherencia respecto los demás, puesto que se esperaba que el valor del COT disminuyera en todos los medios. Por ende, este valor puede atribuirse a un error en el análisis.

Los segundos resultados corroboran que la disminución del COT se debe al consumo de éste por parte de los hongos para su crecimiento. En estos últimos resultados se observa de mejor manera la disminución del COT debida al crecimiento de los hongos.

Con los resultados obtenidos de los análisis se calculó el porcentaje de disminución del COT y se obtuvieron los valores reportados en la Tabla 5.

Tabla 5. Porcentaje de disminución COT en los medios después del cultivo de los hongos

| % vinaza | % disminución COT | | | |
|----------|-------------------|----|-------------------|----|
| | PS | PO | PS | PO |
| 50% v/v | 38 | 35 | -15 | 53 |
| 75% v/v | 23 | 25 | 39 | 25 |
| 100% v/v | 14 | 16 | 36 | 40 |
| | Combustión seca | | Combustión húmeda | |

Con los resultados de la tabla anterior se puede concluir claramente que hubo una disminución del COT en todos los medios, exceptuando el medio de vinaza al 50% v/v inoculado con PS y analizado por combustión húmeda. Adicionalmente, los resultados sugieren que el mayor porcentaje de disminución del COT ocurrió en todos los medios con vinaza al 50% v/v.

Así mismo, los valores obtenidos de la medición por combustión seca sugieren que no hay diferencias significativas del porcentaje de disminución del COT entre las cepas de PS y PO (valor $p > 0.05$). Sin embargo, al comparar los mismos valores entre los medios con diferente porcentaje de vinaza si se observa una variación significativa (valor $p < 0.05$). El análisis de varianza para determinar la diferencia significativa se presenta en el Anexo 2.

Cabe resaltar que aunque no se pudo estimar los valores de biomasa fúngica lograda al final de los cultivos, el porcentaje de disminución de COT puede relacionarse con estos.

Por otro lado, y respecto al método analítico para cuantificar el COT, se observa que existe una variación considerable entre la cuantificación por combustión seca y la cuantificación por combustión húmeda. De esta manera, se puede inferir que los resultados del análisis por combustión seca son más consistentes y confiables que los resultados obtenidos por combustión húmeda.

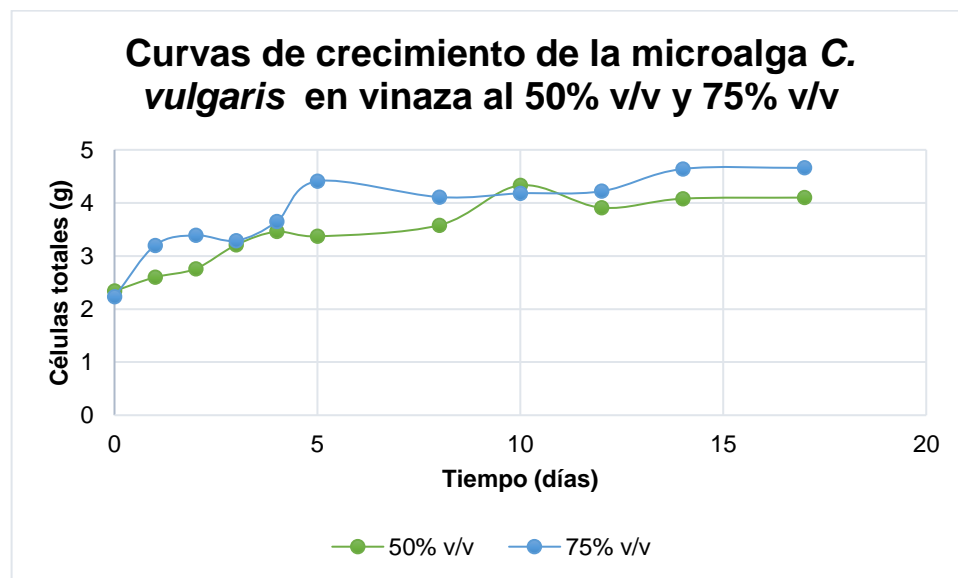
5.2.3. Cuantificación de la biomasa fúngica

Se intentó cuantificar la biomasa de los hongos generada después del cultivo, pero no fue posible debido a la interferencia de almidón precipitado en el medio. Éste interfirió de dos maneras significativas: 1) taponó los filtros durante la separación (de la biomasa y el medio) y 2) tenía un color similar a la biomasa del hongo de manera que no era sencillo distinguir entre biomasa o almidón.

