



Sánchez Díaz, Macarena

Desarrollo de materiales biodegradables a partir de biomasa integral de hongos filamentosos



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Sánchez Díaz, M. (2026). *Desarrollo de materiales biodegradables a partir de biomasa integral de hongos filamentosos. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes*
<http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/6209>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>



DESARROLLO DE MATERIALES BIODEGRADABLES A PARTIR DE BIOMASA INTEGRAL DE HONGOS FILAMENTOSOS

Tesis presentada para obtener el título de Doctora en Ciencia y
Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes

Ing. Macarena Sánchez Díaz

Directora: Dra. Vanesa Ludemann

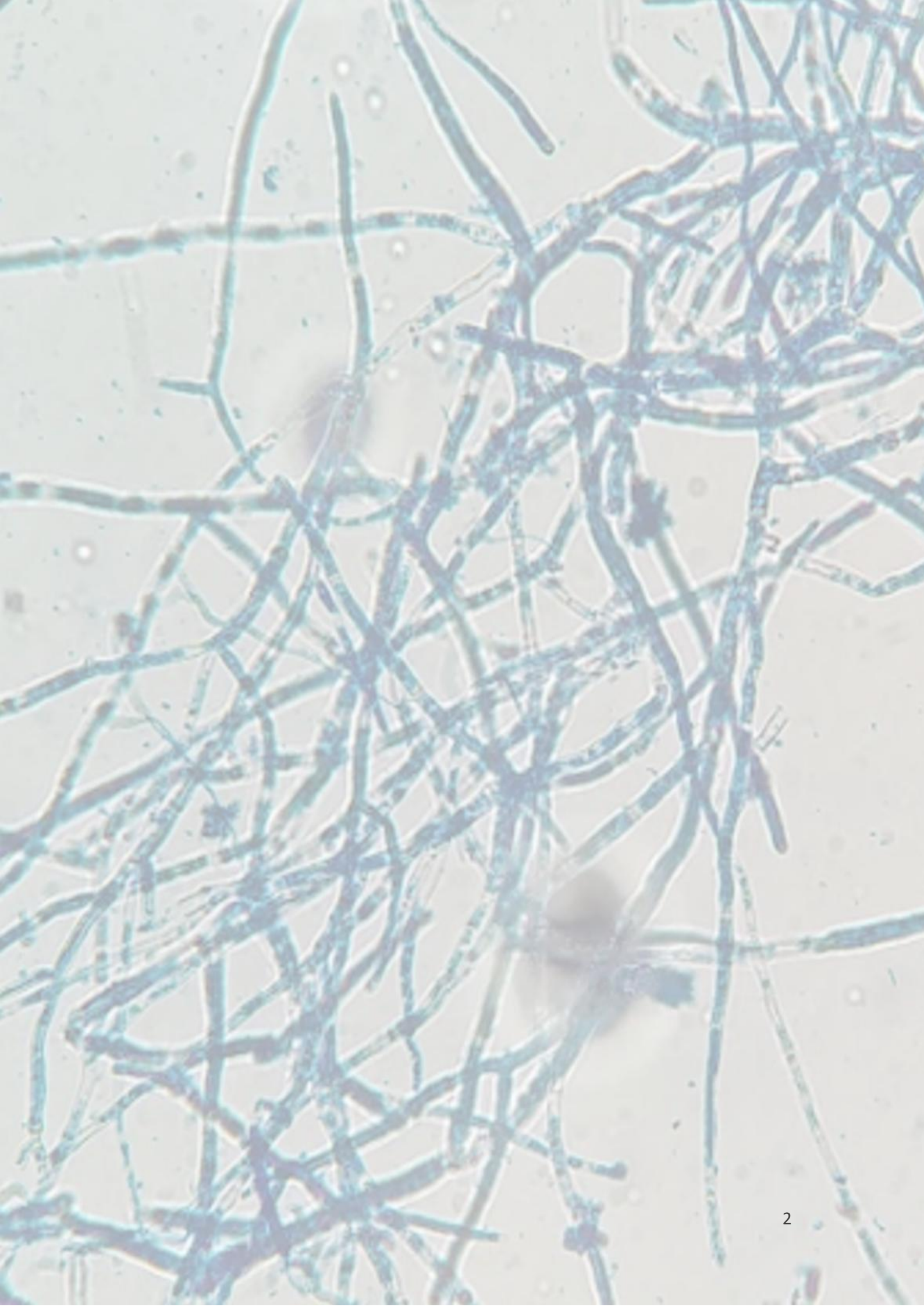
Co-directora: Dra. Mercedes A. Peltzer

2025

Departamento de Ciencia y Tecnología

Universidad Nacional de Quilmes





RESUMEN

La búsqueda de alternativas sostenibles y biodegradables a los plásticos tradicionales se ha convertido en una prioridad a nivel científico y tecnológico. Frente a este escenario, los hongos filamentosos se perfilan como un recurso prometedor para el desarrollo de materiales biobasados, dado a su rápido crecimiento, capacidad de adaptación, y a la composición de su micelio. Esta tesis doctoral busca aportar al campo del desarrollo de materiales fúngicos mediante un abordaje integral que combina la obtención de películas de micelio (PM) y materiales de micelio puro (MMP), con la evaluación de su biodegradabilidad y potencial aprovechamiento de residuos agroindustriales.

En una primera etapa se realizó un screening de diferentes cepas fúngicas, evaluando su crecimiento en cultivos sumergidos (agitados y estáticos) y cultivo en medio sólido, que permitió identificar y seleccionar las condiciones de cultivo y cepas más adecuadas para la producción de biomasa destinada a la formulación de dispersiones filmogénicas. Se seleccionaron las biomasas de *Aspergillus niger* (AN), *Penicillium nalgiovense* (PN) y *Mucor hiemalis* (MH) obtenidas bajo cultivo sumergido con agitación, esterilizadas y filtradas. Bajo estas condiciones, AN y PN crecieron como pellets mientras que MH creció como micelio disperso. Se cuantificaron los principales componentes filmogénicos de las biomasas. MH presentó mayores valores de proteínas y menos carbohidratos que AN y PN, que mostraron una composición similar entre sí. Se prepararon dispersiones de biomasa al 3 % p/p (b.s) y se evaluó la efectividad de tratamientos de ultrasonido (US) y homogeneización (UT) para la ruptura celular, mediante microscopía óptica y distribución del tamaño de partícula. La ruptura de las hifas fue efectiva logrando en todos los casos dispersiones con la mayoría de sus partículas por debajo de los 10 μm . MH presentó distribuciones de tamaño de partícula similares independientemente del tratamiento de ruptura, mientras que en PN y AN se observó una tendencia monomodal solamente en tratamientos de 30 min de US. Las dispersiones se plastificaron con glicerol (25 % p/p b.s) y se utilizaron para obtener PM por evaporación del solvente (casting). Se evaluaron sus propiedades mecánicas, térmicas (TGA), estructurales (FTIR, AFM), su permeabilidad al vapor de agua, color y opacidad. Se obtuvieron PM homogéneas y maleables con características distintivas según la cepa. Los diferentes tratamientos de ruptura celular no impactaron en el color, la opacidad ni en las propiedades mecánicas de las PM. Las PM de MH se caracterizaron por ser amarillas y opacas mientras que las de AN y PN presentaron tonos marrones y mayor transparencia. Las PM de MH presentaron mayor fragilidad que las de AN y PN, que resultaron ser más rígidas y elásticas, respectivamente. Los espectros de FTIR mostraron mayor similitud entre PN y AN que con MH, correlacionándose con su composición. Los termogramas (TGA) mostraron un perfil de degradación múltiple en función de la cepa fúngica. Las PM de AN y PN presentaron valores de permeabilidad al vapor de agua similares entre sí y comparables con películas de biomasas microbianas.

Las imágenes obtenidas por AFM se correspondieron con los resultados de las pruebas mecánicas.

En una segunda etapa, se obtuvieron MMP a partir de AN, PN y *Monascus ruber* (MR), cultivados bajo tres condiciones de cultivo sumergido: agitado (A), estático (E) y combinado (AE). Los micelios se esterilizaron y separaron del medio. En E y AE se obtuvieron MMP flotantes que cubrían la sección del recipiente, excepto por AN en la condición E cuyo crecimiento se limitó a los bordes. En la condición A los MMP se obtuvieron como un conjunto de pellets unidos. Los MMP de A y E (MR) y A y AE (AN) se trataron por inmersión en glicerol 25 % y 50 % p/p por 3, 12 y 24 h y luego se prensaron por compresión (6,4 g/cm²) por 72 h. Se determinó el color de los MMP, observándose diferencias entre las condiciones de cultivo y entre ambas superficies de cada material. La inmersión en glicerol por 3 h fue suficiente para mejorar la durabilidad y maleabilidad. Se determinaron las propiedades mecánicas de los MMP (AN: AE, PN: AE y MR: E) tratados con 0, 25 y 50 % glicerol (3 h). La incorporación de glicerol redujo la resistencia y rigidez, al mismo tiempo que aumentó notablemente la elongación. No se observaron diferencias entre ambas concentraciones de glicerol evaluadas.

Tanto las PM como los MMP mantuvieron sus características iniciales durante períodos prolongados de almacenamiento sin presentar contaminación microbiana, probablemente debido a su baja actividad de agua. Estos materiales se sometieron a ensayos de desintegración en compost doméstico. Ambos tipos de materiales presentaron un comportamiento de desintegración bifásico: fase inicial rápida (primeros 30 días) seguida de una desaceleración. Las PM y los MMP alcanzaron pérdidas de peso cercanas al 70 % (77 días) y al 60 % (95 días), respectivamente

Finalmente, se evaluó el cultivo a AN en extractos líquidos de bagazo cervecero (BC) como única fuente de nutrientes. Para ello, se prepararon tres medios a partir de BC mediante extracción acuosa con o sin el agregado de la enzima α -amilasa bacteriana (2,5 y 5 %v/v), y se utilizaron como control cultivos en caldo Sabouraud glucosado. Los extractos se inocularon con AN e incubaron bajo condiciones AE. Se determinó el contenido de azúcares reductores y carbohidratos totales de los medios al inicio y final de la incubación. Se determinó la cantidad de azúcares consumidos, la producción de micelio como peso seco y la tasa de conversión sustrato-a-micelio. Los extractos de BC presentaron concentraciones iniciales de carbohidratos mayores que el control destacándose los de tratamiento enzimático. En todos los extractos enzimáticos de BC, el crecimiento fúngico superó al del control, alcanzando un máximo en el extracto con 5 % de enzima y logrando la mayor conversión sustrato-a-micelio.

En esta tesis se desarrollaron y caracterizaron materiales obtenidos a partir de micelio integral de hongos filamentosos, explorando su potencial como materiales biodegradables y sostenibles, incluyendo la valorización de residuos agroindustriales en su obtención.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas e instituciones que hicieron posible la realización de esta tesis doctoral.

En primer lugar, a mi familia, por su amor incondicional, su paciencia y su apoyo constante en cada etapa de este camino. Su presencia y confianza fueron fundamentales para superar los desafíos y alcanzar este logro.

A mis compañeras y amigas del Laboratorio de Micología de Alimentos: mi directora la Dra. Vanesa Ludemann y la Dra. Alfonsina Moavro. Gracias por darme la posibilidad de realizar este trabajo, por guiarme con dedicación, por su tiempo y por alentarme siempre a seguir creciendo. Gracias por su apoyo constante tanto en lo académico como en lo personal.

A mi co-directora la Dra. Mercedes A. Peltzer por su predisposición, guía, y ayuda constante.

Al equipo del LOMCEM, por ayudarme y orientarme en la caracterización de los materiales.

A la Ing. María Sol Lazarte y Yamila Rodríguez que hicieron su tesis de grado en el contexto de esta tesis doctoral, por su colaboración y esfuerzo.

A todos, muchas gracias por acompañarme en este recorrido que significó mucho más que una etapa académica, fue una experiencia de aprendizaje, esfuerzo y crecimiento personal.

Este trabajo se realizó gracias a una beca doctoral otorgada por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (RESOL-2020-129-APN-DIR_CONICET) en el marco del programa de investigación PUNQ “Investigaciones aplicadas al desarrollo del sector alimentario II” financiado por la Universidad Nacional de Quilmes (Exp. 827/1300/19).

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Los resultados de este trabajo fueron presentados parcialmente en las siguientes revistas científicas:

- **Sanchez Díaz, M.**, Lazarte, M., Moavro, A., Peltzer, M., Ludemann, V. (2023). Naturally Multicomponent Materials Obtained from Filamentous Fungi: Impact of Different Cell Rupture Treatment on Film Properties. *J Polym Environ* 31, 2347-2363 (2023). <https://doi.org/10.1007/s10924-023-02766-5>
- **Sanchez Díaz, M.**, Rodríguez, Y., Moavro, A., Peltzer, M., Ludemann, V. (En proceso de revisión) Evaluation of culture and plasticisation conditions for the production of pure mycelium materials from *Aspergillus niger*. *Waste Biomass Valor*.

Además, se trabajó colaborativamente para la publicación del siguiente artículo científico relacionado con materiales biobasados

- Martínez, E., Salvay, G., Andrés, S., **Sanchez Díaz, M.**, Peltzer, M., Ludemann, V. (2024). Functional characterization of biodegradable films obtained from whole *Paecilomyces variotii* biomass. *Int Microbiol* 27, 1573-1585 (2024). <https://doi.org/10.1007/s10123-024-00501-1>.

Asimismo, se presentaron resultados de este trabajo en las siguientes reuniones científicas:

- **Sanchez Díaz, M.**; Lazarte, M.S.; Moavro, A.; Peltzer, M.; Ludemann, V. (2022). Caracterización de propiedades mecánicas y color en películas obtenidas a partir de biomasa fúngica mediante diferentes tratamientos de ruptura celular. *VIII Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*. 4-6 de octubre, Córdoba, Argentina.
- **Sanchez Díaz, M.**; Rodríguez, Y.; Sanchez, I.; Lucero, M.; Moavro, A.; Ludemann, V. (2023). Evaluación de distintas condiciones de cultivo sumergido para la obtención de micelio y pigmentos de *Monascus ruber*. *V Jornadas de Investigadores e Investigadoras en Formación (JIF) en Ciencia y Tecnología*. 28-29 de septiembre, Bernal, Buenos Aires, Argentina.
- **Sanchez Díaz, M.**; Lazarte, M.S.; Moavro, A.; Peltzer, M.; Ludemann, V. (2023). Análisis de los principales componentes filmogénicos de biomasas fúngicas para la obtención de películas y su caracterización con TGA y FTIR-ATR. *XV Simposio Argentino de Polímeros – I Congreso Argentino de Materiales Compuestos*. 4-7 de diciembre, Mar del Plata, Argentina.
- Rodríguez, Y.; **Sanchez Díaz, M.**; Sanchez, I.; Lucero, M.; Moavro, A.; Ludemann, V. (2024). Obtención de biomateriales fúngicos plastificados. *VI Congreso Argentino de Microbiología (CAM)*. 21-23 de agosto, CABA, Argentina.
- **Sanchez Díaz, M.R.**; Rodríguez, Y.A.; Peltzer, M.A.; Moavro, A.; Ludemann, V. (2025). Evaluación de propiedades mecánicas y desintegración en compost de materiales obtenidos a partir de micelio de *Aspergillus niger*. *VI CAMAyA*. 24-26 de septiembre, CABA, Argentina.
- **Sanchez Díaz, M.R.**; Rodríguez, Y.A.; Peltzer, M.A.; Moavro, A.; Ludemann, V. (2025). Plastificación de biomateriales fúngicos: impacto del glicerol en sus propiedades mecánicas. *VI Jornadas de Investigadores en Formación (JIF) en Ciencia y Tecnología*. 13-14 de noviembre, Bernal, Buenos Aires, Argentina.
- **Sanchez Díaz, M.R.**; Peltzer, M.A.; Moavro, A.; Ludemann, V. (2025). Evaluación del cultivo de *Aspergillus niger* en bagazo de cerveza. *1° Jornada de Actualización en Microbiología de Alimentos – VI Simposio Argentino de Inocuidad Alimentaria*. 19-20 de noviembre, Gualguaychú, Entre Ríos, Argentina.

ÍNDICE

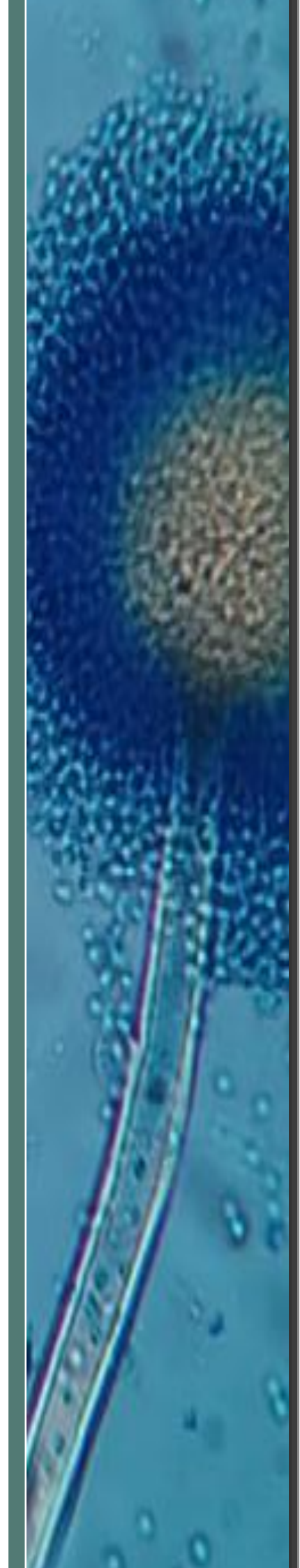
INTRODUCCIÓN	14
1. PLÁSTICOS CONVENCIONALES: CONTEXTO Y PROBLEMÁTICA.....	15
2. BIOPLÁSTICOS: DESAFÍOS Y OPORTUNIDADES	16
3. EL MICELIO FÚNGICO COMO MATERIAL EMERGENTE	19
3.1. <i>Materiales compuestos a base de micelio (MCM)</i>	22
3.2. <i>Materiales de micelio puro (MMP)</i>	23
3.3. <i>Películas de micelio a partir de dispersiones filmogénicas (PM)</i>	24
4. COMPOSTAJE Y BIODEGRADABILIDAD DE MATERIALES FÚNGICOS.....	26
5. CULTIVO DE HONGOS FILAMENTOSOS.....	28
5.1. <i>Cultivo sumergido</i>	29
5.2. <i>Cultivo en estado sólido</i>	30
5.3. <i>Cultivo en residuos agroindustriales</i>	30
5.3.1. <i>Cultivo en bagazo cervecero</i>	31
6. REFERENCIAS.....	33
OBJETIVO	43
CAPÍTULO I: OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE DISPERSIONES FILMOGÉNICAS.....	45
1. OBJETIVO	46
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
2.1. <i>Confirmación de identidad de las cepas de trabajo</i>	46
2.2. <i>Obtención de biomasa</i>	47
2.2.1. <i>Preparación del inóculo</i>	47
2.2.2. <i>Cultivo sumergido</i>	48
2.2.3. <i>Cultivo en medio sólido</i>	49
2.2.4. <i>Determinación de principales componentes filmogénicos</i>	50
2.2.4.a. <i>Proteína cruda</i>	51
2.2.4.b. <i>Carbohidratos</i>	52
2.3. <i>Obtención de las dispersiones filmogénicas</i>	53
2.3.1. <i>Observación microscópica</i>	54
2.3.2. <i>Estudio de la distribución del tamaño de partícula</i>	54
2.4. <i>Análisis estadístico</i>	57
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
3.1. <i>Confirmación de identidad de las cepas de trabajo</i>	57
3.1.1. <i>Aspergillus niger</i>	57
3.1.2. <i>Mucor hiemalis</i>	59
3.1.3. <i>Geotrichum candidum</i>	61

3.1.4. <i>Penicillium nalgiovense</i>	62
3.1.5. <i>Penicillium camemberti</i>	64
3.2. <i>Producción de biomasa</i>	65
3.2.1. Cultivo sumergido	65
3.2.2. Cultivo en medio sólido	71
3.2.3. Determinación de principales componentes filmogénicos	74
3.3. <i>Obtención de las dispersiones filmogénicas</i>	75
3.3.1. Observación microscópica	76
3.3.2. Estudio de la distribución del tamaño de partícula	78
4. REFERENCIAS	81
CAPÍTULO II: OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS OBTENIDAS A PARTIR DE DISPERSIONES FILMOGÉNICAS	87
1. OBJETIVO	88
2. MATERIALES Y MÉTODOS	88
2.1. <i>Obtención de las películas</i>	88
2.1.1. Aspecto visual de las películas fúngicas	89
2.1.2. Determinación del color	89
2.1.3. Determinación de la Opacidad	91
2.1.4. Análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	92
2.1.5. Estudio de las propiedades mecánicas: Ensayo de tracción uniaxial	93
2.1.6. Análisis termogravimétrico (TGA)	95
2.1.7. Permeabilidad experimental al vapor de agua	96
2.1.8. Microscopía de fuerza atómica (AFM)	99
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	100
3.1. <i>Aspecto visual de las películas fúngicas</i>	100
3.2. <i>Determinación del color y opacidad</i>	101
3.3. <i>Análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)</i>	104
3.4. <i>Estudio de las propiedades mecánicas: Ensayo de tracción uniaxial</i>	106
3.5. <i>Análisis termogravimétrico (TGA)</i>	110
3.6. <i>Permeabilidad experimental al vapor de agua</i>	113
3.7. <i>Microscopía de fuerza atómica (AFM)</i>	114
4. REFERENCIAS	116
CAPÍTULO III: OBTENCIÓN DE MATERIALES DE MICELIO PURO	123
1. OBJETIVO	124
2. MATERIALES Y MÉTODOS	124
2.1. <i>Obtención de los materiales de micelio puro (MMP)</i>	124
2.1.1. Confirmación de identidad de las cepas de trabajo	124
2.1.2. Preparación del inóculo	124
2.1.3. Cultivo sumergido	125

2.1.4. Plastificación y prensado	125
2.2. Caracterización de los MMP	127
2.2.1. Determinación del color	127
2.2.2. Estudio de las propiedades mecánicas: Ensayo de tracción uniaxial.....	127
2.2.3. Determinación de la capacidad antioxidante de los micelios de <i>M. ruber</i>	128
2.2.3.a. Método ABTS	128
2.2.3.b. Método DPPH	130
2.2.4. Determinación de la actividad antimicrobiana de los micelios de <i>M. ruber</i>	131
2.2.4.a. Método de difusión en disco.....	131
2.2.4.b. Método de contacto de con suspensión bacteriana	132
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	133
3.1. <i>Obtención de los materiales de micelio puro (MMP)</i>	133
3.1.1. Confirmación de identidad de <i>M. ruber</i>	133
3.1.2. Cultivo sumergido	135
3.1.3. Plastificación y prensado	139
3.2. <i>Caracterización de los MMP</i>	142
3.2.1. Determinación del color	142
3.2.2. Estudio de las propiedades mecánicas: Ensayo de tracción uniaxial.....	146
3.2.3. Determinación de la capacidad antioxidante de los micelios de <i>M. ruber</i>	150
3.2.4. Determinación de la capacidad antimicrobiana de los micelios de <i>M. ruber</i>	150
4. REFERENCIAS.....	151
CAPÍTULO IV: CONTRIBUCIÓN A LA SOSTENIBILIDAD DE LOS MATERIALES	155
1. OBJETIVO	156
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	156
2.1. <i>Evaluación de la desintegración en compost de los materiales de micelio</i>	156
2.2. <i>Producción de micelio de A. niger en extractos de bagazo cervecero</i>	158
2.2.1. Preparación de los extractos de bagazo cervecero	158
2.2.2. Cultivo sumergido en extractos de bagazo cervecero	159
2.2.2.a. Determinación de azúcares reductores	159
2.2.2.b. Determinación de carbohidratos totales	160
2.2.2.c. Análisis estadístico	160
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	160
3.1. <i>Evaluación de la desintegración en compost de los materiales de micelio</i>	160
3.2. <i>Producción de micelio de A. niger en extractos de bagazo cervecero</i>	164
4. REFERENCIAS.....	169
CONCLUSIONES.....	171
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	175
ANEXOS	178

ANEXO I: MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS	179
ANEXO II: RECuento EN CÁMARA DE NEUBAUER.....	181

INTRODUCCIÓN



1. Plásticos convencionales: contexto y problemática

El desarrollo de materiales plásticos derivados del petróleo ha transformado radicalmente la vida cotidiana debido a su bajo costo, versatilidad y durabilidad. Sin embargo, estas mismas propiedades se han convertido en una seria amenaza ambiental. Se estima que más de 400 millones de toneladas de plásticos se producen anualmente en el mundo, y se recicla menos de un 10 %, por lo que una gran proporción termina en vertederos, cursos de agua y ecosistemas naturales. Si las tendencias actuales se mantienen, para 2050 se habrán generado cerca de 12.000 millones de toneladas de plásticos desechados acumulados en el planeta (Geyer et al., 2017; Mahajan et al., 2023).

El sector de envases y embalajes es el principal consumidor de plásticos, representando alrededor del 42 % de toda la producción no textil. A diferencia de otros sectores como la construcción o la industria automotriz, donde los plásticos pueden permanecer en uso durante décadas, los envases tienen una vida útil extremadamente corta: en muchos casos menos de un año, y en gran parte de los productos, apenas días o semanas. Esto implica que la mayoría de los plásticos de un solo uso se convierten rápidamente en residuos (Geyer et al., 2017).

El problema se agrava por el hecho de que la mayoría de los plásticos convencionales están fabricados a partir de monómeros derivados de combustibles fósiles (principalmente etileno y propileno) y no son biodegradables. Los polímeros más utilizados son los polietilenos (PE) de alta (PEAD) y baja (PEBD) densidad, polipropilenos (PP), poliestireno (PS), policloruro de vinilo (PVC) y polietilentereftalato (PET). Estos materiales presentan tiempos de degradación que pueden superar los cientos de años, acumulándose de manera persistente y generando efectos adversos sobre la fauna, la flora y la salud humana. En el ambiente no se descomponen, sino que se fragmentan en partículas más pequeñas, dando lugar a los denominados microplásticos, que ya han sido detectados en todos los océanos del mundo, en sistemas de agua dulce e incluso en suelos agrícolas (Barnes et al., 2009; Rillig, 2012; Wagner et al., 2014).