5.3. Cultivo de la microalga

5.3.1. Seguimiento del crecimiento celular

A continuación, se presentan las dos curvas de crecimiento obtenidas del cultivo heterotrófico de la microalga en los medios de vinaza al 50% v/v y vinaza al 75% v/v suplementados con hidrolizado de cáscaras de chontaduro (véase Gráfica 3). En las gráficas se observa la cantidad total de células en gramos versus el tiempo. El valor de células totales se calcula a partir de los resultados de absorbancia obtenidos por el método espectrofotométrico desarrollado por Jiménez-Tafur (2017).



Gráfica 3. Curvas de crecimiento de la microalga en los medios de vinaza al 50% v/v y vinaza al 75% v/v suplementados con hidrolizado de cáscaras de chontaduro

Las curvas sugieren que la microalga tuvo un crecimiento diaúxico, característico de un cultivo cuando en el medio hay más de un sustrato como fuente de carbono. Este hallazgo fue inesperado; sin embargo, se soporta en el hecho que la vinaza (primera fuente de carbono) se suplementó con hidrolizado de cáscaras de chontaduro (segunda fuente de carbono).

Por otro lado, estas curvas sugieren que el medio de vinaza al 75% v/v presentó el mejor desempeño por generar una mayor cantidad de células totales; sin embargo, se confirmó que la cantidad de biomasa generada en este medio fue menor a la del medio de vinaza al 50% v/v. Por lo tanto, esta afirmación quedó invalidada.

De otra parte, se calculó la productividad en cada cultivo con la ecuación 1. Esta ecuación tiene en cuenta la cantidad máxima de células totales obtenida durante el tiempo de cultivo (C_M), la cantidad de células totales en el tiempo inicial (C_0), el

tiempo en que se obtuvo la mayor cantidad de células totales (t_M) y la masa total del medio en el día que se obtuvo la mayor cantidad células totales (M_t).

$$P \text{ (Productividad)} = (C_M \text{ (g)} - C_0 \text{ (g)}) / (M_t \text{ (g)} \times t_M \text{ (día)}) \quad (1)$$

De esta manera se obtuvo una productividad de 0.74 (g de biomasa / g de medio \times día) para el medio de vinaza al 50% v/v, y de 0.54 (g de biomasa / g de medio \times día) para el medio con vinaza al 75% v/v. Estos resultados sugieren que en términos de productividad el medio de vinaza al 50% v/v es el mejor. Así mismo, se encontró que estos valores son mayores que los alcanzados por Jiménez-Tafur (2017) en sus cultivos heterotróficos de *Chlorella vulgaris* empleando vinaza no suplementada en porcentajes similares.

5.3.2. Cuantificación de la biomasa

Después que finalizó el cultivo de la microalga se obtuvo su biomasa centrifugada; sin embargo, ésta estaba mezclada con el almidón que precipitó y con los lodos de la vinaza. Esta situación dificultó la cuantificación de la biomasa; sin embargo, después de filtrar y centrifugar la biomasa en repetidas ocasiones se logró separarla de los lodos de la vinaza. El único problema remanente era el almidón precipitado que no se separaba. Mientras se buscaba una manera de separar la biomasa del almidón, ésta se suspendió en solución salina 0.9 % y se almacenó a 8°C de un día para otro.

Al día siguiente, se observó que parte del almidón estaba precipitado. Fue a partir de ese hallazgo que se tomó la decisión de suspender la biomasa en agua fría, mezclarla y decantarla. Realizando este procedimiento se observó que el almidón suspendido comenzó a precipitar y a separarse de la biomasa (véase Figura 13). Esto fue posible ya que el almidón es insoluble en agua fría y precipita. Finalmente, se logró separar la mayoría del almidón de la biomasa y ésta se pudo cuantificar gravimétricamente.

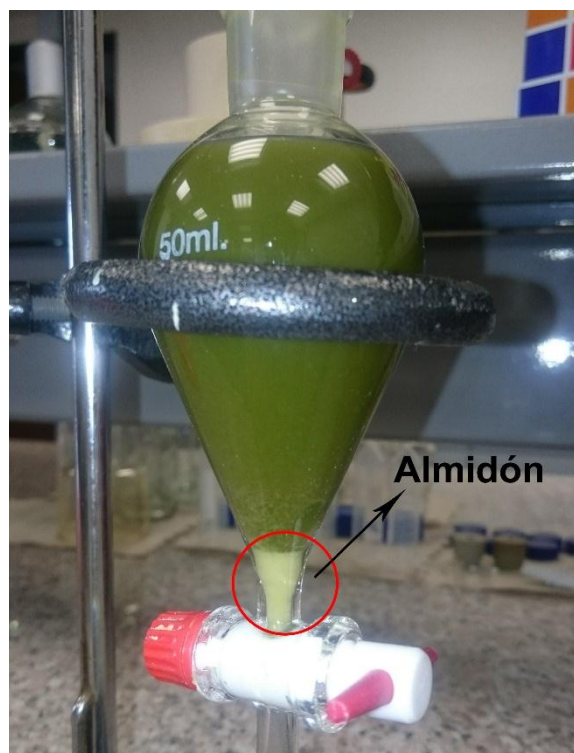
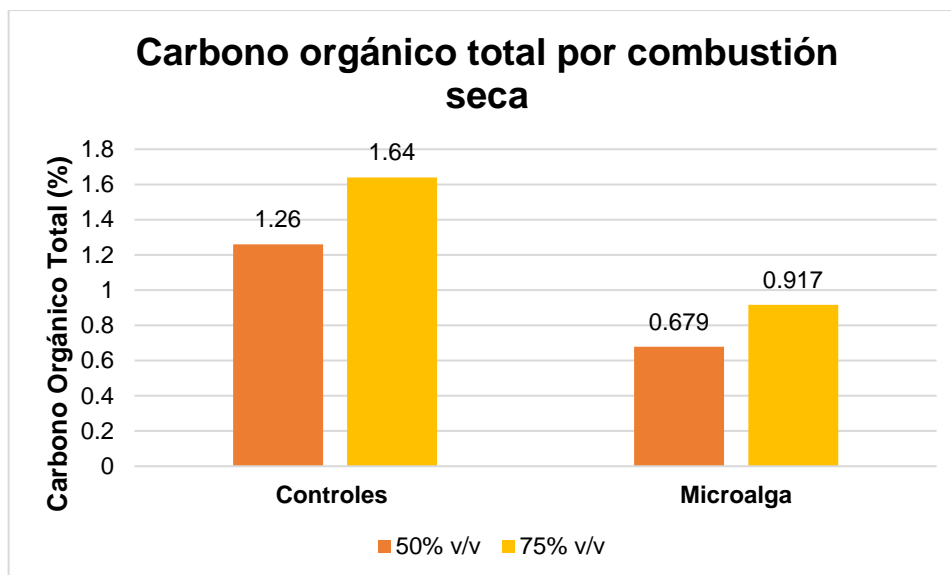


Figura 13. Separación del almidón y la biomasa de la microalga

Después que la biomasa se separó del almidón, se centrifugó, se re-suspendió en solución salina al 0.9% y se filtró. Luego, los filtros (previamente pesados) con biomasa se secaron a 60°C durante 4 horas y se pesaron nuevamente. Finalmente, se calculó un valor de 1260 mg de biomasa para el medio con vinaza al 50% v/v y 250 mg de biomasa para el medio con vinaza al 75% v/v. Estos resultados son equivalentes a decir que se obtuvieron 5.04 g/L y 1.0 g/L de biomasa respectivamente (estos valores se obtienen de la división del peso en el volumen del medio utilizado).

5.3.3. Determinación de COT

Cuando se finalizó el cultivo de la microalga se analizó el carbono orgánico oxidable total al igual que con los hidrolizados de los hongos. Esto con el objetivo de observar el efecto del cultivo de las microalgas en los medios. Los controles de vinaza al 50% v/v y 75% v/v representan el estado del medio antes del cultivo de las microalgas. Los resultados se presentan en la Gráfica 4.



Gráfica 4. Comparación COT en los medios donde se cultivó la microalga

Nuevamente se observó, como en el caso de los hongos, que hubo una disminución del COT en todos los medios. Del mismo modo, se observó que la cantidad de COT es proporcional a la cantidad de vinaza formulada en el medio. Con estos resultados se calculó el porcentaje de disminución del COT (véase Tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje de disminución COT en los medios después del cultivo de la microalga

| % vinaza | % disminución COT |
|----------|-------------------|
| | Microalga |
| 50% v/v | 46 |
| 75% v/v | 44 |

Los resultados sugieren posiblemente que no hubo diferencia significativa entre estos dos tratamientos. Sin embargo, los valores de peso seco de biomasa alcanzados al final de cultivo fueron distintos. Esto en principio no cuadra en términos de balances de materia, salvo que se haya presentado la formación de compuestos carbonados diferentes de biomasa y CO₂.