Además de su impacto ambiental, el ciclo de vida de los plásticos plantea retos energéticos y climáticos. Su producción depende de recursos no renovables, mientras

que la incineración de residuos libera gases de efecto invernadero y contaminantes tóxicos. Además, el reciclaje, si bien es necesario, enfrenta limitaciones técnicas y económicas, ya que los materiales reciclados suelen ser de menor calidad, y los procesos de separación y limpieza resultan costosos (Geyer et al., 2015).

En este contexto, la búsqueda de alternativas sostenibles y biodegradables se ha convertido en una prioridad a nivel científico, tecnológico y político. Las políticas de economía circular, que buscan reducir, reutilizar y revalorizar recursos, impulsan la necesidad de materiales innovadores que no solo reemplacen a los plásticos tradicionales, sino que además contribuyan a la valorización de residuos y subproductos industriales (Guerrero et al., 2015; Rujnić-Sokele y Pilipović, 2017). Frente a este escenario, se han explorado diversas alternativas basadas en recursos renovables, entre las cuales se destacan los bioplásticos.

2. Bioplásticos: desafíos y oportunidades

Como sustitutos de los plásticos tradicionales, se han desarrollado los denominados plásticos verdes o bioplásticos. Estos se definen como polímeros biodegradables y/o biobasados, es decir pueden cumplir ambos requisitos o solo uno de ellos. Por un lado, los polímeros biobasados o biopolímeros son definidos por como sustancias macromoleculares derivadas de plantas, animales o microorganismos. Por otro lado, se definen como biodegradables a los polímeros susceptibles de degradación por actividad biológica, cuya degradación está acompañada de una disminución de su masa molar (Ribba et al., 2020). Es importante remarcar que no todos los polímeros biobasados son necesariamente biodegradables y que existen polímeros biodegradables que se originan en fuentes fósiles (Rujnić-Sokele y Pilipović, 2017; Ribba et al., 2020) (Figura 1).

En general, se reconocen tres grandes grupos de biopolímeros (Rujnić-Sokele y Pilipović, 2017; Ribba et al., 2020):

- **Polímeros naturales extraídos de biomasa:** incluyen polisacáridos como almidón y celulosa, proteínas como la caseína y la soja, y biopolímeros derivados de la quitina o el colágeno.

- **Polímeros sintetizados a partir de monómeros de origen biológico:** por ejemplo, el ácido poliláctico (PLA), producido a partir de la fermentación de azúcares en ácido láctico y su posterior polimerización.
- **Polímeros producidos directamente por microorganismos:** como los polihidroxialcanoatos (PHA), generados por bacterias bajo condiciones específicas de cultivo.

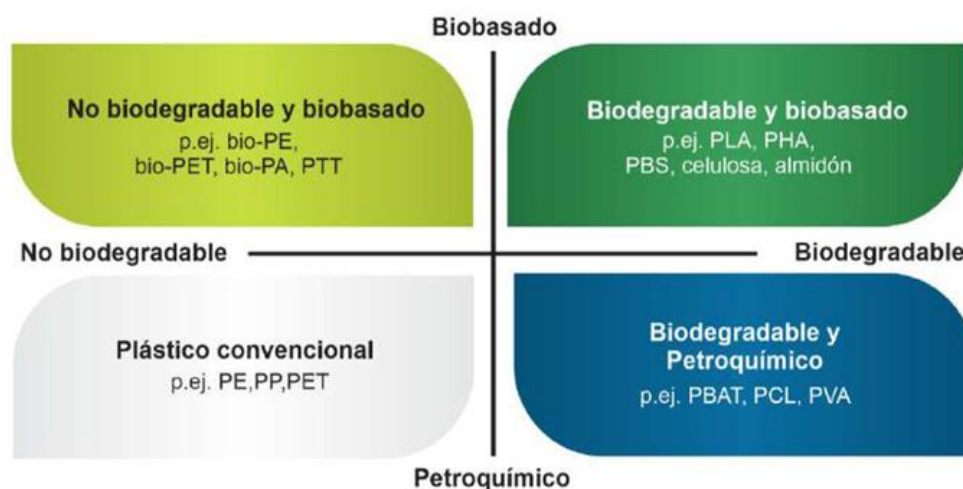


Figura 1. Sistema de coordenadas de materiales de los plásticos (Ribba et al., 2020) (*bio-PE: bio-polietileno, bio-PET: bio -tereftalato de polietileno, PTT: poli (tereftalato de trimetileno), bio-PA: biopoliamida, PLA: ácido poliláctico, PHA: polihidroxialcanoato)

Cada uno de estos grupos presenta ventajas y limitaciones en términos de costo, propiedades mecánicas, barrera al agua y oxígeno, y factibilidad de compostaje. Una característica común es que su implementación a gran escala todavía enfrenta desafíos económicos y tecnológicos debido a que los costos de producción suelen ser más elevados que los de los plásticos convencionales y aún no existe una infraestructura de compostaje y reciclaje lo suficientemente desarrollada para gestionarlos de manera eficiente (Ribba et al., 2020).

En los últimos años tanto la creciente presión regulatoria como la demanda de los consumidores por productos más sostenibles condujo a una tendencia global hacia la sustitución de plásticos convencionales por materiales biobasados y biodegradables. De esta manera, el mercado de bioplásticos se encuentra en expansión y se estima que

alcanzará una capacidad de producción de más de 7,4 millones de toneladas anuales hacia 2028, con aplicaciones destacadas en envases, agricultura y textiles (European Bioplastics, 2023).

Diversas empresas líderes han comenzado a incorporar estos materiales en sus líneas de producción, lo que evidencia una transición hacia modelos más circulares (Tabla 1). Estos casos demuestran que los materiales biobasados están comenzando a trascender la etapa de laboratorio y se están incorporando en estrategias comerciales a gran escala, particularmente en sectores donde la reducción de residuos plásticos representa una ventaja competitiva. Sin embargo, su adopción plena aún enfrenta desafíos económicos y logísticos, relacionados con la capacidad de producción, el costo de los materiales y la necesidad de infraestructuras adecuadas de compostaje y reciclaje.

Empresa	Que hacen	Fuente
Danone	Ha implementado empaques biodegradables para sus yogures Activia, utilizando PLA (ácido poliláctico) derivado de almidón de maíz.	The Food Tech. (2024)
Nestlé	Ha lanzado empaques biodegradables para sus barras de chocolate KitKat, utilizando papel y celulosa.	The Food Tech. (2024)
Coca-Cola	En 2015, lanzó PlantBottle™, una botella de tereftalato de polietileno (PET) totalmente reciclable fabricada con material 100 % vegetal.	Coca-Cola. (2015)
PepsiCo	Ha experimentado con bolsas de snacks elaboradas con bioplásticos compostables.	PepsiCo. (2018)
IKEA	Desde el 2019 sustituyó progresivamente el poliestireno expandido (EPS) en embalajes por materiales a base de micelio y fibras vegetales.	Packhelp. (2025)
NatureWorks (Ingeo)	Produce PLA (ácido poliláctico) biobasado bajo la marca Ingeo, usado en películas, envases y tela. Es una de las empresas más reconocidas en bioplásticos de origen vegetal.	NatureWorks. (2025)
Adidas/ AMSilk	En 2016 lanzó un prototipo de calzado “Futurecraft Biofabric” con fibras Biosteel® biodegradables desarrolladas por la empresa alemana AMSilk. (aún no se encuentra en el mercado)	AMSilk. (2016)
Adidas/ Bolt Threads	En 2021 lanzó Stan Smith Mylo™, un prototipo de calzado que utiliza Mylo, un material derivado del micelio de los hongos, en colaboración con la empresa de biotecnología Bolt Threads. (aún no se encuentra en el mercado)	Adidas. (2021)

Tabla 1. Empresas líderes que han comenzado a incorporar bioplásticos en sus líneas de producción.

Un aspecto especialmente relevante de los biopolímeros producidos por microorganismos es que permiten desvincular la obtención de materiales a partir de cultivos agrícolas destinados a la alimentación. En este contexto, los hongos filamentosos se destacan como una fuente prometedora para el desarrollo de materiales biobasados sostenibles.

3. El micelio fúngico como material emergente

Los hongos han desempeñado un papel importante en la nutrición y la salud humana desde la antigüedad. Estos son organismos versátiles que han tenido un gran impacto en el desarrollo industrial y actúan como fuente de diversos activos, como compuestos farmacéuticamente relevantes, alcaloides, polisacáridos, esteroides, terpenos, ácidos orgánicos, pigmentos y alcohol, entre otros (Kumar et al., 2021). Los hongos filamentosos también se utilizan para producir enzimas de importancia industrial para una variedad de aplicaciones comerciales, por ejemplo, en la fabricación de textiles y cuero, procesamiento de papel y pulpa, producción de detergentes y procesamiento de alimentos (El-Enshasy, 2007; Bourdichon et al., 2012). Muchos hongos se utilizan directamente como alimento (p. ej., *Agaricus*), y en la fabricación de alimentos, para producir alimentos y bebidas fermentados, como quesos y salchichas madurados (principalmente *Penicillium* spp.) (Samson et al., 1977; Chávez et al., 2011; Moavro et al., 2020), alimentos fermentados a base de soja (principalmente *Aspergillus* spp.) (Hong et al., 2015), ingredientes alimentarios (p. ej., ácidos orgánicos, vitaminas, pigmentos, etc.) y micoproteínas (p. ej., Quorn™, un producto rico en proteínas para consumo humano producido por *Fusarium venenatum* A3/4) (Ahmad et al., 2022).

Los materiales de base biológica generalmente se preparan a partir de biopolímeros estructurales en la naturaleza, como proteínas, polisacáridos, lípidos o sus combinaciones (Kuorwel, et al., 2011; Pan et al., 2014; Peltzer et al., 2017). El micelio es la parte vegetativa de los hongos y está construido sobre una red entrelazada de filamentos tubulares finos denominados hifas. La estructura micelial, es un material polimérico natural, que posee propiedades notables, que incluyen baja densidad, biodegradabilidad, seguridad para el uso humano y tasas de crecimiento notables

(Haneef et al., 2017). En general, la pared celular de las hifas es una red resistente que está formada por una matriz interna de quitina-glucano altamente entrecruzada seguida de una capa externa rica en proteínas (Figura 2) que le confiere importantes características mecánicas y estructurales, deseables en la ciencia de los materiales sostenibles (Amobonye et al., 2023).

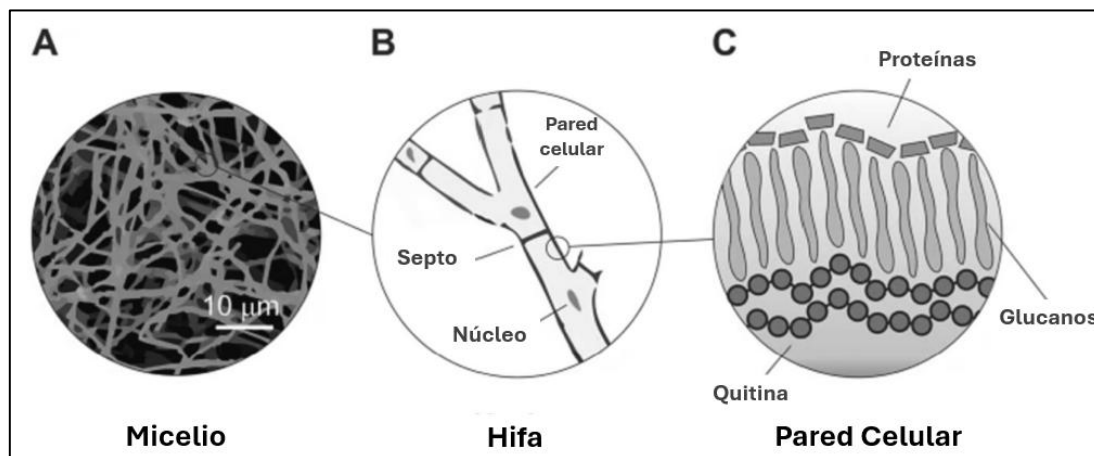


Figura 2. Estructura y disposición de los filamentos fúngicos en el micelio: (A) morfología óptica de las fibras del micelio, (B) representación esquemática de las hifas, (C) Imagen conceptual de la pared celular fúngica (Adaptado de Amobonye et al., 2023).

Desde el punto de vista composicional, los hongos presentan una bioquímica compleja, en la que predominan los polisacáridos y las proteínas como componentes fundamentales de la pared celular y de la biomasa total. La combinación de estas macromoléculas confiere a los hongos una estructura organizada, resistente y adaptable, clave para su supervivencia en entornos diversos y de gran interés en el desarrollo de materiales basados en micelio.

Las proteínas representan entre el 20 y el 40 % del peso seco del micelio, dependiendo de la especie y las condiciones de cultivo. Se localizan tanto en el citoplasma como unidas a los polisacáridos de la pared celular. Entre ellas se destacan las proteínas estructurales de pared, muchas de las cuales se encuentran glicosiladas y contribuyen al anclaje de la matriz polisacáridica. Otras proteínas relevantes son las enzimas extracelulares como hidrolasas, oxidasas, quitinasas y glucanasas entre otras, que participan activamente en la degradación de sustratos complejos y en la remodelación de la pared durante el crecimiento fúngico (Bowman y Free, 2006; Li et al., 2023).

Los hongos presentan una composición de carbohidratos compleja, que incluye tanto polisacáridos estructurales como de reserva. Los primeros conforman la matriz de la pared celular y comprenden principalmente quitina (10-20 % b.s), un polímero lineal de N-acetilglucosamina y glucanos (50-60 % b.s), polímeros de D-glucosa. Estos componentes son los responsables de otorgar rigidez y flexibilidad a la pared fúngica. Además, se encuentran mananos y galactomananos, frecuentemente asociados a proteínas en forma de glicoproteínas, que participan en la organización superficial y la interacción con el entorno. Por otro lado, los polisacáridos de reserva de energía comprenden principalmente al glucógeno y la trehalosa, la cual también tiene una función protectora frente a estrés. En menor proporción, pueden detectarse azúcares libres como glucosa, manosa y arabinosa, que participan en procesos metabólicos y biosintéticos (Bowman y Free, 2006; Svanström et al., 2014; Li et al., 2023).

En general, los glucanos se dividen en dos grandes clases: glucanos de unión α y glucanos de unión β , cuyas características y funciones son bastante diferentes. En los hongos, algunos α -glucanos se presentan en forma amorfa y actúan como compuestos de reserva energética en el citoplasma, como es el caso del glucógeno. Asimismo, pueden cumplir un rol estructural en la pared fúngica formando estructuras microfibrilares mediante la asociación de varias cadenas de glucano a través de enlaces de hidrógeno. Por otro lado, la mayoría de los β -glucanos son mayoritariamente cristalinos y forman microfibrillas, desempeñando un papel estructural en la pared celular fúngicas. A diferencia de los α -glucanos, los β -glucanos fúngicos son más abundantes y sus estructuras son más variables (Ruiz-Herrera y Ortiz-Castellanos, 2019).

En este sentido, los hongos podrían ser una plataforma de fabricación revolucionaria y sostenible que, debido a su estructura y composición únicas, puede utilizarse para producir materiales novedosos. Entre las muchas aplicaciones biotecnológicas de los hongos, el uso de micelio fúngico para producir materiales se encuentra en sus primeras etapas y está orientado principalmente hacia el uso de basidiomicetes macroscópicos. Sin embargo, los mohos ascomicetos permanecen poco explorados en el desarrollo de materiales.

Hasta la fecha, se han desarrollado dos enfoques principales de elaboración de materiales fúngicos: los materiales compuestos a base de micelio (MCM) y los materiales de micelio puro (MMP).

3.1. Materiales compuestos a base de micelio (MCM)

Estos sistemas han sido los más investigados. En estos materiales, las hifas fúngicas forman una red filamentosa tridimensional entrelazada dentro de un sustrato rico en celulosa, hemicelulosa y/o lignina, actuando como un adhesivo biológico al digerir sus nutrientes y unir simultáneamente el sustrato (Elsacker et al., 2019). Se han estudiado y producido principalmente dos tipos de materiales biocompuestos diferentes a base de micelio: compuestos tipo espumas y tipo sándwich a base de micelio (Yang et al., 2021). Las espumas a base de micelio se elaboran mediante el cultivo homogéneo de hongos en desechos agrícolas como paja, aserrín, cáscaras de arroz o fibras de algodón (Jones et al., 2020) (Figura 3). A medida que la red de micelio crece, produce fibras que unen las piezas del sustrato para formar un material poroso y liviano (López Nava et al., 2015; Elsacker et al., 2019; Pelletier et al., 2019). Por otro lado, los compuestos tipo sándwich a base de micelio incorporan tejidos de fibra natural (por ejemplo, yute, cáñamo y celulosa), como capas superior e inferior, con desechos agrícolas unidos al micelio como núcleo, formando una estructura tipo sándwich con alta rigidez a la flexión (Jiang et al., 2017) (Figura 4).

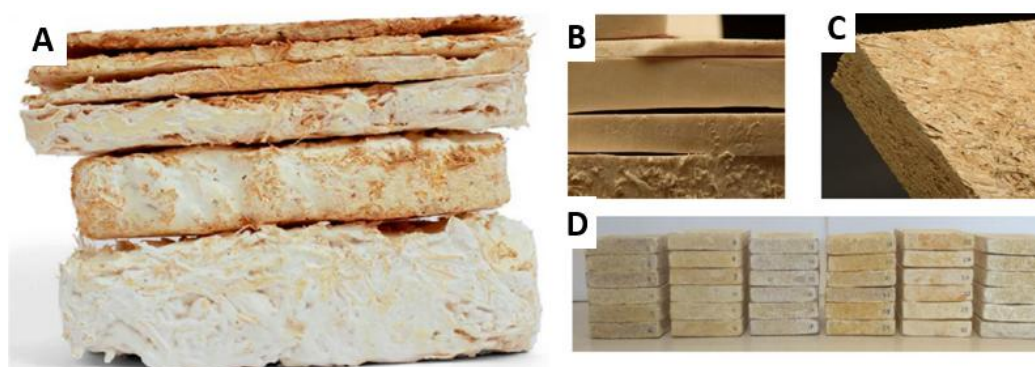


Figura 3. A) Composición típica de MCM tipo espumas; B) MCM tipo espuma usados como sustitutos de tableros en paneles de paredes y puertas; C) MCM usados como espumas aislantes, y D) MCM tipo espuma elaborados mediante micelio crecido sobre residuos de poda de vides. Adaptado de Parhizi et al., 2025

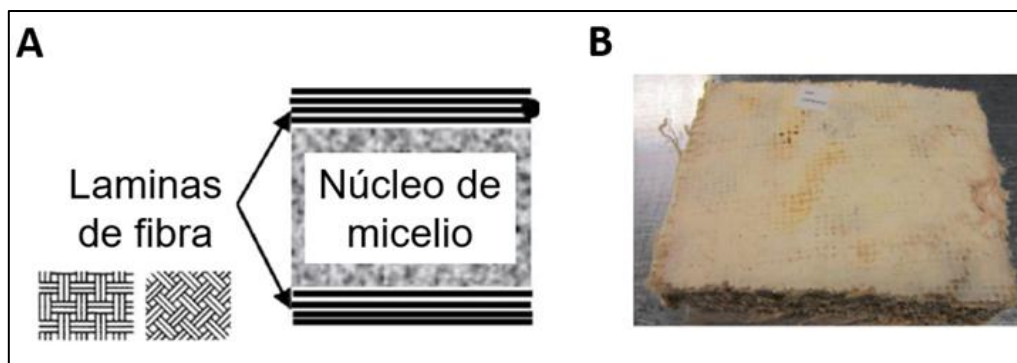


Figura 4. A) Esquema estructural típico de un MCM tipo sándwich a base de micelio.; B) una estructura MCM tipo sándwich. Adaptado de Jiang et al. (2017)

3.2. Materiales de micelio puro (MMP)

Estos materiales son elaborados a partir de la parte vegetativa de hongos filamentosos y han despertado un interés significativo debido a su gran potencial para ofrecer alternativas ambientalmente sostenibles a los cueros de origen animal y plástico (César et al., 2021; Elsacker et al., 2023; Sharma et al., 2025; Wattanavichian et al., 2025). Se destacan principalmente el uso de especies de hongos superiores como *Agaricus bisporus*, *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus* y *Fomes fomentarius*, que han mostrado gran potencial para la producción de sustitutos de cuero. Las características finales de estos materiales dependen de la especie fúngica utilizada y están fuertemente influenciadas por las condiciones de crecimiento del hongo. En la actualidad, se han registrado más de 36 patentes relacionadas con el uso de materiales derivados de hongos como sustitutos del cuero o textiles, y más de las tres cuartas partes de las patentes se originaron en el hemisferio Norte. Empresas líderes como MycoWorks (MycoWorks, 2025) y Ecovative (Ecovative, 2024) ya comercializan productos a base de micelio, usados en moda, muebles y automóviles (Figura 5, A). En nuestro país, investigadoras del Instituto de Procesos Biotecnológicos y Químicos de Rosario (Iprobyq/Conicet) desarrollaron un material a base de hongos mediante el aprovechamiento de residuos orgánicos que imita la textura y apariencia del cuero vacuno. Desde finales del 2022 fundaron la startup Mycorium Biotech (Mycorium Biotech, 2025) que actualmente comercializa Mycorium™, un biotextil de micelio, flexible, resistente, biodegradable y apto para la costura (Figura 5, B).

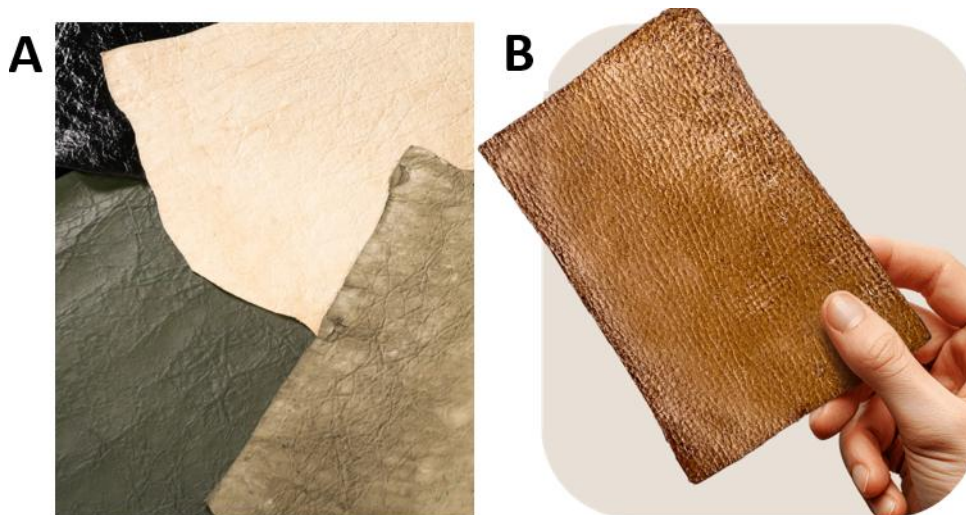


Figura 5. Productos *símil cuero* a base de hongos desarrollados por A) Ecovative (Ecovative, 2024) y B) Mycorium Biotech (Mycorium Biotech, 2025).

3.3. Películas de micelio a partir de dispersiones filmogénicas (PM)

El desarrollo de películas de micelio a partir de dispersiones filmogénicas (PM) constituye, hasta donde alcanza nuestro conocimiento, un enfoque innovador para la obtención de materiales fúngicos biobasados. Este método se basa en la generación de una dispersión filmogénica mediante la ruptura celular del micelio, seguida de su procesamiento por el método de evaporación del solvente (casting).

Investigaciones previas de nuestro grupo demostraron la viabilidad de emplear biomasa integral de levaduras, granos de kéfir de agua y SCOBY de Kombucha como agentes filmogénicos para la producción de películas mediante esta estrategia (Delgado et al., 2018, 2021; Coma et al., 2019; Ramírez Tapias et al., 2022). Estos estudios evidenciaron que, para obtener un material formulado con propiedades adecuadas, es esencial liberar los compuestos intracelulares, principalmente proteínas y polisacáridos, responsables de las propiedades filmogénicas (Delgado et al., 2016). Sin embargo, hasta la fecha no se han reportado estudios específicos sobre la aplicación de hongos filamentosos como fuente de agentes formadores de película a partir de este enfoque.

La ruptura celular del micelio puede lograrse mediante distintos tratamientos físicos, químicos o enzimáticos, cada uno con efectos particulares sobre la estructura y la composición de la biomasa (Chisti y Moo-Young, 1986). Entre los métodos físicos, se

incluyen la homogeneización a alta presión, el ultrasonido de alta intensidad, y la molienda mecánica, los cuales generan fuerzas de cizalla capaces de disgregar las paredes celulares y liberar los componentes intracelulares (Zhang et al., 2013). Los métodos químicos, por su parte, se basan en el empleo de detergentes o soluciones alcalinas suaves que solubilizan lípidos y proteínas de membrana, facilitando la liberación de los compuestos internos. Finalmente, los tratamientos enzimáticos, que emplean quitinasas, glucanasas o proteasas, permiten una degradación selectiva y controlada de la pared celular, minimizando el daño sobre las macromoléculas de interés. La elección del método de ruptura depende de la naturaleza del microorganismo, el objetivo del material y la integridad de los componentes que se pretende preservar en la dispersión (Chisti y Moo-Young, 1986; Gomes et al., 2020; Zhao et al. 2024).