5.4. Impacto y aplicación del proyecto

Los resultados del análisis de la disminución del COT corroboraron que el crecimiento de los microorganismos en los medios produjo una reducción en la cantidad de carbono orgánico. De esta manera, este parámetro permitió tener una estimación del aprovechamiento de los medios de cultivo por parte de los microorganismos, al mismo tiempo que generó una estimación indirecta de la reducción de la materia orgánica (indirecta porque la materia orgánica también tiene un alto contenido de nitrógeno que no fue medido).

En términos más generales, lo anterior sugiere que la utilización de la vinaza (suplementada con hidrolizado de cáscaras de Chontaduro) como medio de cultivo para microorganismos resulta ser una estrategia acertada para mitigar el impacto ambiental que este residuo genera en el ambiente, al mismo tiempo que produce un valor agregado con la biomasa de los microorganismos obtenida, especialmente la biomasa de la microalga (ya que está aprobada para el consumo humano por la FDA).

De esta manera, se sugiere que el proyecto con un enfoque más macro, fuera del laboratorio, tendría un impacto ambiental positivo respecto a la utilización de la vinaza. Del mismo modo, se sugiere que una posible aplicación del mismo se podría ver reflejada en la producción y comercialización de biomasa de la microalga *C. vulgaris* a partir de su cultivo en vinaza suplementada.

Por otro lado, y después de analizar los resultados obtenidos, se sugiere que la estrategia para aumentar la cantidad de vinaza a utilizar en el cultivo heterotrófico de la microalga *Chlorella vulgaris* depende de:

- El grado de adaptación de la microalga a la matriz de vinaza, es decir, a que concentración ha sido previamente cultivada.
- La cantidad y calidad del hidrolizado de cáscaras de Chontaduro empleado en el medio de cultivo para la microalga.
- El pretratamiento realizado a la vinaza utilizada en el medio de cultivo.

6. CONCLUSIONES

Los resultados que se obtuvieron en este trabajo permiten consolidar una propuesta de creación de un medio de cultivo para la microalga *Chlorella vulgaris* a partir de la vinaza y el hidrolizado de cáscaras de chontaduro. Así mismo, los resultados sugieren que a través de la implementación de este proyecto en una escala mayor se puede reducir el impacto ambiental negativo que la vinaza genera en el ambiente.

Se observó que el pretratamiento de la vinaza constituye una estrategia para disminuir el efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular de especies de hongos *Pleurotus*.

Se determinó que mejor es suplementar a la vinaza con un hidrolizado de cáscaras de chontaduro generado externamente con los hongos, que adicionar las cáscaras de chontaduro directamente a la vinaza.

Se observó que la vinaza induce en las dos especies de hongos (*P. ostreatus* y *P. sajor caju*) una modificación de su metabolismo de tal manera que comienzan a producir etanol a partir de glucosa, situación poco común para estos microorganismos.

Se implementó una nueva técnica para separar el almidón de la biomasa de la microalga para que éste no interfiera en mediciones futuras que involucren el uso de biomasa.

7. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar un experimento de confirmación del ensayo del crecimiento heterotrófico de la microalga en los medios de vinaza al 50% v/v y al 75% v/v suplementados con los hidrolizados de cáscaras de chontaduro. Esto debido a que en este ensayo por limitación de hidrolizado no se pudieron hacer réplicas.

Del mismo modo, se recomienda que, para evitar la interferencia del almidón al momento de cuantificar la biomasa, éste se hidrolice a parte de la vinaza y antes de utilizarse se decante y se filtre las veces que sea necesario.

Así mismo, se recomienda que la vinaza se filtre como pretratamiento adicional para evitar la formación de lodos que a futuro interfieren con la obtención de biomasa limpia de la microalga.

De igual modo, se recomienda revisar la cantidad de inóculo de hongo que se podría adicionar a los medios de vinaza para obtener una mayor reducción del COT y, de esta manera, generar un mayor aprovechamiento del medio para generar biomasa (de los hongos y la microalga).

Adicionalmente, se recomienda mantener un stock de las cepas de los hongos y de la microalga que estén adaptados a la matriz de la vinaza.

Finalmente, se recomienda diseñar ensayos que permitan corroborar el efecto inductivo de la vinaza para la producción de etanol en los hongos.