Entre los tratamientos físicos, el ultrasonido de alta intensidad se ha consolidado como una herramienta eficaz para la ruptura celular en matrices biológicas complejas. Este método utiliza ondas sonoras en el rango de 20-100 kHz, las cuales se transmiten en el medio líquido generando burbujas de cavitación. El colapso de estas burbujas produce microzonas con presiones y temperaturas extremadamente elevadas, además de flujos turbulentos y fuerzas de cizalla intensas (Zhang et al., 2013). Estos fenómenos facilitan la ruptura mecánica de las paredes celulares y la liberación de los compuestos intracelulares. Diversos factores, como la frecuencia del ultrasonido, la intensidad de potencia, la temperatura, el tiempo de exposición y el volumen de la muestra, influyen directamente en la eficiencia del tratamiento (Wang et al., 2018). Además, estudios recientes han demostrado que el ultrasonido no solo favorece la disgregación celular, sino que también puede modificar la estructura y las propiedades funcionales de los componentes liberados, induciendo procesos de despolimerización parcial de carbohidratos y alteraciones en la conformación proteica, lo que puede modificar la capacidad filmogénica del sistema (Baxter et al., 2005; Zhang et al., 2013; Wang et al., 2018; Yang et al., 2020).

La principal ventaja de emplear dispersiones filmogénicas como vía de obtención de materiales radica en la posibilidad de personalizar las películas mediante la incorporación de compuestos funcionales, como antioxidantes, antimicrobianos o

plastificantes, entre otros, que mejoren sus propiedades funcionales, mecánicas, térmicas o de barrera (Kuorwel et al., 2011).

Por lo general, los polímeros de origen biológico requieren del uso de plastificantes debido a su fragilidad y escasa capacidad de elongación. Los plastificantes son compuestos no volátiles de bajo peso molecular que se incorporan en un material para aumentar su flexibilidad (Appels et al., 2020). El glicerol, un pequeño polialcohol que puede obtenerse como subproducto de la producción de biodiésel (Quispe et al., 2013), es un plastificante renovable y biocompatible cuya naturaleza higroscópica favorece la retención de humedad y aumenta la flexibilidad al incrementar el espaciado intermolecular dentro de las redes poliméricas. De esta manera, podría mejorar las propiedades mecánicas de los materiales fúngicos (Gao et al., 2006; Appels et al., 2020; Ben et al., 2022).

A pesar de los avances, los materiales derivados de micelio, al igual que los demás materiales biobasados, aún no igualan completamente las propiedades de los materiales convencionales. Sin embargo, el diseño sostenible y optimización de procesos promete superar estas limitaciones y posicionar al micelio como una opción viable en el mercado global de materiales sostenibles (Amobonye et al., 2023). El interés en el micelio fúngico radica no solo en su carácter renovable y biodegradable, sino también en la posibilidad de cultivarlo sobre residuos agroindustriales, lo que agrega valor a subproductos de bajo costo y favorece esquemas de economía circular.

4. Compostaje y biodegradabilidad de materiales fúngicos

La biodegradabilidad constituye uno de los atributos más relevantes de los materiales de base biológica en comparación con los plásticos convencionales. El compostaje ha sido identificado como la tecnología de tratamiento de residuos más relevante disponible para plásticos biodegradables, considerándose como un mecanismo de reciclaje biológico. Durante este proceso la materia orgánica se transforma en CO₂, agua, calor y biomasa en condiciones aeróbicas por acción de microorganismos, generando un material estable, libre de patógenos, que puede aplicarse al suelo (Oviedo-Ocaña et al., 2017; Ribba et al., 2020). Aunque se trata de términos relacionados, los términos

“biodegradable” y “compostable” no pueden ser utilizados indistintamente. El primero describe un proceso, mientras que el otro describe dónde y cuándo el proceso tomará lugar. Todos los plásticos compostables son biodegradables, pero no todos los plásticos biodegradables son compostables. Depende de las condiciones del compost, del tiempo y de si se trata de plantas de compost industriales o domésticas (Krzan et al., 2006).

Para demostrar la compostabilidad de un producto es imprescindible certificar su biodegradabilidad, desintegración, la producción de compost de calidad y que se trata de un residuo orgánico que no aporta metales pesados y ni otras sustancias peligrosas al medio ambiente. La certificación de compostabilidad de materiales plásticos depende en gran medida de las condiciones de tratamiento a las que se los someta. En nuestro país, la norma IRAM 29421:2019, en concordancia con la norma europea EN 13432:2000, establece los requisitos que deben cumplir los materiales para ser considerados compostables en condiciones de compostaje industrial o municipal. Dichas condiciones incluyen temperaturas elevadas ($\approx 58^{\circ}\text{C}$), control de aireación y humedad, y ciclos relativamente cortos de degradación, que permiten alcanzar una biodegradación mínima del 90 % en un plazo máximo de 180 días y una desintegración física en menos de 12 semanas (IRAM, 2019; European Committee for Standardization, 2000).

En contraste, el compostaje doméstico se desarrolla en sistemas de pequeña escala, como composteras hogareñas, que operan a temperaturas ambientales mucho más bajas ($20\text{-}30^{\circ}\text{C}$), con menor control de humedad y oxigenación. En este contexto, los materiales certificados bajo normas de compostaje industrial no siempre logran degradarse completamente (Ribba et al., 2020). Por esta razón, organismos de certificación europeos, como TÜV Austria, desarrollaron el esquema “OK compost HOME”, que contempla tiempos de desintegración más prolongados (hasta 12 meses) y condiciones menos controladas (TÜV Austria, 2012). La Figura 6 muestra algunas certificaciones de compostabilidad disponibles internacionalmente.

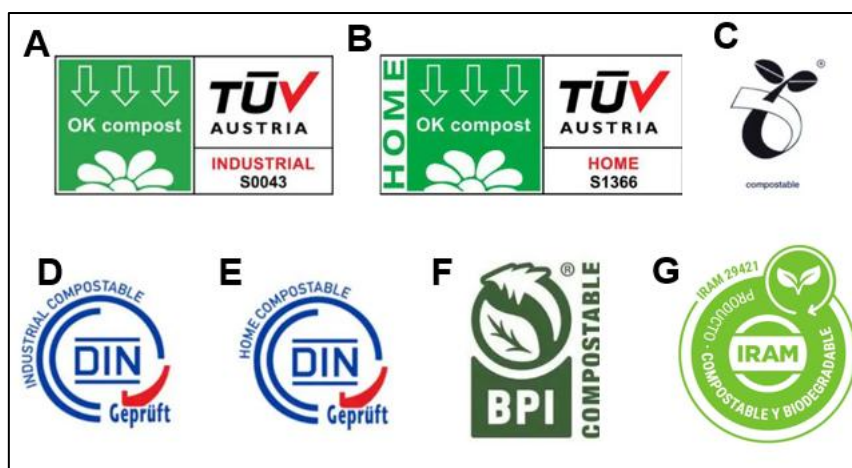


Figura 6. Sellos que identifican a los productos como compostables presentes en diferentes partes del mundo: A-C) Comunidad europea; D-E) Alemania; F) Estados Unidos; G) Argentina.

En general, los materiales de micelio, dada su composición (quitina, β -glucanos y proteínas), son considerados biodegradables y compostables, lo que ofrece una alternativa sostenible para su disposición final. No obstante, actualmente no existen métodos o protocolos estandarizados de biodegradación para los compuestos de micelio. Van Wylick et al. (2022) publicaron un método exploratorio para evaluar la desintegración de materiales de micelio de basidiomicetos en tierra fértil, pero se sabe poco acerca del comportamiento en compost de los materiales de micelio obtenidos a partir de hongos filamentosos. En este contexto, avanzar en la caracterización del comportamiento en compost de los materiales fúngicos resulta esencial para su implementación a gran escala.

5. Cultivo de hongos filamentosos

Para el aprovechamiento biotecnológico de los hongos, es fundamental seleccionar el sistema de cultivo adecuado, ya que las condiciones de crecimiento influyen de manera directa en la morfología, la fisiología y el rendimiento metabólico del hongo (Papagianni, 2004). En términos generales, los hongos filamentosos pueden cultivarse mediante dos modalidades principales: cultivo sumergido, y cultivo en estado sólido. Cada una de ellas presenta ventajas y limitaciones dependiendo del objetivo del proceso y del tipo de metabolito a obtener.

5.1. Cultivo sumergido

El cultivo sumergido de hongos filamentosos se realiza en medios líquidos donde el micelio crece suspendido como micelio disperso o como pellets (rugosos o lisos). Es el sistema más empleado a nivel industrial por la facilidad de control de parámetros como el pH, la temperatura, la aireación y la agitación. Este tipo de cultivo resulta adecuado para la producción de metabolitos extracelulares, como enzimas, ácidos orgánicos o antibióticos, ya que permite un crecimiento rápido y a la posibilidad de mantener condiciones fisiológicas constantes (Papagianni, 2001; Papagianni, 2004; Wucherpfennig et al., 2010; Lu et al., 2024). Dentro de este sistema se distinguen dos modalidades principales: cultivo sumergido estático y cultivo sumergido agitado.

En el cultivo estático, el medio permanece sin agitación ni aireación mecánica, permitiendo un crecimiento superficial del micelio que forma una película o micelio flotante o suspendida en el medio de cultivo. Aunque este método es más simple y de menor costo, puede presentar limitaciones en la transferencia de oxígeno y nutrientes, lo que restringe la productividad la biomasa. Sin embargo, se ha observado que estas condiciones pueden inducir la producción de ciertos metabolitos secundarios asociados a la diferenciación morfológica del micelio (Papagianni, 2004).

En contraste, el cultivo agitado se realiza en sistemas donde el medio es constantemente mezclado y aireado, lo que favorece una mejor distribución del oxígeno y los nutrientes, promoviendo un crecimiento micelial más disperso y homogéneo. La agitación también influye en la morfología fúngica: altas velocidades de cizallamiento tienden a fragmentar las hifas y generar micelio disperso, mientras que condiciones más suaves favorecen la formación de pellets compactos (Wucherpfennig et al., 2010; Lu et al., 2024). Estas diferencias morfológicas afectan directamente la viscosidad del medio, la transferencia de masa y la productividad del proceso.

Por tanto, el cultivo sumergido, ya sea en condiciones estáticas o agitadas, ofrece un marco versátil para la producción de biomasa y metabolitos fúngicos, siempre que se optimicen las variables de cultivo de acuerdo con las características del microorganismo y el producto deseado.

5.2. Cultivo en estado sólido

El cultivo en estado sólido implica el crecimiento del micelio sobre un sustrato sólido húmedo, sin presencia de fase líquida libre. Este sistema es especialmente adecuado para hongos filamentosos, que presentan una afinidad natural por ambientes con baja actividad de agua (Pandey et al., 2000). La matriz sólida donde se produce el crecimiento puede ser tanto una fuente de nutrientes como simplemente un soporte impregnado de los nutrientes adecuados que permiten el desarrollo de los microorganismos (Singhania et al., 2009). Esta forma de cultivo ofrece ventajas como una mayor concentración de producto, menor generación de efluentes y costos de operación reducidos. Además, permite el uso de materiales lignocelulósicos o residuos agroindustriales como soporte y fuente de nutrientes, lo que la convierte en una técnica de cultivo sostenible y económica (Holker et al., 2004; Sadh et al., 2018). Sin embargo, el cultivo en estado sólido a gran escala se ve afectado por factores variables (como el pH, la transferencia de calor y masa, la actividad del agua y la heterogeneidad de los sustratos), que hasta la fecha no se han podido controlar eficazmente (Bakratsas et al., 2021).

5.3. Cultivo en residuos agroindustriales

El aprovechamiento de residuos agroindustriales como sustratos para el cultivo de hongos filamentosos ha cobrado gran relevancia en los últimos años, en el marco de la búsqueda de procesos biotecnológicos más sostenibles y de bajo costo. Estos residuos, provenientes de actividades agrícolas, forestales o alimentarias, como bagazo de caña de azúcar, cascarilla de arroz, pulpa de café o subproductos de la industria frutihortícola, contienen compuestos lignocelulósicos, proteínas, azúcares y minerales que pueden servir simultáneamente como fuente de carbono, nitrógeno y soporte físico para el crecimiento fúngico (Singhania et al., 2009; Sadh et al., 2018; Abd El Aty, 2023).

La valorización de residuos agroindustriales mediante el cultivo fúngico ofrece múltiples beneficios ambientales y económicos. Por un lado, reduce la carga contaminante asociada a la disposición de subproductos orgánicos; por otro, permite la generación de productos de alto valor agregado (Rodríguez Couto y Sanromán, 2006; de Oliveira et al.,

2019, Abd El Aty, 2023). Asimismo, esta estrategia se alinea con los principios de la bioeconomía circular, promoviendo la conversión de desechos en recursos útiles y renovables.

Entre los hongos más utilizados en el cultivo en residuos agroindustriales se destacan especies de los géneros *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Ganoderma* y *Pleurotus*, debido a su alta capacidad enzimática y adaptabilidad a diferentes tipos de sustratos han demostrado una notable capacidad para crecer y transformar estos residuos en productos de valor agregado, como enzimas, o materiales biobasados (Rodríguez Couto y Sanromán, 2006; Jonathan y Oyeleke, 2016; de Oliveira et al., 2019; Rosas-Vega et al. 2025).

En conjunto, el cultivo de hongos filamentosos sobre residuos agroindustriales constituye una estrategia biotecnológica prometedora para el desarrollo de procesos más sustentables, capaces de integrar la gestión de desechos con la obtención de productos innovadores y ambientalmente responsables. En esta misma línea, el aprovechamiento de residuos agroindustriales como sustrato de cultivo de hongos filamentosos constituye una de las estrategias clave para el desarrollo de materiales biobasados sostenibles. Estudios recientes demuestran la viabilidad de este enfoque; sin embargo, requiere un ajuste apropiado de la composición y de las condiciones de cultivo. Se ha demostrado que el uso de residuos agroindustriales en concentraciones entre el 50 % y el 100 % puede introducir factores inhibitorios que afectan el crecimiento de los hongos. Sharma et al. (2025) informaron recientemente sobre la producción de materiales de micelio puro (MMP) utilizando agua de procesamiento agrícola rica en residuos lignocelulósicos como medio de cultivo, ajustando su concentración al 10 % v/v. En este sentido, la valorización del bagazo de cervecería o bagazo cervecero (BC), un subproducto generado en grandes volúmenes a nivel mundial ofrece un enfoque circular para la reutilización de residuos agroindustriales.

5.3.1. Cultivo en bagazo cervecero

La producción de cerveza es un contribuyente significativo a la economía de muchos países, siendo la quinta bebida más consumida en el mundo detrás del té, bebidas

carbonatadas, la leche y el café (Simate et al., 2011). En las últimas décadas se ha producido un gran repunte de las micro cervecías y este desarrollo ha dado lugar a un aumento en los flujos de residuos (Hultberg, y Bodin, 2019). El proceso de producción de cerveza consta de una serie de operaciones unitarias que generan diferentes efluentes. El bagazo de cervecía o bagazo cervecero (BC) es el residuo sólido que queda después de la maceración y el lavado, y consiste principalmente en las cáscaras del grano de cebada y otros compuestos residuales que no se convirtieron en azúcares fermentables durante el proceso de maceración (Aregbesola y Omafuvbe, 2014). El BC es el subproducto más abundante de la industria cervecera, representando cerca del 85 % del total de subproductos generados. Se producen alrededor de 20 kg de bagazo de grano húmedo por cada 100 L de cerveza elaborada. Los principales componentes del bagazo de grano incluyen fibra (30-50 % p/p) y proteína (19-30 % p/p). Actualmente su principal forma de eliminación es su secado y uso como pienso (Xiros et al., 2008; Aliyu y Bala, 2011; Lynch et al., 2016). Otros usos menos frecuentes son la producción de energía por combustión directa o la producción de biogás por fermentación anaeróbica (Mathias et al., 2014). Diversos autores mostraron que el líquido filtrado de este residuo puede ser utilizado como medio de cultivo adecuado para la obtención de biomasa fúngica (Hultberg y Bodin, 2019; Hang et al., 1975). El BC destaca por su abundancia, bajo costo y composición rica en polisacáridos, proteínas y minerales por lo que podría servir como un sustrato alternativo para el cultivo de hongos (Hang et al., 1975; Mussatto et al., 2006).

El empleo de bagazo cervecero en la producción de materiales de micelio ofrecería un doble beneficio: por un lado, disminuyendo los costos del cultivo al reemplazar sustratos comerciales más costosos; por otro, contribuyendo a la economía circular al transformar un desecho de gran volumen en un recurso para la generación de materiales biodegradables de valor agregado.

6. REFERENCIAS

- Abd El Aty, A. A. (2023) Valorization of agro-industrial wastes using fungi for industrial enzymes production. *International Journal of Agricultural and Environmental Research*, 8(6), 1-13. <https://doi.org/10.56355/ijfrst.2023.2.2.0055>
- Ahmad M., Farooq S., Alhamoud Y., Li C., Zhang H. (2022) A review on mycoprotein: History, nutritional composition, production methods, and health benefits. *Trends Food Sci Technol* 121:14-29. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.01.027>
- Aliyu S. y Bala, M. (2011) Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications. *African Journal of Biotechnology*. 10. 324-331
- Amobonye A., Lalung j., Kumar Awasthi M., Pillai S. (2023) Fungal mycelium as leather alternative: A sustainable biogenic material for the fashion industry, *Sustainable Materials and Technologies*, Volume 38, e00724,ISSN 2214-9937, <https://doi.org/10.1016/j.susmat.2023.e00724>
- Appels F.V.W., Van den Brandhof J.G., Dijksterhuis. J, de Kort G.W., Wösten H.A.B. (2020) Fungal mycelium classified in different material families based on glycerol treatment. *Commun Biol* 3:334. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-1064-4>
- Bakratsas, G., Polydera, A., Katapodis, P., Stamatis, H. (2021) Recent trends in submerged cultivation of mushrooms and their application as a source of nutraceuticals and food additives. *Future Foods*, 4, 100086. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100086>
- Barnes, D. K. A., Galgani, F., Thompson, R. C., y Barlaz, M. (2009) Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 1985–1998. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0205>
- Baxter, S., Zivanovic, S. y Weiss, J. (2005) Molecular weight and degree of acetylation of high-intensity ultrasonicated chitosan. *Food Hydrocolloids* 19:821–830
- Ben Z.Y, Samsudin H., Yhaya M.F. (2022) Glycerol: Its properties, polymer synthesis, and applications in starch based films. *Eur Polym J* 175:111377. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.111377>

- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J. C., Gerds, M. L., Hammes, W. P., ... y Corthier, G. (2012) Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology*, 154(3), 87-97. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.030>
- Bowman, S. M., y Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*, 28(8), 799–808. <https://doi.org/10.1002/bies.20441>
- César E., Canche-Escamilla G., Montoya L., Ramos A., Duarte-Aranda S., Bandala V. (2021) Characterization and physical properties of mycelium films obtained from wild fungi: Natural materials for potential biotechnological applications. *J Polym Environ* 29:4098–4105. <https://doi.org/10.1007/s10924-021-02178-3>
- Chávez R., Fierro F., García Rico R.O., Laich F. (2011) Mold-fermented foods: *Penicillium* spp. as ripening agents in the elaboration of cheese and meat products In: Leitão AL (Ed.), *Mycofactories*, Bentham Science Publishers Ltd. 73-98. <https://doi.org/10.2174/978160805223311101010073>
- Chisti, Y., y Moo-Young, M. (1986). Disruption of microbial cells for intracellular products. *Enzyme and Microbial Technology*, 8(4), 194–204. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(86\)90087-6](https://doi.org/10.1016/0141-0229(86)90087-6)
- Coma M.E., Peltzer M.A., Delgado J.F., Salvay A.G. (2019) Water kefir grains as an innovative source of materials: Study of plasticiser content on film properties. *Eur Polym J* 120, 109234. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.109234>
- Delgado J.F., Peltzer M.A., Salvay A.G., de la Osa O., Wagner J.R. (2018) Characterization of thermal, mechanical and hydration properties of novel films based on *Saccharomyces cerevisiae* biomass. *Innov Food Sci Emerg Technol* 48: 240-247. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.06.017>.
- Delgado J.F., Salvay A., de la Osa O., Wagner J., Peltzer M.A. (2021) Impact of the film-forming dispersion pH on the properties of yeast biomass films. *J Sci Food Agric* 101: 5636-5644. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11216>.
- Delgado J.F., Sceni P., Peltzer M.A., Salvay A.G., de la Osa O., Wagner J.R. (2016) Development of innovative biodegradable films based on biomass of *Saccharomyces cerevisiae*. *Innov Food Sci Emerg Technol* 36: 83-91. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.06.002>.

- El-Enshasy A. (2007) Chapter 9 - Filamentous Fungal Cultures – Process Characteristics, Products, and Applications In: Yang ST (Ed.) *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*, Elsevier, 225-261, ISBN 9780444521149. <https://doi.org/10.1016/b978-044452114-9/50010-4>
- Elsacker E., Vandeloock S., Brancart J., Peeters E., De Laet L. (2019) Mechanical, physical and chemical characterisation of mycelium-based composites with different types of lignocellulosic substrates. *PLoS ONE* 14, e0213954. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213954>.
- Elsacker E., Vandeloock S., Peeters E. (2023) Recent technological innovations in mycelium materials as leather substitutes: a patent review, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 11, 1204861, <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1204861>
- European Committee for Standardization. (2000). EN 13432:2000. Packaging – Requirements for packaging recoverable through composting and biodegradation. CEN.
- Gao C., Stading M., Wellner N., Parker M.L., Noel T.R., Mills E.N.C. Belton P.S. (2006) Plasticization of a protein-based film by glycerol: A spectroscopic, mechanical, and thermal study. *J Agric Food Chem* 54:4611–4616. <https://doi.org/10.1021/jf060611w>
- Geyer, R., Jambeck, J. R., y Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3(7), e1700782. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>
- Geyer, R., Kuczenski, B., Zink, T., y Henderson, A. (2015). Common misconceptions about recycling. *Journal of Industrial Ecology*, 20(5), 1010–1017. <https://doi.org/10.1111/jiec.12355>
- Gomes, T. A., Zanette, C. M., y Spier, M. R. (2020) An overview of cell disruption methods for intracellular biomolecules recovery. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 50(7), 635-654. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1728696>
- Guerrero, A., Carvalho, C.B., Madrona, G. S., Cestari L. A., Scapin, M.R.S., y Prado I. N. (2015) Envases alternativos biodegradables y activos con aceites esenciales para productos cárnicos. *Eurocarne*, 238, 45-52.
- Haneef M., Ceseracciu L., Canale C., Bayer I.S., Heredia-Guerrero J.A., Athanassiou A. (2017) Advanced materials from fungal mycelium: fabrication and tuning of

physical properties. Sci Rep 24 (7) 41292. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.10.006>.

- Hang, Y. D., Splittstoesser, D. F., y Woodams, E. E. (1975). Utilization of brewery spent grain liquor by *Aspergillus niger*. Applied microbiology, 30(5), 879–880.
- Holker, U., Höfer, M., y Lenz, J. (2004) Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. Applied Microbiology and Biotechnology, 64(2), 175–186. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1504-3>
- Hong S.B., Kim D.H., Samson R.A. (2015) *Aspergillus* Associated with Meju, a Fermented Soybean Starting Material for Traditional Soy Sauce and Soybean Paste in Korea. Mycobiology 43(3):218-24. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2015.43.3.218>
- Hultberg, M. y Bodin, H. (2019) Fungi-based treatment of real brewery waste streams and its effects on water quality. Bioprocess and Biosystems Engineering. 42:1317–1324. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02130-9>
- IRAM. (2019). IRAM 29421:2019. Materiales plásticos biodegradables y/o compostables-Requisitos para su valoración mediante compostaje. Instituto Argentino de Normalización y Certificación.
- Jiang L., Walczyk D., McIntyre G., Bucinell R., Tudryn G. (2017) Manufacturing of biocomposite sandwich structures using mycelium-bound cores and preforms. J Manuf Process 28: 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.jmapro.2017.04.029>.
- Jonathan S. G., y Oyeleke, S. G. (2016) Fungal Biodegradation of Agro-Industrial Waste. In book: Cellulose - Biomass Conversion (pp. 1-22). Springer. <http://dx.doi.org/10.5772/56464>
- Jones M., Mautner A., Luenco S., Bismarck A., John S. (2020) Engineered mycelium composite construction materials from fungal biorefineries: A critical review. Mater Des, 108397. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2019.108397>
- Krzan, A., Hemjinda, S., Miertus, S., Corti, A., y Chiellini, E. (2006) Standardization and certification in the area of environmentally degradable plastics. Polymer Degradation and Stability, 91(12), 2819–2833. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2006.04.034>
- Kumar A., Chadha S., Rath D. (2021) Chapter 17 - CRISPR-Cas9 system for functional genomics of filamentous fungi: applications and challenges, In: Kumar Sharma V, Shah M, Parmar S, Kumar A (Eds.) Fungi Bio-Prospects in Sustainable Agriculture,

Environment and Nano-technology, Academic Press, pp 541-576, ISBN 9780128217344. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821734-4.00016-2>

- Kuorwel K.K., Cran M.J., Sonneveld K., Miltz J., Bigger S.W. (2011) Antimicrobial activity of biodegradable polysaccharide and protein based films containing active agents. *J Food Sci* 76(3): R90–R102. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02102.x>
- Li, K., Qiao, K., Xiong, J., Guo, H., y Zhang, Y. (2023). Nutritional values and bio-functional properties of fungal proteins: Applications in foods as a sustainable source. *Foods*, 12(24), 4388. <https://doi.org/10.3390/foods12244388>
- López Nava J.A., Méndez González J., Ruelas Chacón X., Nájera Luna J.A. (2015) Assessment of Edible Fungi and Films Bio-Based Material Simulating Expanded Polystyrene. *Mater Manuf Process* 31(8): 1085–1090. <https://doi.org/10.1080/10426914.2015.1070420>
- Lu, Z., Chen, Z., Liu, Y., Hua, X., Gao, C., y Liu, J. (2024) Morphological engineering of filamentous fungi: Research progress and perspectives. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(6), 1197–1205. <https://doi.org/10.4014/jmb.2402.02007>
- Lynch, K. Steffen, E. y Arendt, E.(2016) Brewers' spent grain: A review with an emphasis on food and health. *Journal of the Institute of Brewing*. 122. <http://dx.doi.org/10.1002/jib.363>.
- Mahajan, M., Murugesan, K., Thirumullaivoyal, G. N., Shanmugaselvam, G. L., Pugazh, S., y Balasubramanian, B. (2023) Biodegradable polymers – research and applications. *Physical Sciences Reviews*.
- Mathias, T. R. dos S., de Mello, P. P. M., y Sérvulo, E. F. C. (2014) Solid wastes in brewing process: A review. *Journal of Brewing and Distilling*, 5(1), 1-9.
- Moavro A., Sanchez-Díaz M., Zampatti M., Castells M., Delfederico L., Wagner J., Ludemann V. (2020) Stuffed cheese with superficial *Penicillium nalgiovense* development: Role of microperforated film packaging in the ripening process. *Int Dairy J* 110, 104813. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104813>
- Mussatto, S.I., Dragone, G. and Roberto, I.C. (2006) Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. *J. Cereal. Sci.* 43, 1–14.
- Oliveira, F., Melo, M. R., y Buzato, J. B. (2020) Effect of agro-industrial residues mixtures on the production of endoglucanase by *Aspergillus niger* in solid state

fermentation. Acta Scientiarum. Technology, 42.
<https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v42i1.41358>

- Oviedo-Ocaña, E.R., Marmolejo-Rebellon, L.F., y Torres-Lozada, P. (2017) Avances en investigación sobre el compostaje de biorresiduos en municipios menores de países en desarrollo. Lecciones desde Colombia. Ingeniería, investigación y tecnología, 18(1), 31-42.
- Pan, H., Jiang B., Chen J., Jin Z. (2014) Blend-modification of soy protein/lauric acid edible films using polysaccharides. Food Chem 151: 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.075>
- Pandey, A., Soccol, C. R., Mitchell, D. (2000) New developments in solid state fermentation: I–bioprocesses and products. Process Biochemistry, 35(10), 1153–1169.
- Papagianni, M., (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelia processes. Biotech. Adv., 22: 189-259.
- Papagianni, M., Nokes S., y Filer K. (2001). Submerged and solid-state phytase fermentation by *Aspergillus niger*: Effects of agitation and medium viscosity on phytase production, fungal morphology and inoculum performance. Food Technol. Biotechnol. 39, 319–326.
- Parhizi, Z.; Dearnaley, J.; Kauter, K.; Mikkelsen, D.; Pal, P.; Shelley, T.; Burey, P. (2025) The Fungus Among Us: Innovations and Applications of Mycelium-Based Composites. J. Fungi 2025, 11, 549. <https://doi.org/10.3390/jof11080549>
- Pelletier M.G., Holt G.A., Wanjura J.D., Greetham L., McIntyre G., Bayer E., Kaplan-Bie J. (2019) Acoustic evaluation of mycological biopolymer, an all-natural closed cell foam alternative. Ind Crops Prod 139, 111533.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111533>
- Peltzer M.A., Delgado J.F., Salvay A.G., Wagner J.R. (2017) β -Glucan, a promising polysaccharide for bio-based films developments for food contact materials and medical applications. Curr. Org Chem. 22: 1249–1254.
<https://doi.org/10.2174/1385272822666171129153633>
- Quispe C.A, Coronado C.J., Carvalho J.A. Jr (2013) Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. Renew Sust Energ Rev 27:475–493.

- Ramírez Tapias Y.A., Di Monte M.V., Peltzer M.A., Salvay A.G. (2022) Bacterial cellulose films production by Kombucha symbiotic community cultured on different herbal infusions. *Food Chem* 372:131346. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131346>.
- Ribba, L., Ochoa-Yepes, O., Díaz, E. D., y Goyanes, S. (2020) Alternativas a los plásticos convencionales: las dos caras de los plásticos verdes. *Residuos plásticos en Argentina* (pp. 43–63).
- Rillig, M. C. (2012) Microplastic in terrestrial ecosystems and the soil? *Environmental Science y Technology*, 46(12), 6453–6454. <https://doi.org/10.1021/es302011r>
- Rodríguez Couto, S., y Sanromán, M. A. (2006). Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal*, 22(3), 211–219.
- Rosas-Vega, F. E., Pozzan, R., Martínez-Burgos, W. J., Letti, L. A. J., Gruening de Mattos, P. B., Ramos-Neyra, L. C., Dudeque, G. S., & Bittencourt, G. A. (2025) Enzymes Produced by the Genus *Aspergillus* Integrated into the Biofuels Industry Using Sustainable Raw Materials. *Fermentation*, 11(2), 62. <https://doi.org/10.3390/fermentation11020062>
- Ruiz-Herrera, J., y Ortiz-Castellanos, L. (2019). Cell wall glucans of fungi: A review. *The Cell Surface*, 5, 100022. <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2019.100022>
- Rujnić-Sokele, M., y Pilipović, A. (2017) Challenges and opportunities of biodegradable plastics: A mini review. *Waste Management & Research*, 35(2), 132–140. <https://doi.org/10.1177/0734242X16683272>
- Sadh, P. K., Duhan, S., y Duhan, J. S. (2018) Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresources and Bioprocessing*
- Samson R.A., Eckardt C., Orth R. (1977) The taxonomy of *Penicillium* species from fermented cheeses. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 43 (3-4): 341-50. <https://doi.org/10.1007/BF02313761>
- Sharma M., Fleischmann L., McInnis M., Rodriguez-Urbe A., Misra M., Lim L.T., Kaur G. (2025) Pure mycelium materials production from agri-processing water: Effects of feedstock composition on material properties for packaging applications. *Water Environ Res* 97:e70089. <https://doi.org/10.1002/wer.70089>

- Simate, G.S.; Cluett, J.; Iyuke, S.L.; Musapatika, E.T.; Ndlovu, S.; Walubita, L.F.; Alvarez, A.E. (2011) The treatment of brewery wastewater for reuse: State of the art. *Desalination*, 273, 235-247.
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Soccol, C. R., y Pandey, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1), 13–18.
- Svanström, Å., van Leeuwen, R., Dijksterhuis, J., y Melin, P. (2014) Trehalose synthesis in *Aspergillus niger*: Characterization of six homologous genes, all with conserved orthologs in related species. *BMC Microbiology*, 14(1), 90. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-90>
- TÜV Austria. (2012) OK compost HOME: Home compostability of products. TÜV Austria.
- Van Wylick A., Elsacker E., Yap L.L., Peeters E., de Laet L. (2022) Mycelium Composites and their Biodegradability: An Exploration on the Disintegration of Mycelium-Based Materials in Soil. *Construction Technologies and Architecture*. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/cta.1.652>
- Wagner, M., Scherer, C., Alvarez-Muñoz, D., Brennholt, N., Bourrain, X., Buchinger, S., Fries, E., Grosbois, C., Klasmeier, J., Marti, T., Rodriguez-Mozaz, S., Urbatzka, R., Vethaak, A. D., Winther-Nielsen, M., y Reifferscheid, G. (2014) Microplastics in freshwater ecosystems: What we know and what we need to know. *Environmental Sciences Europe*, 26(12), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12302-014-0012-7>
- Wang, W., Chen, W., Zou, M., Lv, R., Wang, D., Hou, F., ...y Liu, D. (2018) Applications of power ultrasound in oriented modification and degradation of pectin: A review. *Journal of Food Engineering*, 234, 98–107.
- Wattanavichean N., Phanthuwongpakdee J., Koedrith P., Laoratanakul P., Thaithatgoon B., Somrithipol S., Kwantong P., Nuankaew S., Pinruan U., Chuaseeharonnachai C., Boonyuen N. (2025) Mycelium-based break throughs: Exploring commercialization, research, and next-gen possibilities. *Circ Econ Sustain*. <https://doi.org/10.1007/s43615-025-00539-x>
- Wucherpfennig, T., Kiep, K. A., Driouch, H., y Wittmann, C. (2010) Morphology and rheology in filamentous cultivations. En *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 72, pp. 89-136). [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(10\)72004-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(10)72004-9)

- Xiros, C., Topakas, E., Katapodis, P., and Christakopoulos, P. (2008) Hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain by *Neurospora crassa*. *Bioresour. Technol.* 99,5427-5435
- Yang L., Park D., Qin Z. (2021) Material Function of Mycelium-Based Bio-Composite: A Review. *Front Mater* 8, 737377. [http://doi.org/ 10.3389/fmats.2021.737377](http://doi.org/10.3389/fmats.2021.737377)
- Zhang, L., Ye, X., Xue, S.J., Zhang, X., Liu, D., Meng, R., Chen, S., (2013) Effect of high-intensity ultrasound on the physicochemical properties and nanostructure of citrus pectin. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 93: 2028-2036. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6011>
- Zhao, F.; Wang, Z.; Huang, H. (2024) Physical Cell Disruption Technologies for Intracellular Compound Extraction from Microorganisms. *Processes*, 12, 2059. <https://doi.org/10.3390/pr12102059>

❖ **Páginas web**

- Adidas. (2021) Desde el suelo: cómo Adidas recreó un ícono usando la parte "oculta" de las raíces de los hongos. <http://adidas.com.ar/blog/663481-desde-el-suelo-como-adidas-recreo-un-icone-usando-la-parte-oculta-de-las-raices-de-los-hongos> (Consultada el 02/09/25).
- AMSilk. (2016) Adidas unveils world's first performance shoe made from AMSilk's Biosteel® fiber. <https://www.amsilk.com/adidas-unveils-worlds-first-performance-shoe-made-from-amsilks-biosteel-fiber/> (Consultada el 02/09/25).
- Coca-Cola Company. (2015) Coca-Cola produces world's first PET bottle made entirely from plants. The Coca-Cola Company. <https://investors.coca-colacompany.com/news-events/press-releases/detail/763/coca-cola-produces-worlds-first-pet-bottle-made-entirely-from-plants> (Consultada el 02/09/25).
- Ecovative. (2024) We grow better materials. <https://ecovative.com>. (Consultada 30/09/2025).
- European Bioplastics. (2023) EUBP unveils the results of the 2023 Market Data Report. European Bioplastics. <https://www.european-bioplastics.org/eubp-unveils-the-results-of-the-2023-market-data-report/> (Consultada el 02/09/25).

- Mycorium Biotech. (2025) Not leather. Not plastic. Just Mycorium. <https://www.mycoriumbiotech.com>. (Consultada 30/09/2025).
- MycoWorks. (2025) Grow the future of materials. <https://www.mycoworks.com/> (Consultada 30/09/2025).
- NatureWorks. (2025) *Ingeo technology*. NatureWorks LLC. <https://www.natureworkslLC.com/technology-and-products/ingeo-technology> (Consultada el 02/09/25).
- Packhelp. (2025) Estudio de caso: ¿Embalaje sostenible a base de hongos? El revolucionario concepto de cadena de suministro de IKEA. Packhelp. <https://packhelp.es/case-study/embalaje-sostenible-a-base-de-hongos-de-ikea> (Consultada el 02/09/25).
- PepsiCo. (2018) PepsiCo tests compostable snack packaging. PepsiCo Sustainability Report. <https://www.pepsico.com/our-impact/esg-topics-a-z/packaging>
- The Food Tech. (2024) Retos y soluciones en la implementación de empaques biodegradables en alimentos. The Food Tech. <https://thefoodtech.com/empaque/retos-y-soluciones-en-la-implementacion-de-empaque-biodegradables-en-alimentos> (Consultada el 02/09/25).

OBJETIVO



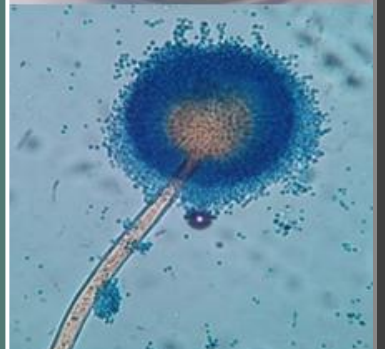
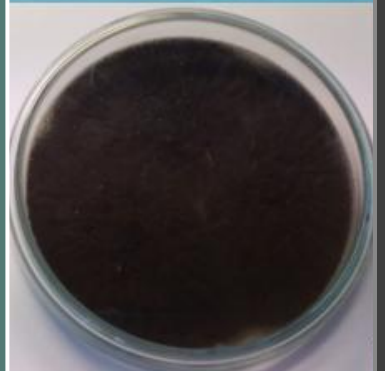
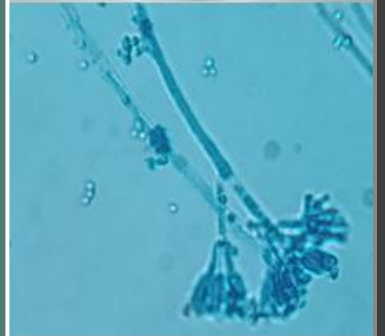
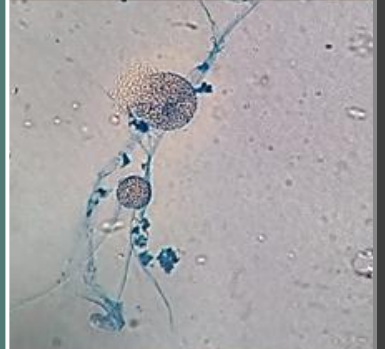
Teniendo en cuenta que:

- ❖ La biomasa fúngica constituye una fuente renovable y versátil de compuestos filmogénicos.
- ❖ Su aprovechamiento como materiales no solo puede reducir la dependencia de polímeros derivados del petróleo, sino que también puede representar una estrategia de valorización de residuos agroindustriales.
- ❖ En nuestro grupo de trabajo se han realizado pruebas preliminares cuyos resultados fueron prometedores en cuanto al desarrollo de películas de micelio.
- ❖ Actualmente el desarrollo de materiales basados en hongos se orienta casi exclusivamente al uso de basidiomicetes macroscópicos. Por lo que el uso de hongos filamentosos microscópicos resulta innovador y podría representar grandes oportunidades para el desarrollo de nuevos materiales biobasados.

El objetivo general de este trabajo de Investigación fue obtener y caracterizar materiales biodegradables a partir de biomasa integral de hongos filamentosos

El presente trabajo busca aportar al campo del desarrollo de materiales fúngicos mediante un abordaje integral. De este modo, no solo contribuye al desarrollo de nuevos materiales biobasados, sino que también se alinea con los objetivos de sostenibilidad, economía circular y reducción del impacto ambiental.

CAPÍTULO I: OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE DISPERSIONES FILMOGÉNICAS



1. OBJETIVO

El objetivo de este capítulo fue obtener y caracterizar dispersiones filmogénicas a partir de micelio de hongos filamentosos obtenidas luego de diferentes tratamientos de ruptura celular. Para ello, se propuso:

- Reactivar y confirmar la identidad de las cepas de trabajo.
- Optimizar las condiciones de cultivo para la obtención de biomasa y evaluar la composición de sus principales compuestos filmogénicos.
- Analizar el efecto de distintos tratamientos de ruptura celular en la obtención de dispersiones filmogénicas mediante microscopía óptica y distribución del tamaño de partícula.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Confirmación de identidad de las cepas de trabajo

Se trabajó con especies fúngicas no productoras de micotoxinas: *Aspergillus niger* (AN), *Penicilium nalgiovense* (PN), *Penicilium camemberti* (PC), *Geotrichum candidum* (GC), y *Mucor hiemalis* (MH), que se obtuvieron del cepario del laboratorio de Micología de Alimentos de la Universidad Nacional de Quilmes (Tabla 2). Dichos hongos se reactivaron haciéndolos crecer en medio Agar papa dextrosa (PDA) (Anexo I) por 7 días a 25 °C, con excepción de *Aspergillus niger* que se incubó a 37 °C de acuerdo con sus temperaturas óptimas de crecimiento (Pitt y Hocking, 2009). Los cultivos se mantuvieron en placas de Petri a 4 °C, disponibles para su posterior uso.

Microrganismo	ID	Origen
<i>Aspergillus niger</i>	ASN1	Cepario-UBA, CABA, Bs. As.
<i>Penicilium nalgiovense</i>	PEN 8	Salame artesanal/ Caroya, Córdoba
<i>Penicilium camemberti</i>	PEN 25	Starter comercial Choozit™ Danisco
<i>Geotrichum candidum</i>	GEC 1	Contaminante natural de Queso Gruyere
<i>Mucor hiemalis</i>	MUH	Salame artesanal/ Caroya, Córdoba

Tabla 2. Cepas de trabajo

Se realizó la confirmación de identidad de las cepas de trabajo reactivadas, según Pitt y Hocking (2009). Para ello, los cultivos se sembraron con ansa aguja, en tres medios diferentes (Anexo I): Agar Czapek Extracto de Levadura (CYA), Agar Extracto de Malta (MEA) y Agar Nitrato 25 % Glicerol (GN25), y se incubaron a tres temperaturas distintas (5 °C, 25 °C y 37 °C), de acuerdo como se ilustra en la Figura 7. Las placas se incubaron por siete días. Luego de la incubación se procedió a la observación de las características macroscópicas de las colonias (color del anverso y reverso, diámetro, presencia de pigmentos y exudados, textura). La observación de las características microscópicas se realizó mediante un microscopio Nikon modelo Eclipse E200 utilizando el objetivo de 40X. La estructura de los conidios se observó utilizando el objetivo de 100X. Para ello se realizaron preparados con tinción con azul de algodón (Anexo I) a partir de las colonias aisladas en CYA.

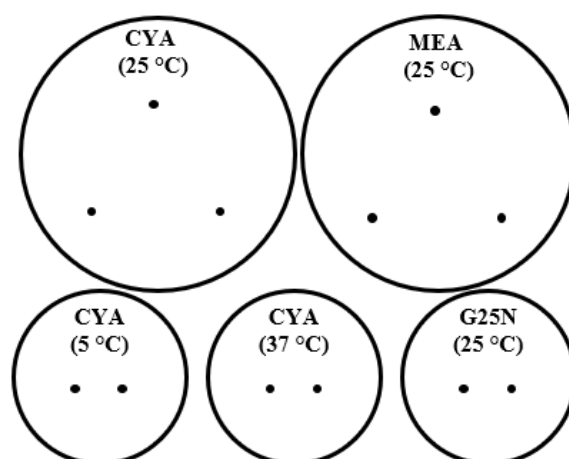


Figura 7. Esquema de identificación adaptado de Pitt y Hocking (2009).

2.2. Obtención de biomasa

2.2.1. Preparación del inóculo

Las cepas de trabajo (*A. niger*, *P. nalgiovense*, *P. camemberti*, *G. candidum* y *M. hiemalis*) se incubaron por 7 días a 25 °C, exceptuando a *A. niger* que se incubó a 37 °C, de acuerdo con su temperatura óptima de crecimiento. Se preparó una suspensión de conidios de cada microorganismo en el orden de 10^8 conidios/mL para ser utilizada como inóculo en los ensayos de obtención de biomasa. Para ello, se recogieron con ansa ojal conidios a

partir de las colonias crecidas en medio de cultivo agar PDA y se los suspendió en un tubo con agua destilada estéril con Tween 80 al 0,01 % p/p. El recuento de la suspensión se realizó mediante cámara de Neubauer (Anexo II). Se realizaron las diluciones correspondientes hasta lograr ajustarla a la concentración deseada.

2.2.2. Cultivo sumergido

Se realizó un primer screening con el objetivo de evaluar el impacto de la agitación en la producción de biomasa. Se colocaron 250 mL de medio cultivo Caldo Sabouraud glucosado con modificaciones (CSGM) (Anexo I) en Erlenmeyers de 500 mL de capacidad y se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121 °C. Se registró el valor del pH del medio atemperado luego de la esterilización mediante un pH-metro TPA-V con electrodo ALPHA PY41 (Altronix, Buenos Aires, Argentina).

Se inocularon 6 Erlenmeyer con cada microorganismo a evaluar con una concentración final aproximada de 10^6 conidios/mL. Se evaluó el efecto de la agitación en la producción de biomasa fúngica. Para ello la mitad de los Erlenmeyer (3 por cada microorganismo) se incubaron en un agitador shaker orbital marca SONTEC OS22 (Sontec Científica, Buenos Aires, Argentina) durante 7 días a 135 rpm a 25 °C excepto por *A. niger* que se incubó a 37 °C. Los tres Erlenmeyers restantes se incubaron en condiciones estáticas durante 7 días a las temperaturas indicadas para cada microorganismo. Luego de la incubación todos los cultivos se esterilizaron en autoclave durante 15 minutos a 121 °C, para asegurar que la biomasa fúngica no esté activa en el momento de su tratamiento, manteniendo de esta forma las buenas prácticas de laboratorio. El micelio se recolectó por filtración con vacío en Kitasato utilizando papel de filtro Whatman N° 1. La biomasa filtrada se pesó para determinar la biomasa húmeda total producida. En todos los casos la biomasa obtenida se reservó hasta su uso conservándola a -18 °C. Se determinó el extracto seco de la biomasa obtenida filtrada por secado en estufa a 105 ± 2 °C hasta peso constante (AOAC 925.10). Para ello, en una cápsula (seca y previamente pesada) se pesó exactamente 1-3 g de la muestra y se secó en una estufa SL60SDB (SAN JOR, Buenos Aires, Argentina) hasta peso constante (diferencia entre dos pesadas sucesivas no mayor a 2 mg o aumento de peso entre pesadas sucesivas). El porcentaje de extracto

seco se determinó de acuerdo con la Ecuación 1. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

$$\%Extracto\ seco = 100 \cdot \frac{(m_2 - m_0)}{(m_1 - m_0)} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde,

m_0 : peso (g) de la cápsula vacía después del secado.

m_1 : peso (g) de la cápsula y la muestra antes de secar.

m_2 : peso (g) de la cápsula y la muestra después de secado

Además, se calculó el rendimiento para cada hongo en gramos de biomasa seca total producida por litro de medio de cultivo mediante la siguiente ecuación:

$$Rendimiento\ biomasa\left(\frac{g}{L}\right) = \frac{Biomasa\ seca\ total\ obtenida\ (g)}{Volumen\ del\ medio\ (mL)} \times 1000\ mL/L \quad (\text{Ecuación 2})$$

El pH del medio de cultivo al final de la incubación se midió utilizando un pH-metro TPA-V con un electrodo de pH ALPHA PY41 (Altronix, Buenos Aires, Argentina).

2.2.3. Cultivo en medio sólido

Se determinó la producción de biomasa en cultivo sólido sintético. Para ello, con el objetivo de facilitar la separación del micelio fúngico del medio sólido, se evaluó el cultivo sobre membranas de papel de filtro de acuerdo con lo reportado en experiencias anteriores de nuestro grupo de trabajo (Ludemann et al., 2010). Se cortaron membranas de papel de filtro Whatman N°1 con forma circular del diámetro de la base de las placas de Petri de 94 mm y se procedió a esterilizarlas en estufa (180 °C, 6 h). Se prepararon placas de Petri estériles con 30 g de agar Sabouraud glucosado con modificaciones (Anexo I). Una vez solidificado el agar, se colocaron superficialmente las membranas esterilizadas y previamente pesadas, asegurándose que queden bien adheridas sobre la superficie del agar y evitando la presencia de burbujas. Se inoculó 1 mL de una suspensión de 10^7 conidios/mL de cada microorganismo preparada según ítem 2.2.1 del presente capítulo. Las placas se incubaron por 7 días a 25 °C para *Penicilium nalgiovense*,

Penicilium camemberti, *Geotrichum candidum* y *Mucor hiemalis* y a 37 °C para *Aspergillus niger*.

Finalizada la incubación, las membranas se removieron del agar con la ayuda de pinzas estériles y se pesaron. Para determinar la biomasa húmeda total producida se procedió a restar el peso del filtro. Las membranas junto con la biomasa se colocaron en placas de Petri y estas dentro de bolsas de autoclave y se esterilizaron durante 15 minutos a 121 °C. Posteriormente, se determinó el porcentaje de extracto seco (%ES) de las biombras fúngicas obtenidas por secado en estufa hasta peso constante (SL60SDB, SAN JOR, Buenos Aires, Argentina) restando el peso del filtro seco (Ecuación 3). El ensayo se realizó por triplicado.

$$\%Extracto\ seco = 100 \cdot \frac{(m_2 - m_{PS} - m_0)}{(m_1 - m_{PH} - m_0)} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde,

m_0 : peso (g) de la cápsula vacía después del secado.

m_1 : peso (g) de la cápsula y la muestra antes de secar.

m_{PH} : peso (g) del filtro antes de secar.

m_2 : peso (g) de la cápsula y la muestra después de secado

m_{PS} : peso (g) del filtro seco (Se calculó teniendo en cuenta el %ES del papel de filtro estéril).

Se calculó el rendimiento como gramos de biomasa producida (en base seca; b.s) sobre kilogramo (Ecuación 4).

$$Rendimiento\ biomasa \left(\frac{g}{kg} \right) = \frac{Biomasa\ seca\ total\ obtenida\ (g)}{Masa\ del\ medio\ (g)} \times 1000\ g/kg \quad (\text{Ecuación 4})$$

2.2.4. Determinación de principales componentes filmogénicos

Los hongos presentan una composición bioquímica compleja, en la que predominan los polisacáridos y las proteínas como componentes fundamentales de su biomasa total. En conjunto, la combinación de estos componentes confiere a los hongos una estructura altamente organizada, resistente y adaptable, clave para su supervivencia en diversos ambientes y que puede ser de utilidad en el desarrollo de materiales basados en micelio.

Se realizó la caracterización de la biomasa de los hongos seleccionados *P. nalgiovense*, *M. hiemalis* y *A. niger* en sus componentes filmogénicos principales: proteínas y polisacáridos, expresados como carbohidratos totales, y la cuantificación específica glucanos. Los resultados se expresaron en base seca, para ello se determinó el porcentaje de extracto seco de cada biomasa por el método de secado en estufa a 105 °C hasta peso constante (AOAC 925.10).