8. REFERENCIAS

1. Aristizábal, J., Moreno, F., & Basto, G. (2007). Estudio de una nueva técnica e implementación de una línea piloto de proceso para la obtención de dextrinas a partir de almidón de yuca. *Revista Ingeniería e Investigación*, 27(2), 26-33.
2. Arjonilla, L., & Gaspar, R. (2015). COD and nitrogen removal from sugarcane vinasse by heterotrophic green algae *Desmodesmus sp.* *Journal of Desalination and Water Treatment*, 57(20), 9465-9473.
3. ASOCAÑA (Asociación de Cultivadores de Caña de Azúcar de Colombia). (2016). Reporte de sostenibilidad del sector azucarero colombiano 2015 – 2016. Recuperado de <http://www.asocana.org/modules/documentos/11995.aspx>.
4. Basanta, R., García, M., Cervantes, J., Mata, H., & Bustos, G. (2007). Sostenibilidad del reciclaje de residuos de la agroindustria azucarera: una revisión. *Revista Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5() 293-305.
5. Bautista, Z., & Durán, M. (1998) Análisis del beneficio y riesgo potenciales de la aplicación al suelo de vinazas crudas y tratadas biológicamente. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 14(1), 13-19.
6. Bermúdez, R., Hoyos, J., Rodríguez, S. (2000). Evaluación de la disminución de la carga contaminante de la vinaza de destilería por tratamiento anaerobio. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 16(),103-107.
7. Cabeza, C. (2010). Mejoramiento de la tasa de producción de biomasa de *Chlorella vulgaris* utilizando ciclos de luz artificial y diferentes fuentes de carbono a escala de laboratorio (*Tesis de pregrado*). Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.
8. Castro, G. (2009). El tratamiento de las vinazas, la recirculación. *Revista Publicaciones e Investigación*, 3(1), 51-67.
9. Chatterjee, B., Ghosh, A., & Das, A. (1992). Starch digestion and adsorption by α -amylase of *Emmericella nidulans* (*Aspergillus nidulans*). *Journal of Applied Bacteriology*, 12(), 208-213.
10. Christofolletti, C., Escher, J., Correia, J., Urbano, J., & Fontanetti, C. (2013). Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. *Waste Management*, 33(12), 2752–2761.
11. Converti, A., Casazza, A., Ortiz, E., Perego, P., & Borghi, M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing*, 48(), 1146-1151.
12. Dávila, J., Machuca, F., & Marrianga, N. (2009). Reducción de demanda bioquímica de oxígeno, carbono orgánico total y sólidos totales en vinazas mediante electro-flotación/oxidación. *Revista Ingeniería e Investigación*, 29(1), 35-38.

13. Díaz, R. M., & Díaz, R. P. (2012). Producción de microalgas *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 usando como sustrato glicerol residual a escala de laboratorio (*Tesis de pregrado*). Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.
14. Eggen, T. (2000). Bioremediation of recalcitrant aromatic organic pollutants with white rot fungi. (*Tesis doctoral*). Agricultural University of Norway, Norway.
15. Ferreira, L., Aguilar, M., Pompeu, G., Guido, T., & Rosim, R. (2010a). Selection of vinasse degrading microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(), 1613-1621.
16. Ferreira, L., Aguilar, M., & Monteiro, R. (2010b). Use of vinasse and sugarcane bagasse for the production of enzymes by lignocellulolytic fungi. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53(5), 1245-1254.
17. Foitzich, A. (2013). Desarrollo y validación de una metodología para determinar azúcares simples en matrices orgánicas mediante HPLC- IR. (*Tesis de pregrado*). Universidad Austral de Chile. Chile.
18. García, A., & Rojas, C. (2006). Posibilidades de uso de la vinaza en la agricultura de acuerdo con su modo de acción en los suelos. *Tecnicaña*, 9(17), 3-13.
19. Godoy, S., Pencue, L., Ruíz, M., & Montilla, D. (2007). Clasificación automática del Chontaduro (*Bactris gasipaes*) para su aplicación en conserva, mermelada y harinas. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, Universidad del Cauca, 5(2), 137-146.
20. Guerreiro, L., Rodrigues, C., Duda, R., de Oliveira, R., Boaventura, R., & Madeira, L. (2016). Treatment of sugarcane vinasse by combination of coagulation/flocculation and Fenton's oxidation. *Journal of Environmental Management*, 181(), 237-248.
21. Guillén, G., Márquez, F., & Sánchez, J. (1998). Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. *Revista Iberoamericana de Micología*, 15(), 302-306.
22. Gutiérrez, R., Moreno, N., & Montoya, D. (2013). Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32(), 1-12.
23. Hernández, L. (2009). El chontaduro, una fuente alimenticia desconocida de alto valor nutricional. Colombia, Valle del Cauca: Agencia Universitaria de Periodismo Científico. Recuperado de https://aupec.univalle.edu.co/informes/2009/julio/chonta_duro.html.
24. Higson, F. (1991). Degradation of xenobiotics by white-rot fungi. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 122(), 111-151.
25. Irisarri, D. (2006). Procedimiento para la obtención de vinazas en polvo, producto obtenido e instalación para la obtención de dichas vinazas en polvo. WO 2006108884 A1.