2.2.4.a. Proteína cruda

El contenido de proteína cruda en las biomasas fúngicas se determinó mediante el método Kjeldahl (AOAC 2001.11) utilizando un equipo Kjelttec (Kjelttec™ 8100, FOSS, Hillerød, Dinamarca). Este método permite determinar la cantidad de nitrógeno en una muestra y, por ende, estimar el contenido de proteínas, utilizando un proceso de tres pasos: digestión (conversión del nitrógeno en sulfato amónico), destilación (liberación y recolección del amoníaco en ácido bórico) y titulación (valoración del amoníaco para cuantificar el nitrógeno). Para la determinación se agregaron aproximadamente 500 mg de cada muestra, 2 catalizadores Kjeltabs y 17 mL de H₂SO₄ al 98 % en tubos de digestión y se digirieron a 420 °C durante 60 min (FOSS Tecator DT2508 Digestor 8, FOSS, Hillerød, Dinamarca). Las muestras destilaron, se recolectaron en ácido bórico al 4 % y se titularon con HCl 0,1 N. El nitrógeno total se calculó mediante la Ecuación 5.

$$N_T \left(\frac{g}{100g} \right) = \left[\frac{(V_M - V_B) \cdot N_{\text{ácido}} \cdot P_{eqN}}{M} \right] \cdot 100 \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde,

V_M : volumen (mL) de ácido gastados para titular la muestra.

V_B : volumen (mL) de ácido gastados para titular el blanco.

$N_{\text{ácido}}$: concentración (normalidad) del H₂SO₄ utilizado en la titulación.

P_{eqN} : peso equivalente del nitrógeno= 0,014007 (en g de nitrógeno/miliequivalente)

M : peso (g) del de la muestra.

El contenido de proteína cruda se estimó con un factor de conversión ($F_{n \rightarrow p}$) de 6,25 mediante la Ecuación 6. Todas las muestras se analizaron por duplicado.

$$\text{Proteína cruda } \left(\frac{g}{100g} \right) = N_T \left(\frac{g}{100g} \right) \cdot F_{N \rightarrow P} \quad (\text{Ecuación 6})$$

2.2.4.b. Carbohidratos

Carbohidratos totales

Los carbohidratos totales se determinaron por el método del fenol-ácido sulfúrico (Dubois et al., 1956). El principio básico de este método es que los carbohidratos, cuando se deshidratan por reacción con ácido sulfúrico concentrado, producen derivados del furfural los cuales al reaccionar con el fenol desarrollan un color detectable (Quero-Jiménez et al., 2019). En este estudio se prepararon dispersiones fúngicas con agua destilada para estar en un rango de entre 10-70 carbohidratos $\mu\text{g/mL}$. Las dispersiones se trataron con ultrasonido durante 15 minutos para obtener muestras homogéneas. Se utilizó una curva de calibración con las siguientes concentraciones de glucosa: 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 $\mu\text{g/mL}$. Todas las soluciones se ensayaron por triplicado. Una alícuota de 0,8 mL de una solución de carbohidratos se mezcló con 0,4 mL de una solución acuosa de fenol al 5 % p/v en un tubo de ensayo. Luego, se agregaron rápidamente a la mezcla 2 mL de ácido sulfúrico concentrado (98 % p/p). Los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego se agitaron en vórtex durante 30 segundos y se colocaron durante 20 min en un baño de agua a 37 °C para el desarrollo del color. Transcurrido el tiempo de incubación, las muestras se midieron a 490 nm en un fotómetro T60 UV/VIS (PG Instruments, Leicestershire, Reino Unido) frente a un blanco de reactivo preparado de forma idéntica a la de la muestra, excepto que la alícuota de 0,8 mL de muestra se reemplazó por agua destilada. Todas las muestras se analizaron por triplicado. Los carbohidratos totales se obtuvieron mediante la Ecuación 7.

$$\text{Carbohidratos totales } (g/l) = f.d. \cdot \frac{(Abs_{muestra} - C)}{(m)} \quad (\text{Ecuación 7})$$

Donde $Abs_{muestra}$ corresponde a la absorbancia de la muestra a 490 nm; C es la intersección de la curva con el eje Y ; m es la pendiente de la curva de calibración de glucosa y f_d es el factor de dilución.

Glucanos

Para la determinación de glucanos se utilizó el kit comercial Megazyme TM K-YBGL (Irlanda). Este kit enzimático contiene exo-1,3- β -glucanasa, β -glucosidasa, amiloglucosidasa e invertasa; reactivo de determinación de glucosa (glucosa oxidasa más peroxidasa y 4-aminoantipirina) y solución estándar de glucosa. La medición del contenido total de glucanos se realizó solubilizando las muestras secas (90 mg) en H_2SO_4 12 M, enfriado con hielo, durante 2 h en un baño de agua con hielo seguido de 2 h adicionales a 100 °C hasta casi completar la hidrólisis en 2 M H_2SO_4 . Después de una neutralización con hidróxido de sodio 8 M, se realizó la hidrólisis de glucosa usando una mezcla de exo-1,3- β -glucanasa y β -glucosidasa en buffer de acetato de sodio (pH 4,5) durante 1 hora a 40 °C. Luego, se agregaron 3 mL de glucosa-oxidasa-peroxidasa-reactivo (GOPOD) y se incubó nuevamente a 40 °C durante 20 min. Las muestras se midieron a 510 nm en un espectrofotómetro (PG Instruments, Leicestershire, Reino Unido) frente a un blanco de reactivo.

Para la determinación del contenido de α -glucanos, las muestras secas (100 mg) se agitaron con 2 mL de NaOH (1,7 M) en un baño de agua con hielo durante 20 min. Luego se realizó la hidrólisis enzimática con amiloglucosidasa e invertasa en buffer de acetato de sodio (pH 3,8) durante 30 min a 40 °C. Luego, se agregaron 3 mL de GOPOD y se incubó nuevamente a 40 °C por 20 min. Las muestras se midieron a 510 nm en un espectrofotómetro T60 UV/VIS (PG Instruments, Leicestershire, Reino Unido) frente a un blanco de reactivo. El contenido de β -glucanos se determinó restando el contenido de α -glucanos del contenido total de glucanos (McCleary y Draga, 2016). Todas las muestras se analizaron por cuadruplicado.

2.3. Obtención de las dispersiones filmogénicas

Se prepararon dispersiones al 3 % p/p b.s. para cada una de las cepas fúngicas estudiadas de acuerdo con lo reportado en trabajos anteriores de nuestro grupo de trabajo

(Martínez, 2018). Para ello, la biomasa se cortó en pequeños trozos con tijera para facilitar su tratamiento y se agregó agua destilada. Las dispersiones fueron sometidas a procesos de ruptura celular mediante ultrasonido para liberar el material citoplasmático. Se evaluaron tres condiciones que combinaron tratamientos de ruptura por ultrasonido (US) con tratamientos de homogeneización a alta velocidad (UT) (Tabla 3). Se utilizó un procesador ultrasónico (US) VCX-750 Sonics and materials, inc., Newtown, CT, USA al 100 % de amplitud en ciclos de 30 segundos de pulsación y 30 segundos de descanso estableciendo como límite de temperatura 40 °C. Se estableció como límite 40 °C, ya que por sobre esa temperatura el colapso de las burbujas que se producen durante la cavitación es más débil, reduciendo así el efecto de la sonicación (Zhang et al., 2013). Posteriormente, en algunos de los tratamientos, la dispersión se sometió a una homogeneización por aire a 12000 rpm mediante un rotor-estator (Ultraturrax: UT) IKA T25 Works inc Wilmington, USA, durante 1 minuto con el propósito de romper los agregados residuales.

ID	Tratamiento
15US-UT-15US	15 min US + 1 min UT + 15 min US
15US	15 min US
7,5US-UT-7,5US	7,5 min US + 1 min UT + 7,5 min US

Tabla 3. Tratamientos realizados a las dispersiones fúngicas.

2.3.1. Observación microscópica

Se evaluó cualitativamente la ruptura celular a través de microscopía óptica. Para ello se realizaron preparados a partir de diluciones 1:20 de las dispersiones obtenidas bajo los diferentes tratamientos, con tinción con azul de lactofenol (Anexo I). Se las observó bajo un aumento de 40X mediante un microscopio Nikon modelo Eclipse E200.

2.3.2. Estudio de la distribución del tamaño de partícula

La distribución del tamaño de partícula es una propiedad fundamental para caracterizar sistemas de partículas en suspensión. Las partículas son objetos tridimensionales y, a menos que sean esferas perfectas (por ejemplo, emulsiones), no pueden describirse completamente mediante una sola dimensión, como un radio o un diámetro. Para

simplificar el proceso de medición, a menudo es conveniente definir el tamaño de partícula utilizando el concepto de esferas equivalentes. En este caso, el tamaño de partícula se define por el diámetro de una esfera equivalente que tiene la misma propiedad que la partícula real, por ejemplo, volumen o masa (Malvern Instruments Limited, 2015). A menos que la muestra que se desee caracterizar sea perfectamente monodispersa, es decir, cada partícula tenga exactamente las mismas dimensiones, consistirá en una distribución estadística de partículas de diferentes tamaños. Es una práctica común representar esta distribución en forma de una curva de distribución de frecuencia. Para simplificar la interpretación de los datos de distribución del tamaño de partículas, se pueden determinar diferentes parámetros estadísticos, como por ejemplo la media (tamaño medio de una población), la mediana (tamaño en el que el 50 % de la población está por debajo o por encima) y la moda (tamaño con la frecuencia más alta), entre otros. Si la distribución es una distribución normal o gaussiana, la media, la mediana y la moda estarán exactamente en las mismas posiciones. Sin embargo, si la forma de la distribución del tamaño de partícula es asimétrica, como suele ser el caso en muchas muestras, no se esperaría que estos tres valores fueran exactamente equivalentes (Rawle, 2002). Hay muchas medias diferentes que se pueden definir dependiendo de cómo se recopilen y analicen los datos de distribución. A continuación, se describen las tres más utilizadas para el tamaño de partículas (Malvern Instruments Limited, 2015):

- **Media aritmética en número o longitud media D [1,0]:** La media de la longitud del número, a menudo denominada media aritmética, es más importante cuando el número de partículas es de interés, por ejemplo, en aplicaciones de conteo de partículas. Solo se puede calcular si conocemos el número total de partículas en la muestra y, por lo tanto, se limita a las aplicaciones de conteo de partículas.
- **Media del momento de superficie D [3, 2]:** La media del área de superficie (diámetro medio de Sauter) es más relevante cuando el área de superficie específica es importante. Es más sensible a la presencia de partículas finas en la distribución del tamaño.
- **Media del momento de volumen D [4, 3]:** La media del momento del volumen (diámetro medio de De Brouckere) es relevante para muchas muestras, ya que

refleja el tamaño de las partículas que constituyen la mayor parte del volumen de la muestra. Es más sensible a la presencia de partículas grandes en la distribución del tamaño.

Si el objetivo es controlar el tamaño de las partículas gruesas que componen la mayor parte de una muestra, entonces el $D[4,3]$ sería el más apropiado. Si, por otro lado, es más importante controlar la proporción de partículas finas presentes, entonces podría ser más apropiado utilizar la $D[3,2]$. Las diferentes técnicas de medición utilizan diferentes modelos de esferas equivalentes, y, por lo tanto, pueden generar un diámetro medio diferente, así como medir diferentes propiedades de las partículas individuales. Por ejemplo, la difracción láser calcula inicialmente una distribución basada en términos de volumen y es por eso que la media $D[4,3]$ se informa de manera destacada (Rawle, 2002). La difracción láser mide la distribución del tamaño de las partículas midiendo la variación angular en la intensidad de la luz dispersada cuando un rayo láser pasa a través de una muestra de partículas dispersas. Se basa en el principio básico que las partículas grandes dispersan la luz en ángulos pequeños con respecto al rayo láser y las partículas pequeñas dispersan la luz en ángulos grandes. Los datos de intensidad de dispersión angular se analizan luego para calcular el tamaño de las partículas responsables de crear el patrón de dispersión, utilizando la teoría de Mie de dispersión de luz. El tamaño de partícula se expresa como un diámetro de esfera equivalente en volumen (Rawle, 2002; Caparrós, 2013).

Se determinó la distribución de tamaño de partícula de las muestras por difracción láser en el rango 0,1 a 1000 μm con un equipo Malvern Mastersizer 2000E (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). El volumen añadido de las dispersiones fue el necesario para lograr el porcentaje de obscuración que permita una medición adecuada (aprox. 1-2 mL) en 600 mL de agua, con agitación a 2000 rpm (Unidad Hydro 2000MU, Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). Se utilizó un índice de refracción para las partículas dispersas de 1,52 (almidón) y 1,33 para el agua, con un coeficiente de absorción asociado de 0,001. Se obtuvieron distribuciones de tamaños expresadas en %volumen y en %número, el diámetro medio de De Brouckere ($D[4.3]$) y el coeficiente de dispersión de tamaño de partícula o Span (Ecuación 8) que se define

como la medida del ancho de la distribución. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

$$Span = \frac{d(0,9) - d(0,1)}{d(0,5)} \quad (\text{Ecuación 8})$$

donde $d(0,1)$, $d(0,5)$ (mediana), y $d(0,9)$ indican respectivamente los diámetros por debajo de los cuales se encuentra el 10, el 50 y el 90 % de las partículas (si es una distribución en número) o del volumen total (si es una distribución en volumen).

2.4. Análisis estadístico

Los datos experimentales se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) con el objetivo de identificar diferencias significativas entre tratamientos. En los casos en que se detectaron diferencias, se aplicó el test de Tukey (test post-hoc) para la comparación de medias. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software InfoStat versión 2020e (Grupo InfoStat, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina), con un nivel de significancia establecido en $\alpha = 0,05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Confirmación de identidad de las cepas de trabajo

3.1.1. *Aspergillus niger*

La Figura 8 y la Figura 9 ilustran las características macroscópicas y microscopías obtenidas tras 7 días de incubación para la cepa de *A. niger*, respectivamente.

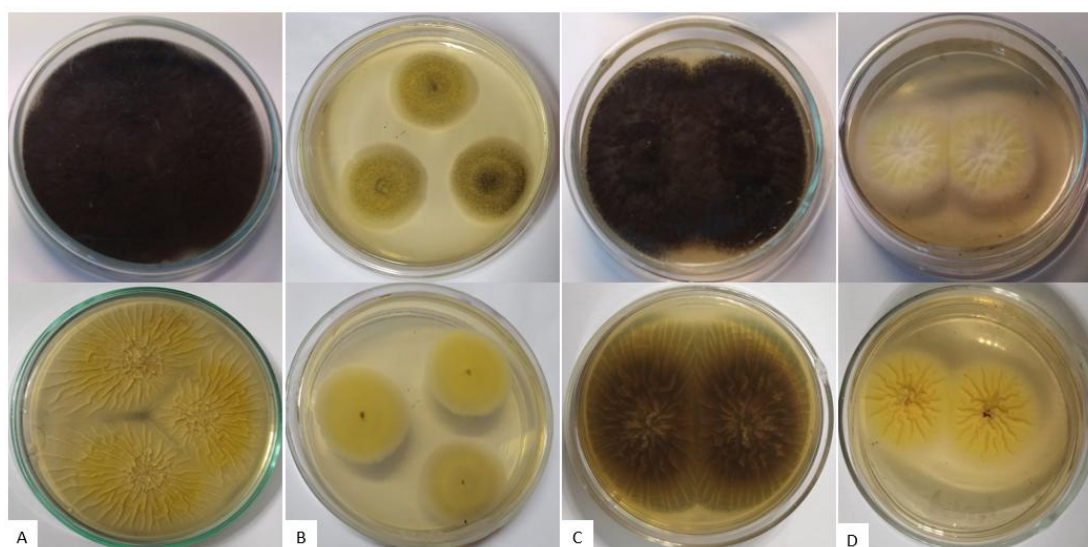


Figura 8. Colonias de *A. niger* tras 7 días de incubación en diferentes medios de cultivo: A) CYA a 25 °C; B) MEA a 25 °C; C) CYA a 37 °C; D) G25N a 25 °C. (Superior: anverso; Inferior reverso).

Las colonias en medio CYA a 25 °C presentaron un tamaño mayor a 85 mm de diámetro que cubrían toda la placa de Petri. Estas colonias eran planas, velutinosas, sulcadas, granulares y muy densas, de anverso color negro y reverso amarillo pálido. Se observaron gotas de exudado transparente en el centro de las colonias. A 37 °C se observaron colonias mayores a 60 mm de diámetro, sulcadas, granulares y similares a las de CYA a 25 °C en el resto de sus características. Las colonias en MEA presentaron 38 mm de diámetro promedio siendo más pequeñas que las de CYA, con coremia y granulares, con anverso color verde oliva y reverso pálido. Las colonias en G25N tuvieron 30 mm de diámetro promedio, caracterizándose por ser planas, velutinosas, con micelio blanco-amarillo y reverso pálido. No se observó crecimiento a 5 °C.

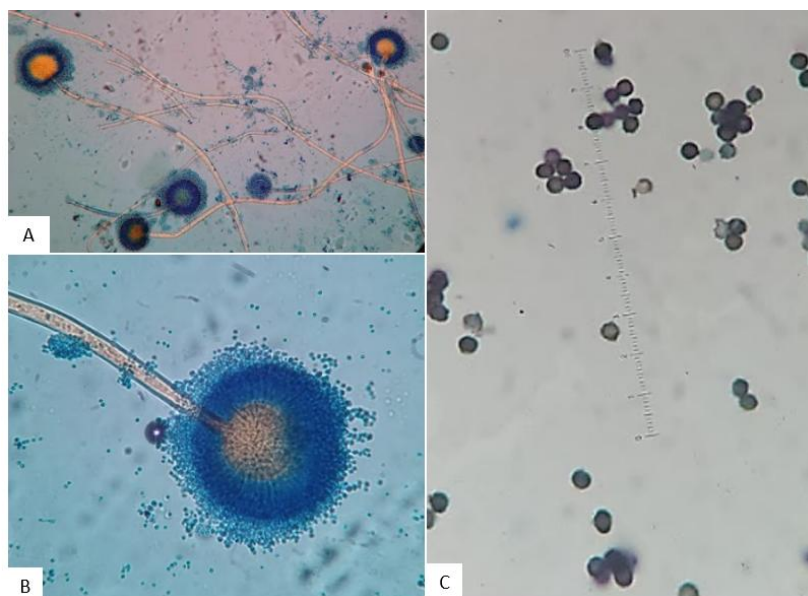


Figura 9. Ampliaciones desde microscopías de aislamientos de *A. niger* A) conidióforos 10X; B) cabeza aspergilar 40X; C) conidios 100X.

A través de observaciones microscópicas se evidenció que las hifas eran septadas, hialinas y de paredes lisas. Se observaron vesículas esféricas de 56,8 μm de diámetro promedio, con métulas y fiálides en toda la superficie. Las métulas y las fiálides presentaron un largo promedio de 22,7 μm y de 10 μm , respectivamente. Los conidios resultaron ser esféricos, de 4,5 μm de diámetro promedio, de color marrón, con paredes rugosas, y nacían de cabezas aspergilaes.

Las características macroscópicas y microscópicas antes detalladas coincidieron con lo establecido por Pitt y Hocking (2009), confirmándose la identidad del aislamiento como *Aspergillus niger*.

3.1.2. *Mucor hiemalis*

La Figura 10 y la Figura 11 ilustran las características macroscópicas y microscopías obtenidas tras 7 días de incubación para la cepa de *M. hiemalis*, respectivamente. Las colonias en CYA presentaron colonias que abarcaban la totalidad de la placa de Petri, de aspecto flocoso, de anverso beige grisáceo y reverso pálido. En MEA, también se obtuvieron colonias que abarcaron toda la placa de Petri, densas, de anverso color beige grisáceo y reverso amarillo dorado. En G25N se observaron colonias de 10,5 mm de diámetro promedio, densas, de color amarillo tanto en el anverso como en el reverso. A 5 °C, colonias de 20 mm de diámetro promedio, bajas y escasas. No creció a 37 °C.

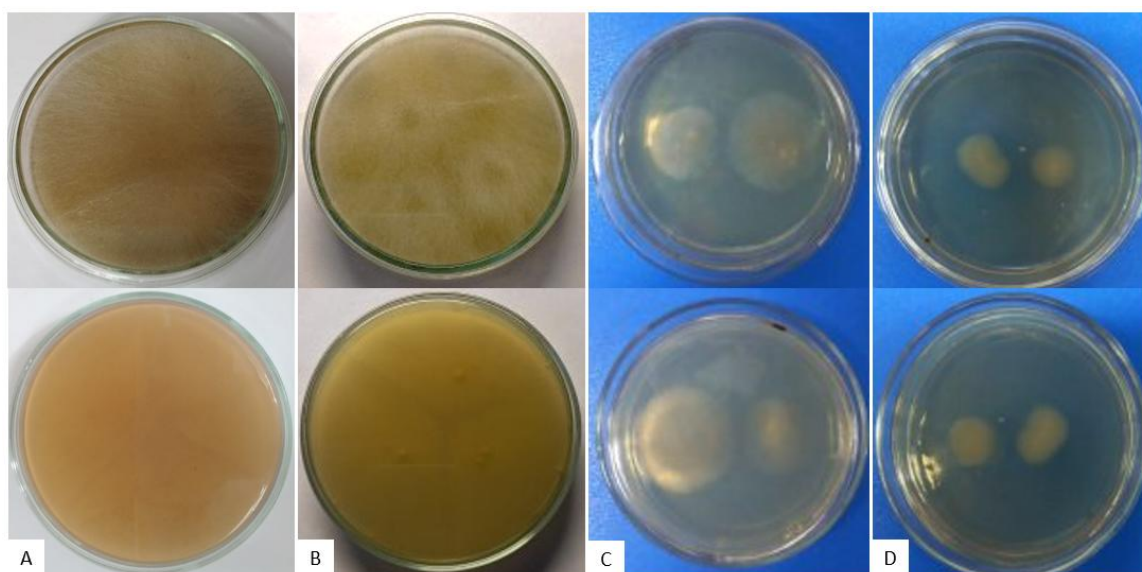


Figura 10. Colonias de *M. hiemalis* tras 7 días de incubación en diferentes medios de cultivo: A) CYA a 25 °C; B) MEA a 25 °C; C) CYA a 5 °C; D) G25N a 25 °C. (Superior: anverso; Inferior reverso).

A través de las observaciones microscópicas se evidenciaron hifas hialinas no septadas de paredes lisas. Se observaron esporangios de 40,8 μm de diámetro promedio, columelas de 18,2 μm de diámetro promedio y esporangiosporas hialinas elipsoidales de 6,8 μm de diámetro promedio.

Las características macroscópicas y microscópicas antes detalladas coincidieron con lo establecido por Pitt y Hocking (2009), confirmándose la identidad del aislamiento como *Mucor hiemalis*.

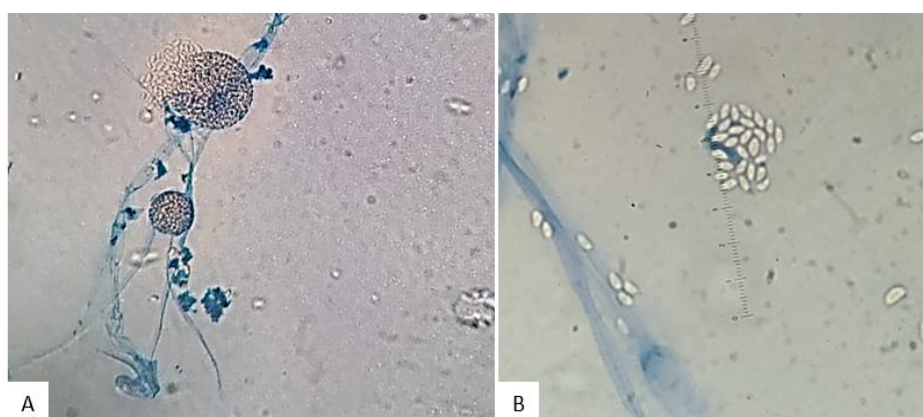


Figura 11. Ampliaciones desde microscopías de aislamientos de *M. hiemalis* A) esporangio y columela 40X; B) esporangiosporas 100X.

3.1.3. *Geotrichum candidum*

En medio CYA se desarrollaron colonias de 60 mm de diámetro promedio, bajas y bastante escasas, planas, con coremia, de anverso blanco y reverso pálido. Las colonias en MEA presentaron 53 mm de diámetro promedio, siendo velutinosas, más compactas que las de CYA, con anverso de color blanco y reverso pálido. No se presentó crecimiento a 5 °C ni a 37 °C ni tampoco en G25N. La Figura 12 ilustra las características macroscópicas obtenidas tras 7 días de incubación.

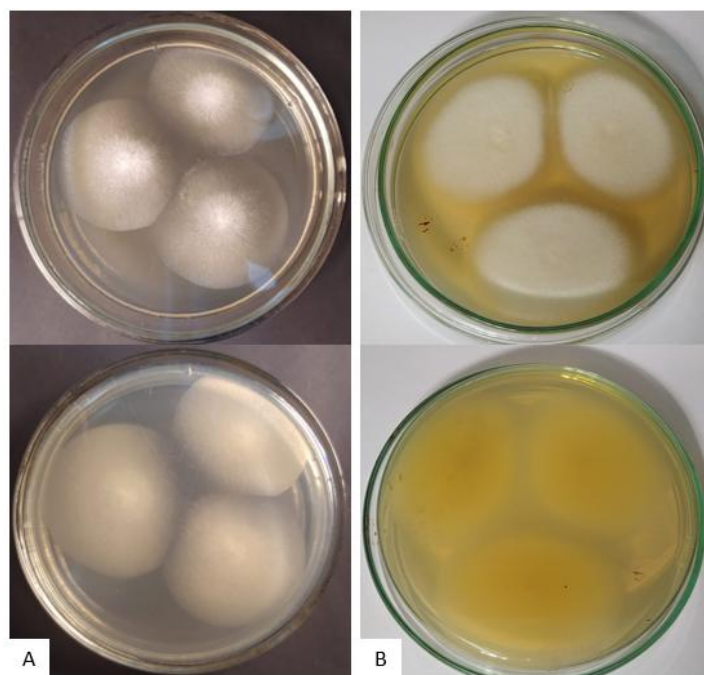


Figura 12. Colonias obtenidas de *G. candidum* tras 7 días de incubación en diferentes medios de cultivo: A) CYA a 25 °C; B) MEA a 25 °C (Superior: anverso; Inferior reverso).

En cuanto a las características microscópicas, se observó la fragmentación de hifas indiferenciadas formando artroconidios. Los artroconidios eran hialinos, cilíndricos, de paredes lisas y su tamaño variaba entre 6,8–9,1 x 2,3 µm (bxh). La Figura 13 muestra las microscopías obtenidas tras 7 días de incubación.

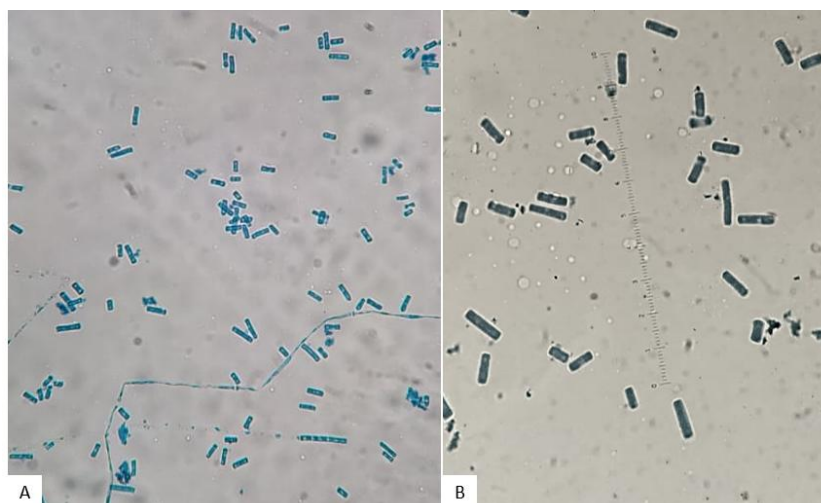


Figura 13. Ampliaciones desde microscopías de aislamientos de *G. candidum* A) arthroconidios 40X; b) arthroconidios 100X.

Las características macroscópicas y microscópicas antes detalladas se correlacionan con lo establecido por Pitt y Hocking (2009), confirmandose la identidad del aislamiento como *Geotrichum candidum*.

3.1.4. *Penicillium nalgiovense*

En las Figuras 14 y 15 se ilustran las características macroscópicas y microscopías obtenidas tras 7 días de incubación para el aislamiento de *P. nalgiovense*, respectivamente. En medio CYA se obtuvieron colonias de 30 mm de diámetro promedio, radialmente sulcadas, densas y velutinosas, de anverso color blanco con presencia de exudado transparente y reverso pálido. Las colonias en MEA presentaron un diámetro promedio de 18 mm y se caracterizaron por ser, planas, densas y granuladas, con anverso color blanco, ausencia de exudados y reverso fuertemente coloreado en tono anaranjado. En G25N se observaron colonias de 15 mm de diámetro promedio, planas, densas y compactas, con anverso color blanco, ausencia de exudado y pigmento soluble, y reverso de color amarillo. No se observó crecimiento ni a 5 °C ni a 37 °C.

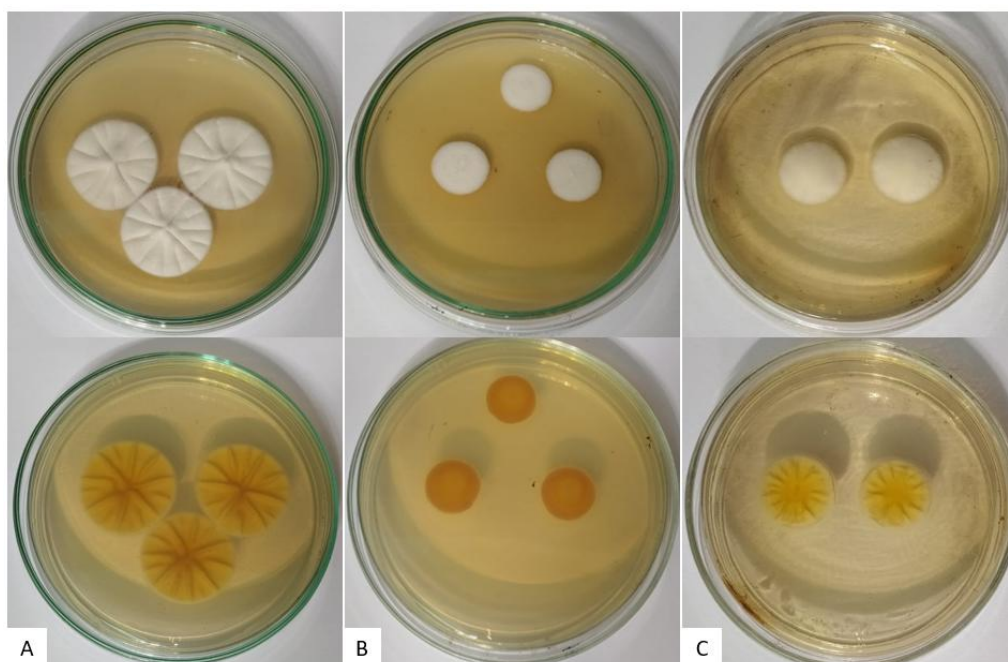


Figura 14. Colonias de *P. nalgiovense* tras 7 días de incubación en diferentes medios de cultivo: A) CYA a 25 °C; B) MEA a 25 °C; C) G25N a 25 °C. (Superior: anverso; Inferior reverso).

La observación microscópica de los preparados permitió apreciar hifas hialinas septadas de paredes lisas, conidióforos ramificados irregularmente, con penicilios irregulares con una estructura terminal terverticilada y fiálides ampuliformes de 9 μm de largo promedio, y conidios esféricos de 3,4 μm de diámetro promedio con paredes lisas.

Las características macroscópicas y microscópicas observadas se corresponden con lo descrito por Pitt y Hocking (2009), confirmándose la identidad del aislamiento como *Penicillium nalgiovense*.

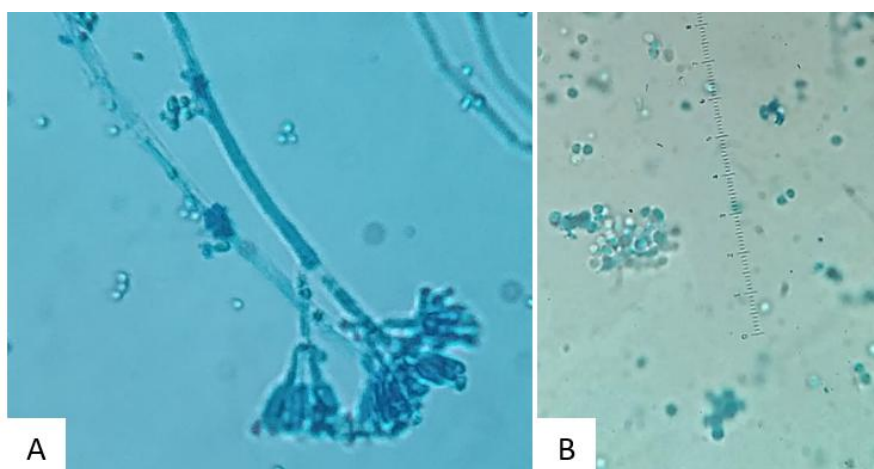


Figura 15. Ampliaciones desde microscopías de aislamientos de *P. nalgiovense* A) conidióforo 40X; B) conidios 100X.

3.1.5. *Penicillium camemberti*

La Figura 16 ilustra las características macroscópicas obtenidas tras 7 días de incubación. Las colonias desarrolladas en CYA presentaron un tamaño de 38 mm de diámetro promedio, ocasionalmente más pequeñas, ligeramente sulcadas radialmente, convexas, velutinosas, con anverso color blanco y reverso pálido. Las colonias en MEA se caracterizaron por tener un diámetro promedio 23 mm, ser planas y levemente flocosas, con anverso blanco y reverso amarillo. En G25N se observaron colonias de 16 mm de diámetro promedio, flocosas, sulcadas, con anverso color blanco, ausencia de exudado y pigmento soluble, y reverso de color pálido. Escaso crecimiento a 5 °C. No se observó crecimiento a 37 °C.

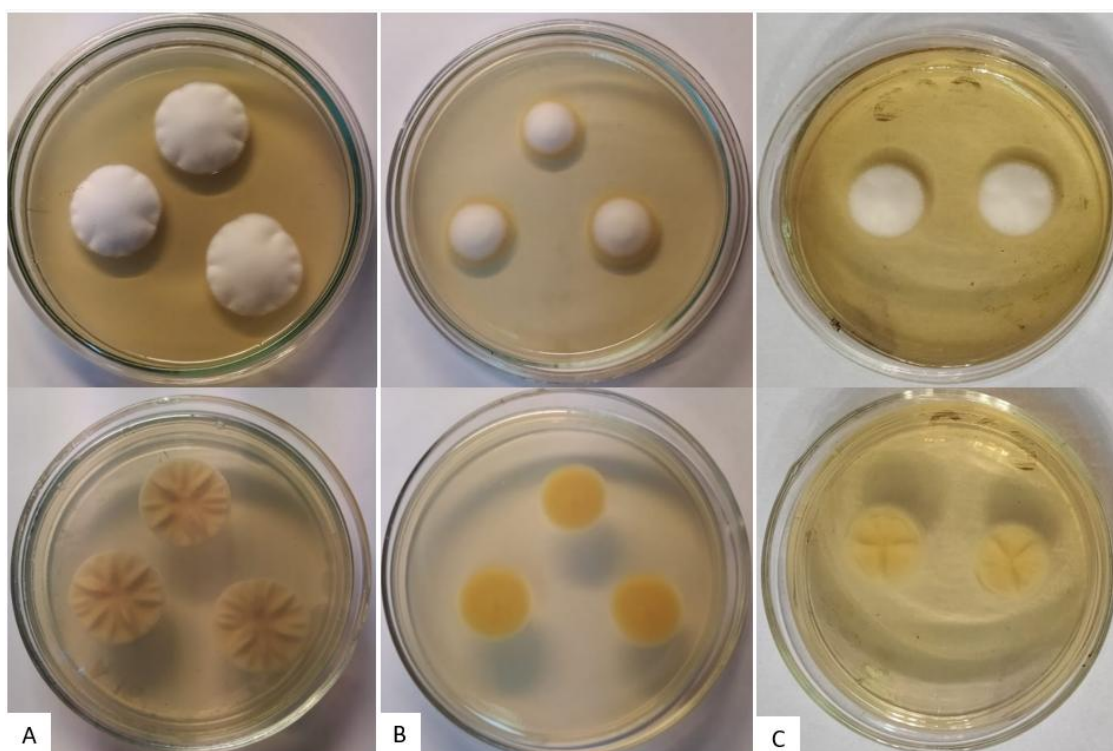


Figura 16. Colonias de *P. camemberti* tras 7 días de incubación en diferentes medios de cultivo: A) CYA a 25 °C; B) MEA a 25 °C; C) G25N a 25 °C. (Superior: anverso; Inferior reverso).

A partir de la observación microscópica se evidenciaron hifas hialinas septadas de paredes lisas, conidióforos ramificados, con penicilios irregulares con una estructura terminal terverticilada y fiálides ampuliformes de 13,6 µm de largo promedio, y conidios esféricos de 3,5 µm diámetro promedio con paredes lisas. La Figura 17 muestra las microscopías obtenidas tras 7 días de incubación.

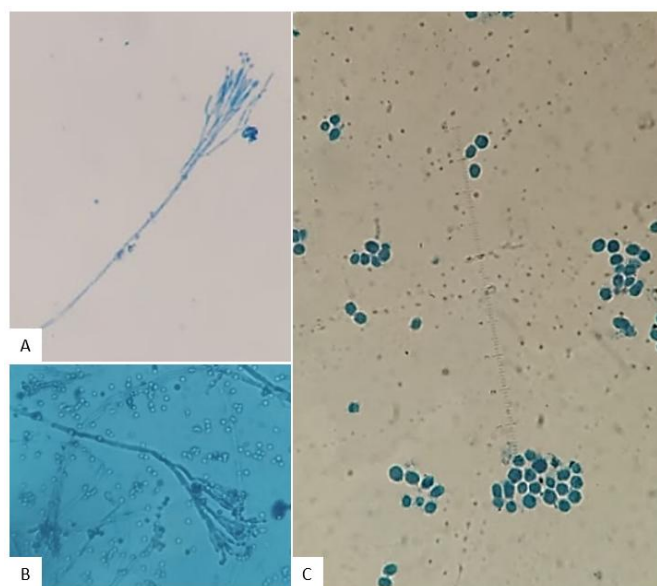


Figura 17. Ampliaciones desde microscopías de aislamientos de *P. camemberti* A y B) conidióforo 40X; C) conidios 100X.

Las características macroscópicas y microscópicas observadas se corresponden con lo descrito por Pitt y Hocking (2009), con algunas diferencias menores en los tamaños de la colonia, confirmándose la identidad del aislamiento como *Penicillium camemberti*.

3.2. Producción de biomasa

3.2.1. Cultivo sumergido

Cuando los hongos se cultivan en fermentación sumergida pueden presentar diferentes formas morfológicas, desde filamentos miceliales dispersos hasta masas miceliales densamente entrelazadas, o masas esféricas de hifas referidas a la forma de pellets (Gibbs et al., 2000; Papagianni, 2004; Li et al., 2019). Los pellets fúngicos pueden formarse a partir de una sola espora, agregados de esporas o hifas aglomeradas (Li et al., 2019), y su morfología y tamaño se ve afectada por la agitación (Veiter et al., 2020). Generalmente, el tamaño, así como la cantidad de pellets, pueden reducirse mediante una mayor agitación (Vansuijdam et al., 1981; Nielsen et al., 1995). El crecimiento en forma de pellet presenta como ventajas la disminución significativa de la viscosidad y la separación más fácil de la biomasa del caldo de cultivo (Zhang y Zhang, 2016).

La Figura 18 muestra la comparación de las diferentes morfologías de crecimiento, obtenidas para cada hongo en cultivo estático o agitado. Los cultivos agitados de *Aspergillus niger*, *P. nalgiovense* y *P. camemberti* presentaron crecimiento en forma de pellets, lo que facilitó el filtrado y la recuperación de la biomasa generada (Tabla 4). Los pellets de *Aspergillus niger*, se caracterizaron por presentar una forma esférica con bordes difusos, similares a la hierba diente de león, sugiriendo un fenómeno de autólisis (Figura 19, A). Esto se debe a que, al ir aumentando el tiempo de cultivo, se produjo un agotamiento de los nutrientes del medio y los gránulos comenzaron a sufrir erosión, debido a limitaciones en la transferencia de masa y oxígeno (Cui et al., 1997; Li et al., 2019; Barzee et al., 2021). Por otro lado *P. nalgiovense* y *P. camemberti* exhibieron pellets de forma irregular y menos esférica. A su vez, se observaron diferencias en el tamaño de los pellets generados por un mismo hongo, posiblemente asociadas al uso de Erlenmeyer de diferentes diámetros de base y a su posición dentro del agitador orbital (Figura 19, B). Esto pudo haber generado modificaciones en la agitación y en la aireación de los cultivos afectando de esta forma el tamaño de los pellets. A pesar de las diferencias observadas en el tamaño de los pellets entre las réplicas de una misma condición, la producción de biomasa obtenida (g b.s/L de medio) mostró poca variación entre las réplicas de un mismo hongo (Tabla 4). *M. hiemalis* y *G. candidum* crecieron como micelio libre y disperso por todo el medio de cultivo. Este resultado concuerda con lo reportado en bibliografía ya que se describen muy pocas referencias sobre la formación de pellets en especies de *Mucor* (Balsano et al., 2016) y solo ocurre cuando se ajustan las condiciones del medio añadiendo sales de calcio como agentes nucleantes o ajustando el pH (Sladdin y Lynch, 1983; Xia et al., 2011). En este estudio, el proceso de filtración de *M. hiemalis* obtenido bajo agitación fue igualmente exitoso al de los cultivos que presentaron crecimiento en forma de pellets a pesar de crecer como micelio disperso. Esto probablemente podría estar asociado con la coagulación de proteínas durante el proceso de esterilización por calor húmedo (Baker y Silverton, 1976). Contrariamente la filtración de *G. candidum* resultó más dificultosa; a pesar de haber obtenido una morfología de crecimiento similar.

Bajo condiciones estáticas, *P. nalgiovense* y *P. camemberti* crecieron como un micelio flotante blanco, poco compacto que no llegaba a cubrir la totalidad del área transversal

del recipiente. *G. candidum* presentó un micelio flotante y disperso en el medio de cultivo generando turbidez en el mismo. Por su parte *M. hiemalis* exhibió un micelio sumergido y disperso. *Aspergillus niger* creció como un micelio flotante compacto que abarcaba toda la sección transversal del Erlenmeyer, de color blanco (Figura 18). Esta morfología facilitó su filtrado y separación, presentando una ventaja operativa frente a los demás cultivos bajo condiciones estáticas.

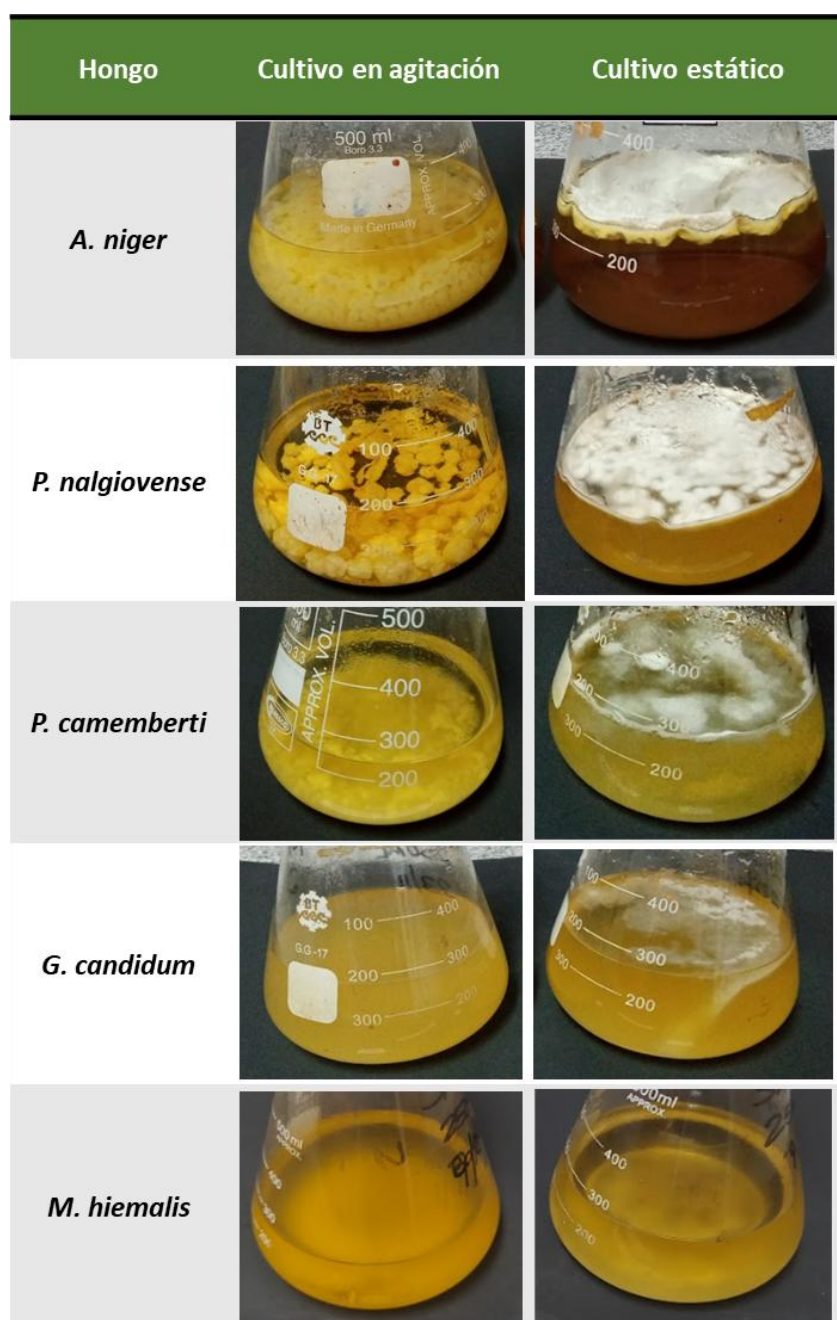


Figura 18. Morfologías de crecimiento tras 7 días de cultivo sumergido con y sin agitación.

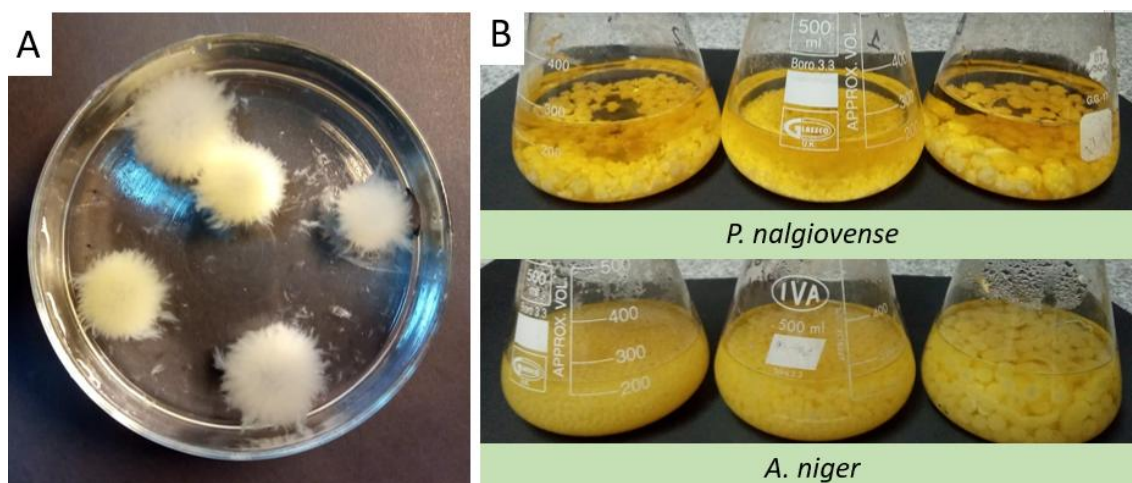


Figura 19. A) Pellets con forma de diente de león obtenidos por *A. niger* B) Diferencias en el tamaño de los pellets al final de la incubación bajo agitación de *P. nalgiovense* y *A. niger*.

La Tabla 4 presenta los rendimientos de biomasa obtenidos al final de la incubación. Tras 7 días de incubación todos los hongos filamentosos estudiados presentaron valores de biomasa (g biomasa seca/L) significativamente mayores ($p < 0,05$) en los cultivos bajo agitación respecto a aquellos en condiciones estáticas. Esto sugiere que la agitación, y por lo tanto la aireación generada por la misma, favorece la producción de biomasa para las cepas bajo estudio. *Aspergillus niger* se destacó por presentar los mayores rendimientos de biomasa en ambas condiciones de cultivo. En todos los hongos estudiados, la biomasa producida bajo agitación fue aproximadamente 1,8 veces mayor a la obtenida en condiciones estáticas. *M. hiemalis* mostró ser el más afectado por la reducción de la aireación, presentando la mayor diferencia entre ambas condiciones de cultivo, obteniendo 2,2 veces más biomasa en agitación que en condiciones estáticas. Por otro lado, *Geotrichum candidum* presentó la menor diferencia entre sus rendimientos en condiciones agitadas (0,73 g/L) y estáticas (0,52 g/L), siendo 1,4 veces mayor en agitación. Las similitudes encontradas en ambas condiciones de cultivo probablemente se deban a que *G. candidum* es un hongo dimórfico. Esto significa que las cepas pertenecientes a esta especie son capaces de alternar una fase unicelular (con crecimiento levaduriforme) con otra micelial (con producción de hifas) en respuesta a cambios en diversos factores ambientales (nutrientes, tensión de CO_2 , potenciales de oxidación-reducción, temperatura) (Sacristán, 2015). Esta característica les permite poder proliferar a manera de levaduras en condiciones de muy baja tensión de oxígeno

(Miller y Golding; 1949; Sacristán, 2015) y no ser tan dependientes de la aireación del medio para su desarrollo.

MO/Condición de cultivo	Producción de Biomasa total (g/L)	
	Agitado	Estático
<i>Aspergillus niger</i>	2,63 ± 0,12 ^a	1,72 ± 0,18 ^b
<i>Mucor hiemalis</i>	2,02 ± 0,09 ^a	0,90 ± 0,05 ^b
<i>Penicillium nalgiovense</i>	1,96 ± 0,04 ^a	1,04 ± 0,03 ^b
<i>Penicillium camemberti</i>	1,94 ± 0,00 ^a	0,86 ± 0,11 ^b
<i>Geotrichum candidum</i>	0,73 ± 0,06 ^a	0,52 ± 0,05 ^b

*letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas (P < 0,05)

Tabla 4. Valores promedio de biomasa total obtenida (b.s) tras 7 días de cultivo sumergido agitado y estático. Valores expresados como media ± desviación estándar (DS).

Para el crecimiento de hongos se utilizan diferentes medios de cultivo, los cuales sustituyen parcialmente las propiedades nutricionales del sustrato natural del hongo por cultivar. La finalidad del medio es proporcionar una mezcla de nutrientes requeridos por los microorganismos que optimicen su crecimiento y/o producción de metabolitos de interés. La composición del medio y las condiciones de cultivo puede influir sobre diferentes aspectos en la fisiología del microorganismo, tales como, la nutrición, multiplicación (producción de biomasa) y producción de metabolitos primarios y secundarios (Hernández-López et al., 2019). Esto hace que los datos obtenidos por diferentes autores no sean del todo comparables a menos que se traten de condiciones de cultivo semejantes.