26. Jiménez-Tafur, J. (2017). Estudio de la producción de biomasa de *Chlorella vulgaris* crecida heterotróficamente sobre vinazas de la caña de azúcar. (Tesis de pregrado). Universidad Icesi. Cali.
27. Korndorfer, G. (2009). Impacto ambiental del uso de la vinaza en la agricultura y su influencia en las características químicas y físicas del suelo. Seminario Internacional de Fertilización y Nutrición de la Caña de Azúcar. Tecnicaña. Cali.
28. Kuhad, R., Singh, A., & Eriksson, K. (1990). Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 57(), 45-125.
29. Kuwahara, M., Glenn, J., Morgan, M., & Gold, M. (1984). Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiology Letters*, 169(), 247-250.
30. Liang, Y., Sarkany, N., & Cui, Y. (2009). Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*, 31(7), 1043-1049.
31. López, E., Baldiris, L., Castillo, J., & Caicedo, L. (2012). Biodegradación de la vinaza de caña de azúcar con cepas de los hongos *Schyzophyllum commune* y *Trichoderma viride*. *Revista Ingenium*, 6(14), 39-46.
32. Luley, C. (2006). Identifying wood decay and wood decay fungi in urban trees. *Arborist News*, 15(2), 12-19.
33. Márquez, L. (2014). Evaluación nutricional de la cáscara de Chontaduro (*Bactris gasipaes*) como alternativa en la alimentación animal (Tesis de pregrado). Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia.
34. Megazyme. (2015). Maltose, Sucrose and D-glucose: Assay Procedure. Recuperado de: https://secure.megazyme.com/files/booklet/k-masug_data.pdf
35. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2011). Anuario estadístico de frutas y hortalizas 2007-2011. Recuperado de <http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/handle/11348/4384>.
36. Montes, C., & Quirasco, M. (2014). ¿Enzimas en los alimentos? Bioquímica de lo comestible. *Revista Universitaria UNAM*, 15(12).
37. Muñoz, D., Pantoja, A., & Cuatin, M. (2014). Aprovechamiento de residuos agroindustriales como biocombustible y biorefinería. *Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 12(2), 10-19.
38. Okamuro-Matsui, T., Tomoda, T., Fukuda, S., & Ohsugi, M. (2003). Discovery of alcohol dehydrogenase from mushrooms and application to alcoholic beverages. *Journal or Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 23(), 133-144.
39. Pires, J. (2015). Chapter 5: Mass Production of Microalgae. *Handbook of Marine Microalgae* (56-57). Elsevier Inc.
40. Quintero, J. (2012). Revisión: Degradación de Plaguicidas Mediante Hongos de la Pudrición Blanca de la Madera. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 64(1), 5867-5882.

41. Quiroz, R., & Folch, J. (2011). Proteínas que remodelan y degradan la pared celular vegetal: perspectivas actuales. *Revista Biotecnología Aplicada*, 28(), 19-204.
42. Ramos, I. (1999). Producción de *Pleurotus ostreatus var florida* sobre residuales de cacao. (Tesis de maestría). Escuela superior Politécnico de Chimborazo. Ecuador.
43. Ray, R. (2002). β -amylases from various fungal strains: a review. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 51(), 85-95.
44. Ray, R., & Chakraverty, R. (1998). Extracellular β -amylase from by *Syncephalastrum racemosum*. *Mycological Research*, 102(), 1563-1567.
45. Robles, V. (2012). Treatment of mezcal vinasses: a review. *Journal of Biotechnology*, 157(4), 524-546.
46. Rodríguez, E., Pickard, M., & Vazquez-Duhalt, R. (1999). Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Current Microbiology*, 38(), 27-31.
47. Rodríguez, S., Bermúdez, R., Serrat, M., & Kourouma, A. (2006). Selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* para la decoloración de efluentes industriales. *Revista Mexicana de Micología*, 23(), 9-15.
48. Rodríguez, S., Fernández, M., Bermúdez R., & Morris, H. (2003). Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus spp*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 20(), 164-169.
49. Ruíz, G. (2006). Obtención y caracterización de un polímero biodegradable a partir del almidón de yuca. *Revista Ingeniería y Ciencia*, 2(4), 5-28.
50. Saval, S. (2012). Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: Pasado, Presente y Futuro. *Revista BioTecnología*, 16(2), 14-46.
51. Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., & Roessler, P. (1998). US Department of Energy's Office of Fuels Development, July 1998. A look Back at the US Department of Energy's Aquatic Species Program – Biodiesel from Algae, Close Out Report TP-580-24190. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory.
52. Skoog, D., West, D., Holler, J., & Crouch, S. (2005). Fundamentos de Química Analítica. 8va Ed. México.
53. Tapie, W. (2015). Evaluación in vitro del tratamiento de la vinaza de caña de azúcar con *Pleurotus ostreatus* en producción animal. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia. Palmira.
54. Tijani, H., Abdullah, N., & Yuzir, A. (2015). Integration of microalgae biomass in biomethanation systems. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 52(), 1610-1622.
55. Tsukagoshi, N., Kobayashi, T., & Kato, M. (2001). Regulation of the amylolytic and (hemi)cellulolytic genes in *aspergilli*. *Journal of General and Applied Microbiology*, 47(), 1-19.