En condiciones agitadas, *A. niger* presentó valores de biomasa comparables con los reportados por Oshoma e Ikenebomeh (2005), quienes obtuvieron un crecimiento de 2 g/L tras de 7 días de cultivo en un medio con salvado de arroz suplementado con azúcar, nitrógeno y minerales (120 rpm, 28 °C). Por otro lado, los valores obtenidos resultaron inferiores a los rendimientos reportados por otros autores tanto en medios sintéticos como en agro-residuos (Hang et al., 1975; Leal et al., 2011; Chuppa Tostain et al., 2018).

M. hiemalis, en agitación, presentó rendimientos comparables con los reportados por Parrilla (2020) en cultivos de 5 días en Caldo Extracto de Levadura y Sacarosa (YES), a 135 rpm y 25 °C (2,6 g/L). A su vez resultaron menores a los obtenidos por Jakovljević et

al., (2014) para *Mucor racemosus* (3,2-4,5 g/L) en caldo Czapek Dox, con y sin detergente, tras 6 días de incubación con agitación a temperatura ambiente y pH 4,7.

P. nalgiovense, bajo agitación, presentó valores aproximadamente 2,5 veces menores a los obtenidos por Parrilla (2020) en cultivos de 5 días en Caldo Extracto de Levadura y Sacarosa (YES), a 135 rpm y 25 °C (4,7 g/L). Por su parte *P. camemberti*, también obtuvo rendimientos de biomasa considerablemente menores a los informados por otros autores. Santhalin Shellomith y Preetha (2018) reportaron rendimientos de entre 10 a 35,8 g/L usando como medio de cultivo lactosuero con diferentes grados de suplementación, tanto en estático como en agitación (120 rpm), tras 5 días a 30 °C. Cabe destacar que estos observaron los mejores rendimientos bajo condiciones estáticas independientemente del grado de suplementación del medio. Amrane et al. (1999) informaron valores de biomasa de 3,2 g/L en caldo YEL (Extracto de levadura y lactato) y de 3,5 g/L en caldo PTL (Peptona de caseína, tríptica y pancreática, y lactato), tras 7 días de incubación a 25 °C, 850 rpm y un pH inicial 4,5.

La biomasa de *G. candidum* obtenida resultó menor a la informada por Amrane et al. (1999). Estos reportaron rendimientos de biomasa de 3,1 g/L y 3,3 g/L, en caldo YEL (Extracto de levadura y lactato) y PTL (Peptona de caseína, tríptica y pancreática, y lactato) respectivamente, tras 5 días de incubación a 25 °C, 850 rpm y pH inicial 4,5.

La Tabla 5 muestra los valores de pH obtenidos tras 7 días de incubación. Todos los cultivos presentaron un descenso en el pH del medio (pH inicial medio: $6,2 \pm 0,1$) tanto en condiciones estáticas como en agitación. Los hongos generalmente alteran el pH del medio en el que crecen, debido a la absorción de aniones o cationes en el medio (Jakovljević et al., 2014). El pH del medio fermentativo por lo general disminuye durante el cultivo fúngico debido a la actividad metabólica de asimilación de los sustratos, principalmente azúcares, y la generación de metabolitos de carácter ácido por parte del hongo durante su crecimiento a través del tiempo (Xia et al., 2011; Cortés-Sánchez et al., 2014). Por lo tanto, los diferentes cambios observados en los valores de pH de los medios de cultivo son el resultado de la utilización de nutrientes de los medios de crecimiento (Jakovljević et al., 2014). Se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en los valores de pH, entre los cultivos estáticos y agitados de todos los hongos con excepción del *M. hiemalis* (Tabla 5). En todos los casos el pH final registrado bajo

agitación resultó ser de 0,1 a 0,4 unidades de pH menor que el observado en condiciones estáticas. Esta mayor disminución en el pH observada en los cultivos con agitación resultó ser coincidente con una mayor producción de biomasa respecto a los cultivos en condiciones estáticas.

MO/Condición de cultivo	pH	
	Agitado	Estático
<i>Aspergillus niger</i>	3,1 ± 0,2 ^b	3,3 ± 0,1 ^a
<i>Penicillium nalgiovense</i>	5,4 ± 0,1 ^b	5,7 ± 0,1 ^a
<i>Penicillium camemberti</i>	4,6 ± 0,1 ^b	5,0 ± 0,1 ^a
<i>Geotrichum candidum</i>	3,0 ± 0,1 ^b	3,2 ± 0,1 ^a
<i>Mucor hiemalis</i>	4,4 ± 0,1 ^a	4,6 ± 0,1 ^a

*letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas ($P < 0,05$)

Tabla 5. Valores de pH del medio de cultivo tras 7 días de cultivo sumergido agitado y estático. Valores expresados como media ± DS.

3.2.2. Cultivo en medio sólido

Todos los hongos estudiados fueron capaces de acceder a los nutrientes del medio de cultivo sólido y desarrollarse sobre las membranas de papel de filtro en las condiciones analizadas (Figura 20).

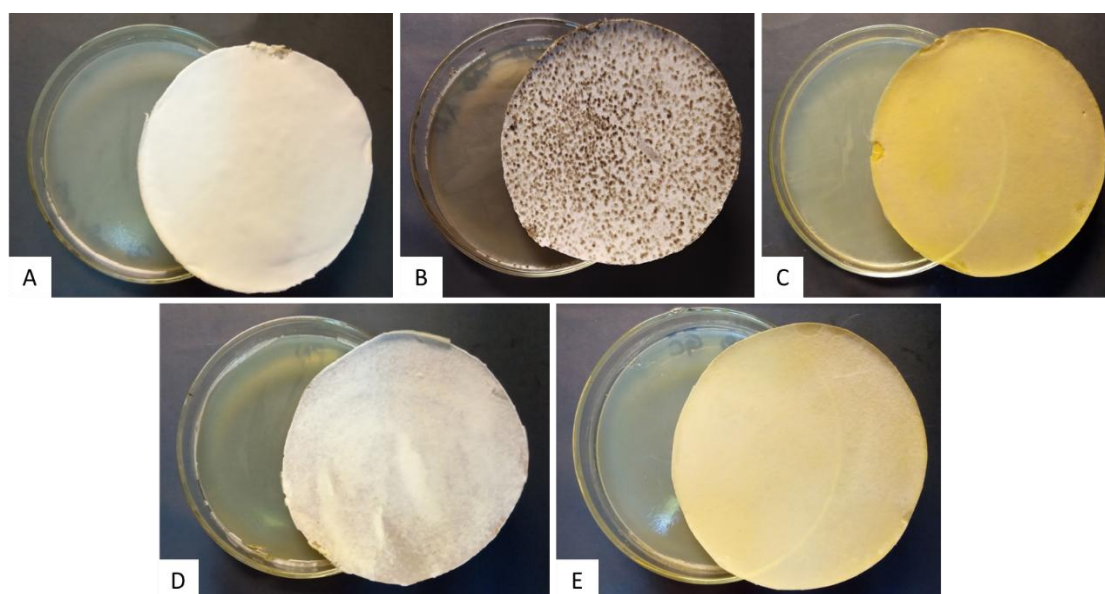


Figura 20. Cultivos en medio sólido sobre membrana tras 7 días de incubación. A) *P. camemberti*; B) *A. niger*; C) *M. hiemalis*; D) *P. nalgiovense* y E) *G. candidum*.

Diversos autores señalan que los filtros de membrana de diferentes materiales actúan como una barrera física para evitar la penetración de hifas en el sustrato sólido y, por lo tanto, permiten una separación completa de la biomasa del medio sólido (Mitchell et al. 1989; Rahardjo et al., 2004; Ludemann et al., 2010). A pesar de esto no existe suficiente bibliografía focalizada en la separación y recuperación de la biomasa desde la membrana, dado que la mayoría de las investigaciones están orientadas a la recuperación de metabolitos de interés, conidios, cuantificación de proteínas, etc. Autores señalan que el micelio fúngico se puede recuperar despegándolo de la membrana y pesándolo directamente o después del secado (Raimbault, 1998; Rahardjo et al., 2004; Manan y Webb, 2018). Sin embargo, esta técnica solo es adecuada a pequeña escala o en estudios de laboratorio y debería de considerarse una etapa de inactivación de la biomasa para una manipulación más segura, sobre todo si se busca procesar grandes cantidades. El papel de filtro resultó ser un soporte adecuado para el crecimiento de los hongos estudiados permitiendo una fácil separación del medio de cultivo. Sin embargo, la separación de la biomasa del filtro se vio dificultada ya que luego de la esterilización, esta quedó muy adherida al mismo (Figura 21). Los rendimientos en gramos de biomasa seca total sobre kg de medio de cultivo resultaron considerablemente mayores a los obtenidos en cultivo sumergido (Figura 22). *Penicillium camemberti* se destacó de los demás cultivos presentando una producción de biomasa de $8,40 \pm 0,70$ g/kg (b.s) siendo 4,3 veces mayor a la obtenida en cultivo sumergido bajo agitación, *Mucor hiemalis* y *Penicillium nalgiovense* presentaron rendimientos de $5,95 \pm 0,33$ g/kg (b.s) $5,47 \pm 0,51$ g/kg (b.s) respectivamente, siendo en ambos casos casi 3 veces mayores que los obtenidos en cultivo sumergido con agitación. Por su parte *Aspergillus niger* obtuvo una producción de $5,17 \pm 0,25$ g/kg (b.s) que resultó ser de más del doble de la obtenida en cultivo sumergido bajo agitación. *Geotrichum candidum* fue el que mayor diferencia presentó respecto a sus cultivos en agitación, obteniendo una biomasa de $4,63 \pm 0,80$ g/kg (b.s) siendo aproximadamente 6 mayor a la obtenida en caldo. Resulta necesario estudiar técnicas más adecuadas de separación y esterilización de la biomasa para poder aprovechar los altos rendimientos obtenidos bajo el cultivo en medio sólido, manteniendo a su vez las buenas prácticas de manipulación.

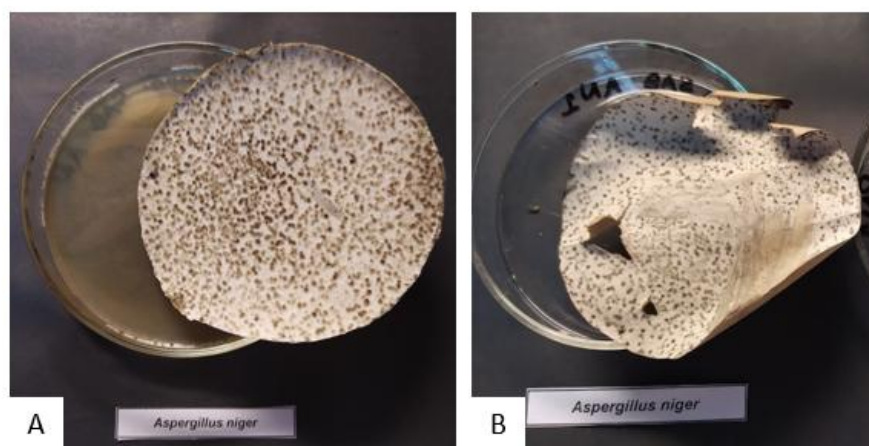


Figura 21. Biomasa de *A. niger* adherida al filtro A) antes y B) después de la etapa de esterilización.

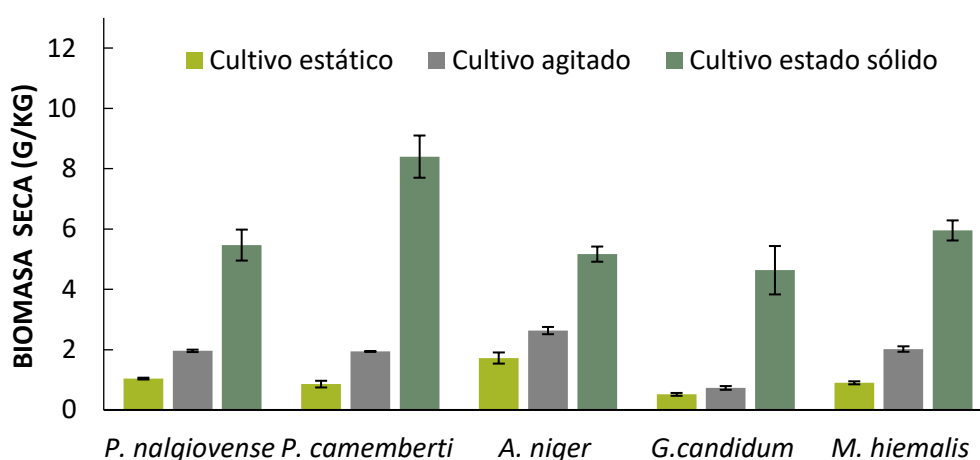


Figura 22. Efecto del cultivo sumergido (estático y agitado) y en medio sólido sobre la producción de biomasa tras 7 días de incubación (nota: se aproximó a 1g/mL la densidad del agar para facilitar la comparación de rendimientos entre cultivo sumergido y en medio sólido).

Si bien la producción de biomasa fúngica en medio sólido fue superior a la de cultivo sumergido, la dificultad para su recuperación hizo que fuera descartada para la obtención de biomasa destinada a la elaboración de dispersiones filmogénicas en esta investigación. De obtener resultados prometedores en este estudio sería importante profundizar en estrategias de separación en medio sólido. En este aspecto, Crawford et al. (2024) trabajaron en un nuevo método para cultivar hongos filamentosos utilizando un sustrato de consistencia pastosa cuidadosamente formulado que permite la fácil separación del micelio del medio.

En base a los resultados obtenidos se procedió a seleccionar las cepas fúngicas con mejor rendimiento de biomasa. Otros factores que contribuyeron en la selección de las

biomasas destinadas para la obtención de las dispersiones, fue la facilidad de esporulación de los cultivos en PDA tras 7 días de incubación, y la facilidad de recolección de los conidios a la hora de la preparación del inóculo. Si bien la producción de biomasa de *P. camemberti* fue similar a la de *P. nalgiovense*, presentó baja esporulación y colonias muy compactas lo que dificultaba la recolección de los conidios. Lo anterior no solo dificultaba la preparación del inóculo, sino que también implicaba un mayor uso de tiempo y de recursos comparado con hongos de rendimiento similar. Teniendo en cuenta esto, se seleccionaron las cepas de: *A. niger*, *P. nalgiovense*, y *M. hiemalis* y la forma de cultivo sumergido bajo agitación para producir biomasa destinada a obtener las dispersiones filmogénicas. Estos hongos presentaron características morfológicas muy distintivas entre ellos, hecho que resulta interesante en la evaluación de las dispersiones y películas producidas a partir de ellos.

3.2.3. Determinación de principales componentes filmogénicos

Los componentes principales de la pared celular de las hifas fúngicas son las proteínas y los polisacáridos, como la quitina y los β -glucanos. Su superficie externa es rica en β -glucanos y la capa interna consiste en microfibrillas de quitina, entrecruzadas covalentemente con otros polisacáridos que proporcionan a la hifa rigidez y resistencia mecánicas (Binur et al., 2021). El contenido de estos componentes depende de la composición del sustrato, estado de crecimiento y especie de hongo (Wani et al., 2010; Gómez-Flores et al., 2019). La Tabla 6 muestra los resultados del análisis composicional de las biomasas fúngicas seleccionadas y obtenidas según el ítem 3.2. La biomasa de *M. hiemalis* presentó los valores más altos de proteína cruda y el contenido más bajo de carbohidratos, asociado principalmente a la baja presencia de glucanos estructurales en la pared celular. Estos resultados son comparables con los informados por Binur et al. (2021) para *M. circinelloides* y los informados por Kyanko et al. (2013) para especies de *Mucor*. Por otro lado, *A. niger* y *P. nalgiovense* mostraron una composición similar entre sí, con niveles más altos de carbohidratos, tanto totales como glucanos, y un menor contenido en proteína que *M. hiemalis*. Estas diferencias se deben a que los glucanos están prácticamente ausentes en las especies de *Mucor*, mientras que estos componentes en las especies de *Penicillium* y *Aspergillus* se encuentran en porcentajes

superiores al 15 % (Kyanko et al., 2013; Singh et al., 2016). Los valores obtenidos para *P. nalgiovense* y *A. niger* se corresponden con los reportados para hongos filamentosos por Manikandan (2011) quien informó un contenido de alrededor de 46,17 a 82,80 % en peso seco de carbohidratos y un contenido de proteínas de 4,20 a 37,50 %. A su vez, los valores de proteína obtenidos para *P. nalgiovense* y *A. niger* fueron inferiores y los de β -glucanos superiores a los informados por Kyanko et al. (2013) para *P. nalgiovense* y *A. candidus*.

Muestra	Proteína cruda (g/100g)	Carbohidratos			
		Carbohidratos totales (g/100g)	Glucanos totales (g/100g)	α -Glucanos (g/100g)	β -Glucanos (g/100g)
MH	47,38 $\pm$ 0,10	30,19 $\pm$ 1,05	1,02 $\pm$ 1,09	0,83 $\pm$ 0,07	0,19 $\pm$ 1,10
AN	28,53 $\pm$ 0,10	70,05 $\pm$ 5,23	33,09 $\pm$ 0,22	1,68 $\pm$ 0,64	31,41 $\pm$ 1,38
PN	25,81 $\pm$ 0,12	69,20 $\pm$ 4,20	27,88 $\pm$ 0,07	0,74 $\pm$ 0,02	27,14 $\pm$ 0,71

Tabla 6. Resultados del análisis composicional de la biomasa fúngica en base seca. Valores expresados como media $\pm$ DS. (MH) *Mucor hiemalis*; (AN) *Aspergillus niger*; (PN) *Penicillium nalgiovense*.

3.3. Obtención de las dispersiones filmogénicas

La Figura 23 muestra las biomásas y dispersiones filmogénicas obtenidas de *P. nalgiovense*, *A. niger* y *M. hiemalis*. Se obtuvieron biomásas de colores característicos dependientes de la cepa fúngica. *P. nalgiovense* y *A. niger* presentaron biomásas de tonos beige claro y oscuro, respectivamente, que se caracterizaron por una mayor capacidad de hinchamiento y absorción de agua al preparar las dispersiones como puede observarse en las imágenes. Por otro lado, la biomasa de *M. hiemalis* presentó un color amarillo con menor capacidad de hinchamiento. Estas diferencias se corresponden con las diferencias observadas en su composición química. En cuanto a su composición, *M. hiemalis* presentó el mayor contenido de proteínas y el menor de glucanos estructurales. En contraste, *A. niger* y *P. nalgiovense* mostraron un mayor contenido de carbohidratos, asociado principalmente a la presencia de glucanos estructurales de la pared celular. Esto es consistente con estudios previos que han mostrado que cepas fúngicas con alto contenido de β -glucanos presentan mayor capacidad de absorción y retención de agua (Kyanko et al., 2013). En conjunto, estos

resultados indican que la composición de la biomasa fúngica influye directamente en su capacidad de hidratación. Independientemente las diferencias observadas, en todos los casos se lograron obtener dispersiones filmogénicas homogéneas a partir de todos los tratamientos de ruptura, con características fuertemente dependientes la cepa fúngica.

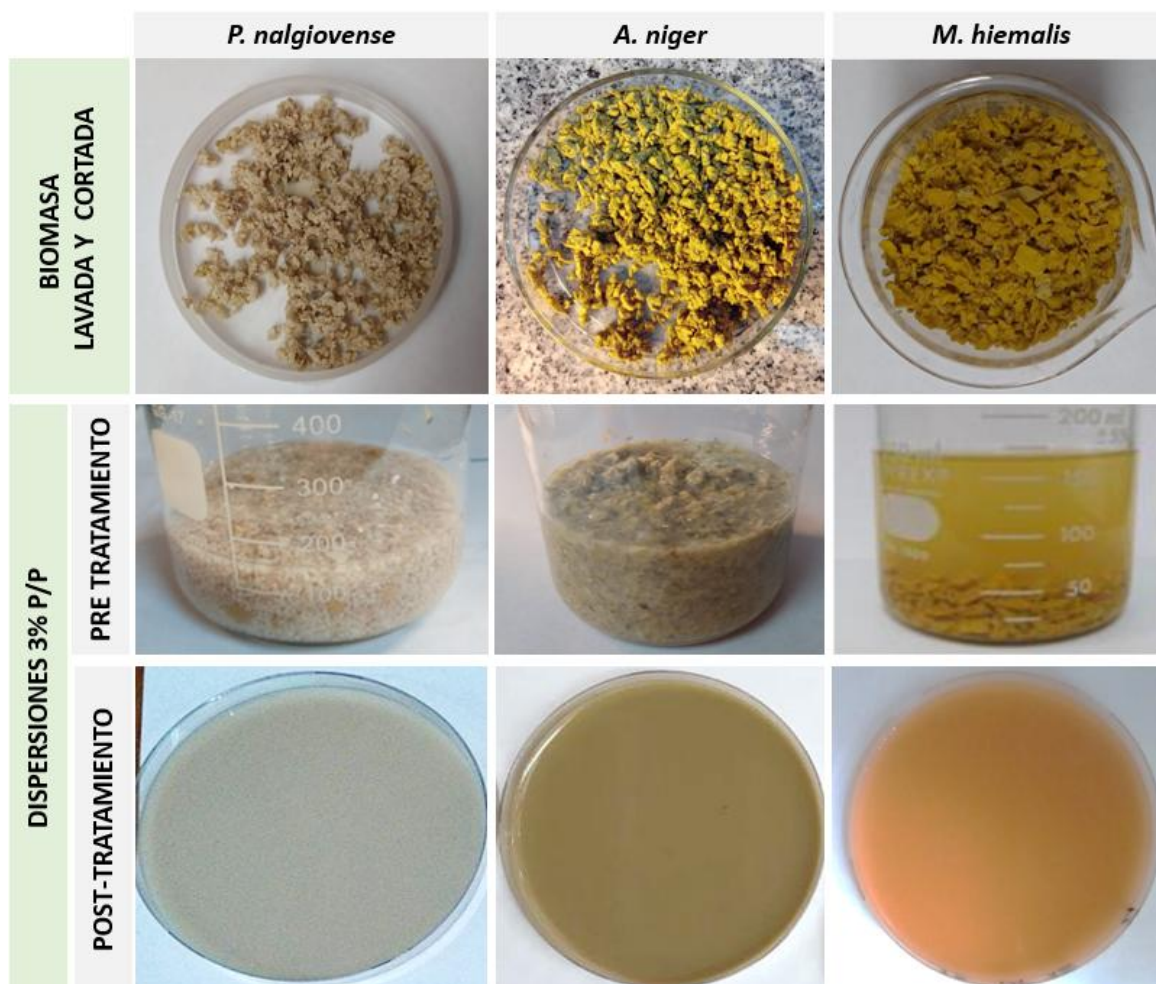


Figura 23. Biomosas y dispersiones fúngicas al 3 % p/p antes y después del tratamiento de ruptura celular (15US).

3.3.1. Observación microscópica

La Figura 24 muestra las micrografías con un aumento de 40x de las dispersiones de *P. nalgiovense*, *A. niger* y *M. hiemalis* antes (control) y después de los tratamientos de ruptura celular. En las muestras control se observaron hifas largas, destacando las de *M. hiemalis* (Figura 24, A) por ser más anchas que las de *P. nalgiovense* y *A. niger*. Las hifas de los mucorales se caracterizan por ser anchas (de 5 a 15 micras de diámetro), ramificadas irregularmente, y raramente septadas. Esto contrasta con las hifas de los

mohos ascomicetos, como *Aspergillus* y *Penicillium*, que son más estrechas (de 2 a 5 micras de diámetro), exhiben ramificaciones regulares y tienen muchos septos (Galletti et al., 2019; Iwen et al., 2022). Las micrografías revelaron diferencias en la fragmentación celular tras los tratamientos de ruptura. En *P. nalgiovense* y *A. niger*, se observó un aumento en la fragmentación de las hifas conforme se incrementó el tiempo de ultrasonido (Figura 24, A-H), mientras que este efecto fue menos evidente en las dispersiones de *M. hiemalis* (Figura 24 J-L). En este último, las micrografías de las dispersiones obtenidas mediante los tres tratamientos de ruptura mostraron estructuras similares entre sí, presentando consistentemente fragmentos de hifas de mayor tamaño que los observados en *P. nalgiovense* y *A. niger*. Por otro lado, las dispersiones de *P. nalgiovense* mostraron hifas más largas con el tratamiento 15 US cuando se aplicó un tratamiento intermedio UT (Figura 24, C).