56. U.S. Food and Drug Administration. (2011). RFI's *Chlorella vulgaris* GRAS Self affirmation. Recuperado de <https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticelInventory/ucm277773.pdf>
57. Valencia, J. (2014). Obtención y caracterización de materiales poliméricos a partir de aceite de chontaduro (*Bactris gasipaes*). (Tesis de pregrado). Universidad Icesi. Cali.
58. Vega, C. (2016). Comparación de la producción de metabolitos secundarios bioactivos con dos fuentes de carbono en la fermentación líquida de una especie de *Pleurotus* y su uso potencial en un alimento de tipo funcional. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
59. Velasco, R., Luna, W., Mera, J., & Villada, H. (2008). Producción de dextrinas a partir de almidón nativo de yuca por ruta seca en una agroindustria rural. *Revista Información Tecnológica*, 19(2), 15-22.
60. Widjaja, A., Chien, C., & Ju, Y. (2008). Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 40(), 13-20.
61. Xiong, Y., Wu, V., Lubbe, A., Qin, L., Deng, S., Kennedy, M., Bauer, D., Singan, V., Barry, K., Northen, T., Grigoriev, I., & Glass, N. (2017). A fungal transcription factor essential for starch degradation affects integration of carbon and nitrogen metabolism. *PLOS Genetics*, 13(5). e1006737.

9. ANEXOS

Anexo 1. Composición de Macronutrientes y Micronutrientes

| NUTRIENTES | COMPONENTES |
|-----------------|--|
| Macronutrientes | NaNO ₃ |
| | K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O |
| | MgSO ₄ · 7H ₂ O |
| | CaCl ₂ · 2H ₂ O |
| | C ₆ H ₈ O ₇ |
| | FeCl ₃ |
| Micronutrientes | ZnSO ₄ · 7H ₂ O |
| | H ₃ BO ₄ |
| | MnCl ₂ · 4H ₂ O |
| | CuSO ₄ · 5H ₂ O |
| | Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O |
| | CoCl ₂ · 6H ₂ O |

Anexo 2. Análisis de varianza para determinar la diferencia significativa entre los resultados obtenidos del % de disminución del COT

Se trabajó con un valor $p < 0.05$ para rechazar la hipótesis nula.

La hipótesis nula (**H₀**) para ambos análisis fue que el promedio del % de disminución del COT de todos los grupos es igual y no hay diferencias significativas entre los grupos.

La hipótesis alternativa (**H₁**) fue que al menos el promedio del % de disminución del COT de uno de los grupos es diferente y hay diferencias significativas entre los grupos.

Análisis para comparar el porcentaje de disminución del COT entre las cepas de los hongos PS y PO

| % vinaza | % de disminución COT | |
|----------|----------------------|-------|
| | PS | PO |
| 50% v/v | 38.33 | 35.32 |
| 75% v/v | 23.17 | 25.00 |
| 100% v/v | 14.05 | 16.22 |

| Grupos | Cuenta | Suma | Promedio | Varianza |
|--------|--------|-------|----------|----------|
| PS | 3 | 75.56 | 25.19 | 150.42 |
| PO | 3 | 76.53 | 25.51 | 91.41 |

ANÁLISIS DE VARIANZA

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|-------|--------------|----------------------|
| Entre grupos | 0.16 | 1 | 0.16 | 0.001 | 0.97 | 7.71 |
| Dentro de los grupos | 483.65 | 4 | 120.91 | | | |
| Total | 483.81 | 5 | | | | |

Como valor $p > 0.05$ entonces se acepta la hipótesis nula y se concluye que no hay diferencias significativas entre los grupos.

Análisis para comparar el porcentaje de disminución del COT entre los medios de 50% v/v, 75 % v/v y 100% v/v de vinaza

| Hongo | % disminución COT | | |
|-------|-------------------|---------|----------|
| | 50% v/v | 75% v/v | 100% v/v |
| PS | 38.33 | 23.17 | 14.05 |
| PO | 35.32 | 25.00 | 16.22 |

| Grupos | Cuenta | Suma | Promedio | Varianza |
|----------|--------|-------|----------|----------|
| 50% v/v | 2 | 73.65 | 36.83 | 4.55 |
| 75% v/v | 2 | 48.17 | 24.09 | 1.67 |
| 100% v/v | 2 | 30.27 | 15.14 | 2.34 |

ANÁLISIS DE VARIANZA

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
|---------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|-------|--------------|----------------------|
| Entre grupos | 475.25 | 2 | 237.63 | 83.30 | 0.002 | 9.55 |
| Dentro de los grupos | 8.56 | 3 | 2.85 | | | |
| Total | 483.81 | 5 | | | | |

Como valor $p < 0.05$ entonces se rechaza la hipótesis nula y se concluye que si hay diferencias significativas entre los grupos.

Anexo 3. Resultados obtenidos del kit enzimático para cuantificación de azúcares

[G] g/L es la concentración de glucosa; [S] g/L es la concentración de sacarosa; [M] g/L es la concentración de maltosa. Los números 1,2 y 3 corresponden a vinaza al 50% v/v; 4,5 y 6 corresponden a vinaza al 75% v/v; 7,8 y 9 corresponden a vinaza al 100% v/v.

| MUESTRAS | MEDICIÓN 1 (DÍA 5) | | | MEDICIÓN 2 (DÍA 10) | | |
|----------|--------------------|---------|---------|---------------------|---------|---------|
| | [G] g/L | [S] g/L | [M] g/L | [G] g/L | [S] g/L | [M] g/L |
| Estándar | 0.409 | -0.015 | -0.012 | 0.409 | -0.008 | -0.012 |
| 50 | 0.300 | 0.285 | 0.000 | 0.300 | 0.285 | 0.000 |
| 75 | 0.524 | 0.569 | -0.178 | 0.524 | 0.569 | -0.002 |
| 100 | 0.562 | 0.214 | -0.569 | 0.562 | 0.214 | -0.006 |
| 1PS | 0.337 | -0.142 | 0.036 | 0.337 | -0.142 | 0.036 |
| 2PS | 0.037 | 0.000 | 0.107 | 0.037 | 0.000 | 0.107 |
| 3PS | 0.037 | -0.142 | 0.036 | 0.037 | -0.142 | 0.036 |
| 4PS | 0.562 | -0.142 | 0.356 | 0.749 | -0.285 | -0.463 |
| 5PS | 0.262 | -0.071 | 0.071 | 0.262 | -0.071 | 0.071 |
| 6PS | 0.487 | -0.142 | 0.142 | 0.487 | -0.142 | 0.142 |
| 7PS | 2.023 | -1.352 | 0.676 | 2.023 | -1.352 | 0.676 |
| 8PS | -0.375 | 1.922 | -1.139 | -0.375 | 1.922 | -1.139 |
| 9PS | -0.524 | 3.488 | -0.071 | -0.524 | 3.488 | -0.071 |
| 1PO | 0.112 | -0.071 | 0.036 | 0.112 | -0.071 | 0.036 |
| 2PO | -0.337 | 0.925 | 0.071 | -0.337 | 0.925 | 0.071 |
| 3PO | -0.037 | 0.071 | 0.214 | -0.037 | 0.071 | 0.214 |
| 4PO | 1.611 | -1.281 | 0.641 | 0.524 | -0.498 | 0.783 |
| 5PO | 0.337 | 1.779 | -0.356 | 0.337 | 1.779 | -0.356 |
| 6PO | 4.608 | -7.474 | 0.391 | 0.674 | 0.071 | 0.249 |
| 7PO | 1.798 | 4.698 | -2.634 | 0.974 | -1.210 | 0.783 |
| 8PO | 1.611 | -0.996 | 0.996 | 1.611 | -0.996 | 0.996 |
| 9PO | 1.049 | -0.356 | 0.996 | 1.049 | -0.356 | 0.996 |