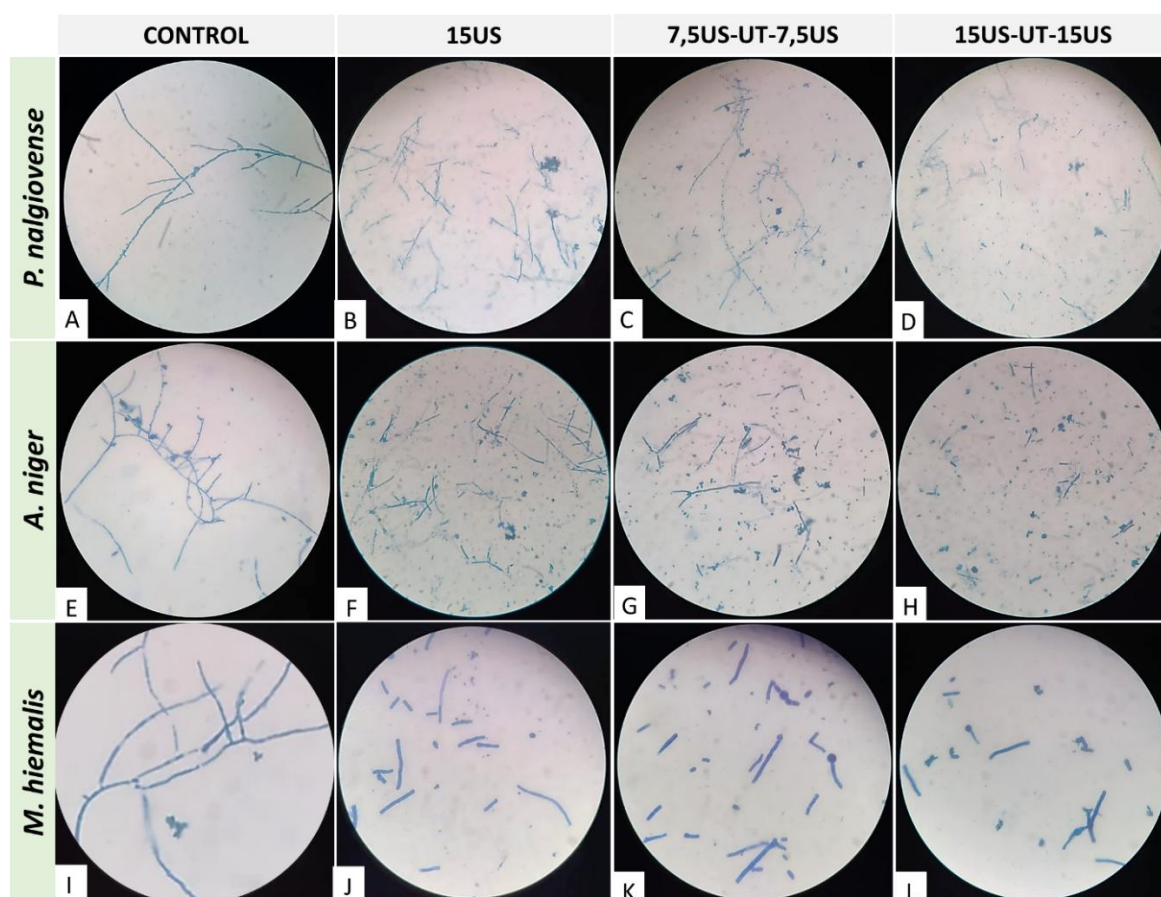


Figura 24. Micrografías de las dispersiones fúngicas (40X) bajo diferentes tratamientos de ruptura: A-D) *P. nalgiovense*.; E-H) *A. niger*; I-L) *M. hiemalis*.

3.3.2. Estudio de la distribución del tamaño de partícula

Las distribuciones de tamaño de partículas de las dispersiones fúngicas obtenidas bajo los distintos tratamientos de ruptura se muestran en la Figura 25. Las curvas en %volumen mostraron que todas las dispersiones resultaron ser polidispersas, lo que se justifica por las características de las células fúngicas involucradas, y por el método de tratamiento de ultrasonido de ruptura utilizado (Borthwick et al., 2005; Gogate y Kabadi, 2009). Se observó una tendencia monomodal con los tratamientos de 30 min US (15US-UT-15US) en las dispersiones de *P. nalgiovense* y *A. niger* (Figura 25, A y C, respectivamente). Por otro lado, todas las dispersiones de *M. hiemalis* mostraron distribuciones de tamaño de partícula similares independientemente del tratamiento US, mostrando perfiles polidispersos (Figura 25, B). Esto se correlacionó con lo observado en las micrografías de las dispersiones donde *M. hiemalis* se destacó por presentar fragmentos de hifas de mayor tamaño que las demás cepas, independientemente del tratamiento de ruptura.

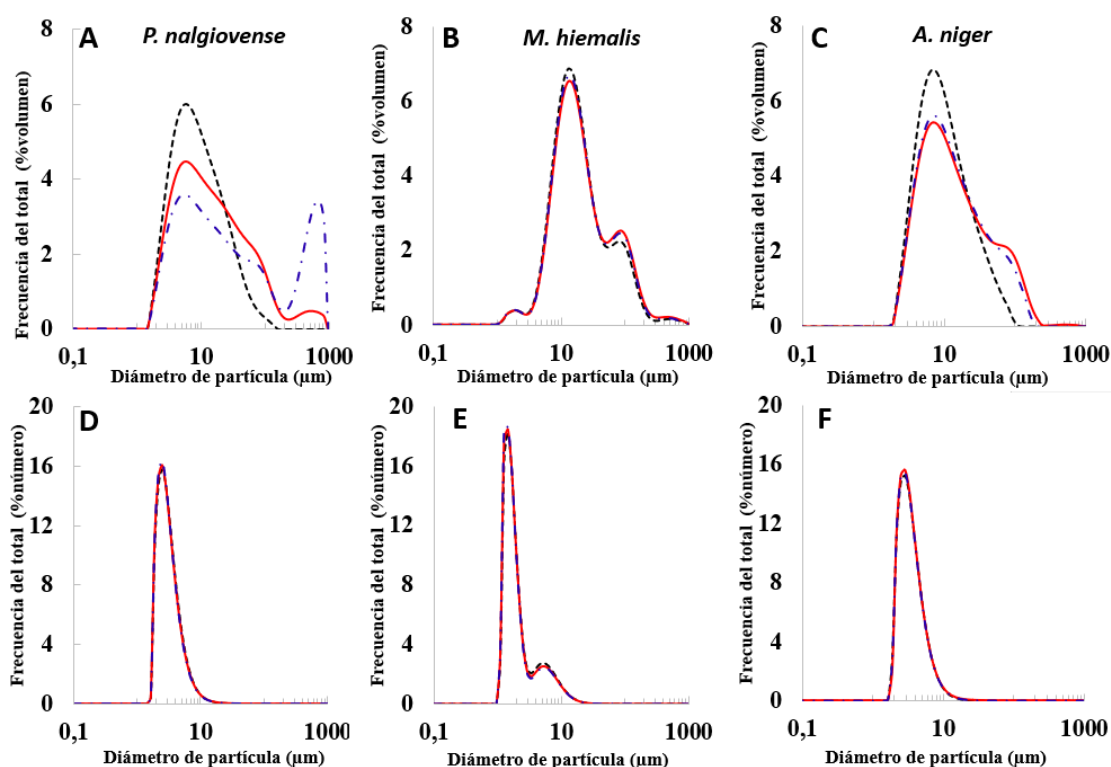


Figura 25. Distribuciones del tamaño de partícula en %Volumen y en %Número de dispersiones de *Penicillium nalgiovense* (A y D), *Mucor hiemalis* (B y E); y *Aspergillus niger* (C y F). (---15U-HS-15U; — 15U; -.- 7.5U-HS-7.5U)

La Tabla 7 reúne los resultados de los parámetros $D_{4,3}$, $dV(0,1)$, $dV(0,5)$, $dV(0,9)$ y span (% volumen) obtenidos para las dispersiones de *P. nalgiovense*, *M. hiemalis* y *A. niger*. Los parámetros $dV(0,1)$, $dV(0,5)$ (mediana), y $dV(0,9)$ indican los diámetros por debajo de los cuales se encuentra distribuido el 10, el 50 y el 90 % del volumen total respectivamente. Todos los hongos presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos en todos los diámetros estudiados. Para todos los hongos, se observó una reducción en los valores de los parámetros de span y los diámetros evaluados cuando el tiempo de tratamiento con US se incrementó de 15 a 30 minutos totales. En este último tratamiento, *A. niger* alcanzó los valores promedio más bajos de $D[4,3]$ ($13,17 \pm 0,00 \mu\text{m}$) seguido de *P. nalgiovense* ($14,57 \pm 0,06 \mu\text{m}$) y *M. hiemalis* ($34,26 \pm 0,23 \mu\text{m}$). Sin embargo, los valores de *M. hiemalis* $D[4,3]$ fueron muy cercanos para los tres tratamientos de ruptura celular correspondiéndose con el análisis de las micrografías. Estos valores fueron comparables a los reportados por Martínez et al. (2024) en dispersiones de *Paecilomyces variotii* tratadas por 15 minutos de ultrasonido ($14,5 \pm 0,5 \mu\text{m}$). Un tratamiento intermedio de UT con 15 minutos de US favoreció la ruptura celular para *M. hiemalis* y *A. niger*, obteniendo valores de $D[4,3]$ significativamente menores ($p < 0,05$) en el tratamiento 7,5US-UT-7,5US que los obtenidos con 15US. Esto sugiere que, para estos hongos, una homogeneización UT intermedia ayuda a romper los aglomerados producidos en el primer tratamiento US y conduce a una distribución más homogénea de partículas con menor dispersión. Lo anterior se corresponde con lo reportado por Martínez et al. (2024) quien observó que, en dispersiones al 3 % b.s. de *P. variotii* tratadas por 30 minutos de ultrasonido, un tratamiento de UT intermedio favorecía la ruptura. Por otro lado, las dispersiones de *P. nalgiovense* con el tratamiento 7,5US-UT-7,5US se caracterizaron por una mayor proporción de partículas de mayor tamaño, un $D[4,3]$ tres veces mayor que aquellas muestras sin un tratamiento intermedio de UT (15US), así como por curvas de distribución de tamaño de partícula más anchas y con mayor dispersión (% volumen). Esto se corresponde con una mayor extensión de las hifas observadas en las micrografías de estas dispersiones (Figura 24, C). Los resultados indicaron que la aplicación de un tratamiento intermedio de UT para un mismo tiempo total de ultrasonido no favoreció la ruptura, lo que sugiere que las dispersiones de *P. nalgiovense* requieren un

tratamiento continuo mínimo de 15 minutos US para lograr una mejor reducción del tamaño de partícula y una distribución más uniforme.

Respecto a las curvas de distribución en %número, la Figura 25 (D-F) muestra que todos los tratamientos evaluados fueron capaces de romper las células, demostrando que la mayoría de las partículas presentaron tamaños menores a los 10 μm . Se observan curvas con poca dispersión y con tendencia monomodal para *P. nalgiovense* y *A. niger*. En cuanto a *M. hiemalis* se obtuvieron distribuciones con tendencia bimodal que mostraron un mayor número de partículas de diámetros mayores que las demás cepas, lo que se correlacionó con lo observado por microscopía.

Las diferencias observadas con respecto a las distribuciones de partícula en %volumen probablemente se deben a la presencia de pocas partículas de gran tamaño que ocupan grandes volúmenes mientras que la mayoría de las partículas son pequeñas y ocupan poco volumen.

Hongo	Tratamiento	7,5US-1UT-7,5US	15US	15US-1UT-15US
MH	Span	5,12 $\pm$ 0,03	5,24 $\pm$ 0,02	4,85 $\pm$ 0,00
	D[4,3]	36,85 $\pm$ 0,72 ^c	39,13 $\pm$ 0,67 ^b	34,26 $\pm$ 0,23 ^a
	dV (0,1)	6,30 $\pm$ 0,01 ^c	6,34 $\pm$ 0,01 ^b	6,15 $\pm$ 0,01 ^a
	dV (0,5)	16,39 $\pm$ 0,06 ^c	16,75 $\pm$ 0,05 ^b	15,74 $\pm$ 0,08 ^a
	dV (0,9)	90,27 $\pm$ 0,31 ^c	94,11 $\pm$ 0,53 ^b	82,57 $\pm$ 0,45 ^a
AN	Span	5,09 $\pm$ 0,02	5,91 $\pm$ 0,22	3,09 $\pm$ 0,04
	D[4,3]	21,32 $\pm$ 0,08 ^c	24,09 $\pm$ 0,02 ^b	13,17 $\pm$ 0,00 ^a
	dV (0,1)	3,62 $\pm$ 0,00 ^c	3,67 $\pm$ 0,00 ^b	3,42 $\pm$ 0,00 ^a
	dV (0,5)	10,45 $\pm$ 0,03 ^c	11,00 $\pm$ 0,03 ^b	8,33 $\pm$ 0,01 ^a
	dV (0,9)	56,80 $\pm$ 0,23 ^c	67,16 $\pm$ 0,07 ^b	29,15 $\pm$ 0,39 ^a
PN	Span	27,74 $\pm$ 0,71	5,93 $\pm$ 0,31	3,40 $\pm$ 0,01
	D[4,3]	141,30 $\pm$ 4,13 ^c	33,48 $\pm$ 3,22 ^b	14,57 $\pm$ 0,06 ^a
	dV (0,1)	3,70 $\pm$ 0,03 ^c	3,45 $\pm$ 0,01 ^b	3,18 $\pm$ 0,00 ^a
	dV (0,5)	20,33 $\pm$ 0,74 ^c	12,61 $\pm$ 0,10 ^b	8,63 $\pm$ 0,02 ^a
	dV (0,9)	567,52 $\pm$ 16,28	78,23 $\pm$ 4,34 ^b	32,51 $\pm$ 0,17 ^a

* letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$) para un mismo hongo mediante la prueba de Tukey.

Tabla 7. Resultados del análisis distribución del tamaño de partícula en % Volumen (Span, D[4,3], dV (0,1) dV (0,5) y dV (0,9)). Valores expresados como media $\pm$ DS. (MH) *Mucor hiemalis*; (PN) *Penicillium nalgiovense*; (AN) *Aspergillus niger*.

4. REFERENCIAS

- Amrane. A., Plihon, F. y Prigent Y. (1999) Kinetics of growth and medium de-acidification for *Geotrichum candidum* and *Penicillium camemberti* cultivated on complex liquid media. World Journal of Microbiology & Biotechnology 15: 489-491.
- AOAC 2001.11 (2005) Protein (Crude) in Animal Feed, Forage (Plant Tissue), Grain, and Oilseeds Block Digestion Method Using Copper Catalyst and Steam Distillation into Boric Acid. First Action 2001. In: Official Methods of Analysis, 18th Edition, AOAC International, Gaithersburg, MD.
- AOAC 925.10 (2005) Solids (Total) and Moisture in Flour. In: Official Methods of Analysis, 18th Edition, AOAC International, Gaithersburg, MD.
- Baker F.J., y Silverton R.E. (1976) 22-Sterilization. In: (eds) Introduction to medical laboratory technology, 5th edn. Butterworth-Heinemann, Oxford, pp 465–475
- Balsano E., Esterhuizen-Londt M, Hoque E., Pflugmacher S (2016) Fungal pellets as potential tools to control water pollution: strategic approach for the pelletization and subsequent microcystin-LR uptake by *Mucor hiemalis*. J appl biol 4(04):031–041. <https://doi.org/10.7324/JABB.2016.40403>
- Barzee T.J, Cao L., Pan Z., Zhang R. (2021) Fungi for future foods. J Future Foods 1:25–37. <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2021.09.002>
- Binur R., Aryantha I.N.P, Suantika G. (2021) Nutritional profiling of microfungi and its effects on the growth performance, bacterial communities, and survival with *Vibrio harveyi* on white shrimp post-larvae (*Litopenaeus vannamei*) Aquaculture 545: 737260. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737260>.
- Borthwick, K.A.J., Coakley, W.T, McDonnell, M.B. Nowotny, H. Benes, E., Grfschl, M. (2005) Development of a novel compact sonicator for cell disruption. J. Microbiol. Methods. 60, 207– 216. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.09.012>.
- Caparrós, A.V. (2013) Jornada de servicios generales de análisis instrumental. 30 de octubre. Universidad de Murcia. Sala de Grados de la Facultad de Química.
- Chuppa-Tostain, G., Hoarau, J., Watson, M, Adelard, L. Shum Cheong Sing, A. Yanis Caro, C., Grondin, I., Bourven, I., Francois, JM., Girbal-Neuhauser, E. Petit, T. (2018) Production of *Aspergillus niger* biomass on sugarcane distillery wastewater: physiological aspects and potential for biodiesel production. Fungal Biol Biotechnol. 5:1.

- Cortés-Sánchez, A., Guadarrama, L.M. y Díaz-Ramírez, M. (2014) Producción de biomasa a partir de *Aspergillus oryzae* en cultivo sumergido. *Biotecnia*, XVI (3): 11-16.
- Crawford, A., Miller, S. R., Branco, S., Fletcher, J., y Stefanov, D. (2024) Growing mycelium leather: A paste substrate approach with post-treatments. *Research Directions: Biotechnology Design*, 2, e6. <https://doi.org/10.1017/btd.2024.6>
- Cui Y.Q., Van der Lans R.G., y Luyben K.C. (1997) Effect of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation. *Biotechnol Bioeng.*;55(5):715–26.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28, 3, 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Galletti B, Gazia F, Galletti C, Perani F, Ciodaro F, Freni F, Galletti F., (2019) Rhinocerebral mucormycosis with dissemination to pontine area in a diabetic patient: Treatment and management. *Clin. Case Rep.* 7(7), 1382-1387. <https://doi.org/10.1002/ccr3.2255>.
- Gibbs, P.A., Seviour R. J. y Schmid, F. (2000) The pH of the fermentation broth usually dropped during cell cultivation because of some unknown acid production. *Critical Reviews in Biotechnology*, 20(1):17–48
- Gogate, P., Kabadi, A., (2009) A review of applications of cavitation in biochemical Engineering/Biotechnology. *Biochem. Eng. J.* 44, 60-72. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.10.006>.
- Gómez-Flores, L., Martínez-Ruiz, N., Enríquez-Anchondo, I., Garza-Ocañas, F., Najera Medellín, J., Quiñónez-Martínez, M. (2019) Análisis proximal y de composición mineral de cuatro especies de hongos ectomicorrízicos silvestres de la Sierra Tarahumara de Chihuahua. *TIP Rev. Esp. Cienc. Quím. Biol.* 22. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2019.0.184>
- Hang, Y.D., Splittstoesser, D.F., y Woodams, E.E. (1975). Utilization of brewery spent grain liquor by *Aspergillus niger*. *Applied microbiology*, 30(5), 879–880.
- Hernández-López M., Bautista-Baños S, Ventura-Aguilar R.I., y Abarca-Franco A.G. (2019) Efecto de los diferentes medios de cultivo en la producción de biomasa y ergosterol en *Rhizopus stolonifer*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37 (No. Esp. 1) 22-28.

- Iwen, P., Thompson, G., Wiederhold, N. (2022) Mycotic Diseases, in: McPherson, R., Pincus, M. (Eds.), Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Ed. 24th, 1194-1228. ISBN: 978-0-323-67320-4
- Jakovljević, V., Milićević, J., Stojanović, J., y Vrvic, M. (2014) The ability of fungus *Mucor racemosus fresenius* to degrade high concentration of detergent. Chem. Ind. Chem. Eng. Q. 20 (4) 587–595.
- Kyanko, M.V., Canel, R.S., Ludemann, V., Pose, G., Wagner, J.R. (2013) β -Glucan content and hydration properties of filamentous fungi. Appl. Biochem. Microbiol. 49(1), 41–45. <https://doi.org/10.1134/s0003683813010080>.
- Leal D., Pico Y., Castro J., Guerra J., y Castro G. (2011) III. Producción de ácido cítrico a partir de suero lácteo entero e hidrolizado con *Aspergillus niger*, por vía fermentativa. Revista Alimentos Hoy. Vol 19, No 19. ISSN 2027-291X.
- Li, S., Huang, J., Mao, J., Zhang, L., He, C., Chen, G., Parkin, I. y Lai, Y. (2019) In vivo and in vitro efficient textile wastewater remediation by *Aspergillus niger* biosorbent. Nanoscale Adv., 2019, 1, 168
- Ludemann V., Greco M., Rodriguez M., Basílico J.C y Pardo A.G. (2010) Conidial production by *Penicillium nalgiovense* for use as starter cultures in dry fermented sausages by solid state fermentation. LWT - Food Science and Technology 43.315–318
- Malvern Instruments Limited (2015) A basic guide to particle characterization. Grovewood Road, Malvern, Worcestershire, UK. www.malvern.com
- Manan, M.A. y Webb, C. (2018) Estimation of growth in solid state fermentation: A review. Malaysian Journal of Microbiology, Vol 14(1) March. 61-69
- Manikandan, K. (2011). Nutritional and Medicinal values of Mushrooms. In: Manjit S., Vijai B., Shwet Kamal G.C. Chapter II: Nutritional and Medicinal values of Mushrooms Publisher: Directorate of Mushroom Research
- Martínez, E. (2018) Desarrollo de películas biodegradables a base de biomasa fúngica, a partir de *Paecilomyces variotii*. (Trabajo Final de Carrera de Ingeniería en Alimentos), Universidad Nacional de Quilmes.
- Martinez, E.A., Salvay, A.G., Sanchez-Díaz, M.R., Ludemann V., Peltzer M.A (2024) Functional characterization of biodegradable films obtained from whole

Paecilomyces variotii biomass. Int Microbiol 27, 1573–1585 (2024).
<https://doi.org/10.1007/s10123-024-00501-1>

- McCleary, B.V, Draga, A., (2016) Measurement of β -Glucan in Mushrooms and Mycelial Products. J. AOAC, Int. 99(2), 364-73. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.15-0289>.
- Miller, D.D. y Golding, N.S. (1949) The gas requirements of molds. V. The minimum oxygen requirements for normal growth and for germination of six mold cultures. J. Dairy Sci. 32: 101–110.
- Mitchell, D. A., Doelle, H. W., y Greenfield, P. F. (1989) Suppression of penetrative hyphae of *Rhizopus oligosporus* by membrane filters in a model solid-state fermentation system. Biotechnology Techniques, 3, 45–50.
- Nielsen J., Johansen C.L., Jacobsen M., Krabben P., y Villadsen J. (1995) Pellet formation and fragmentation in submerged cultures of *Penicillium chrysogenum* and its relation to penicillin production. Biotechnol Prog.;11(1):93–8
- Oshoma, O. y Ikenebomeh, M.J. (2005) Production of *Aspergillus niger* Biomass from Rice Bran. Pakistan Journal of Nutrition.4 (1):32-36.
- Papagianni, M., (2004) Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelia processes. Biotech. Adv., 22: 189-259.
- Parrilla, G. (2020). Evaluación de las propiedades antimicrobianas y antioxidantes de extractos naturales obtenidos de tegumento de maní, para su inclusión en biopelículas a base de biomasa fúngica. (Trabajo Final de Carrera de Ingeniería en Alimentos), Universidad Nacional de Quilmes.
- Pitt, J. I. y Hocking, A. D. (2009) Fungi and food spoilage. Springer Dordrecht Heidelberg. ISBN 978-0-387-92206-5. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>
- Quero-Jiménez, P.C., Montenegro, O.N., Sosa, R., López Pérez, D., Santana Rodríguez, A., Ramos Méndez, R., Calvo Alonso, A., Corrales, A.J., de la Torre, J.B., Valero Acosta, J., Broche Hernández, N. (2019) Total carbohydrates concentration evaluation in products of microbial origin. Afinidad. J. of Chem.Eng. Theor. and App.Chem. 76, num. 587.
- Rahardjo, Y. S. P., Korona, D., Haemers, S., Weber, F. J., y Rinzema, A. (2004) Limitations of membrane cultures as a model solid-state fermentation system. Letters in Applied Microbiology, 39, 504–508.

- Raimbault, M. (1998) General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. EJB Electronic Journal of Biotechnology Vol.1 No.3, Issue of December 15. ISSN: 0717-3458
- Rawle, A. (2002) The importance of particle sizing to the coatings industry Part 1: Particle size measurement. Advances in colour science and technology. University of Leeds. Volume 5 Number 1 January.
- Sacristán, N. (2015) Selección de cepas de *Geotrichum candidum* aisladas de quesos artesanales con vistas a la obtención de co-cultivos de interés tecnológico para la elaboración de quesos. Universidad de León. Facultad de veterinaria. Departamento de higiene y tecnología de los alimentos.
- Santhalin Shellomith, A.S. y Preetha, B. (2018) Production of Milk Clotting Enzyme by *Penicillium camemberti* using Whey medium. IOSR Journal of Biotechnology and Biochemistry (IOSR-JBB) ISSN: 2455-264X, Volume 4, Issue 1:33-40
- Singh, P., Paul, S., Shivaprakash, M.R., Chakrabarti, A., Ghosh, A.K. (2016) Stress response in medically important Mucorales. Mycoses. 59(10), 628–635. <https://doi.org/10.1111/myc.12512>.
- Sladdin M, y Lynch J.M. (1983) Antimicrobial properties of calcium peroxide in relation to its potential. Use as a seed dressing. J Gen Microbiol 129:2307–2314. <https://doi.org/10.1099/00221287-129-7-2307>
- Vansuijdam JC. y Metz B. (1981) Fungal pellet breakup as a function of shear in a fermenter. J Ferment Technol.;59(4):329–33.
- Veiter, L., Kager, J. y Herwig, C. (2020) Optimal process design space to ensure maximum viability and productivity in *Penicillium chrysogenum* pellets during fed-batch cultivations through morphological and physiological control. Microb Cell Fact. 19:33.
- Wani, B.A., Bodha, R.H., Wani, A.H. (2010) Nutritional and medicinal importance of mushrooms. J. Med. Plant Res., 4(24): 2598-2604.
- Xia, C., Zhang, J. Zhang, W. y Hu, B. (2011) A new cultivation method for microbial oil production: Cell pelletization and lipid accumulation by *Mucor circinelloides*. Biotechnology for Biofuels 4:15.

- Yang Y., Chen D., Yu Y., y Huang X. (2020) Effect of ultrasonic treatment on rheological and emulsifying properties of sugar beet pectin. *Food Sci Nutr.*8:4266–4275.
- Zhang J. y Zhang J. (2016) The filamentous fungal pellet and forces driving its formation. *Crit Rev Biotechnol.* ;36(6):1066–77.
- Zhang, L., Ye, X., Xue, SJ., Zhang, X., Liu, D., Meng, R., Chen, S., (2013) Effect of high-intensity ultrasound on the physicochemical properties and nanostructure of citrus pectin. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 93: 2028-2036. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6011>

CAPÍTULO II: OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS OBTENIDAS A PARTIR DE DISPERSIONES FILMOGÉNICAS



1. OBJETIVO

El objetivo de este capítulo fue caracterizar las películas obtenidas a partir de dispersiones fúngicas mediante el método evaporación del solvente (casting). Para ello se propuso:

- Evaluar la apariencia de las películas, cuantificando su color y opacidad.
- Estudiar las propiedades mecánicas, térmicas y de barrera al vapor de agua.
- Analizar la estructura molecular mediante espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).
- Examinar la morfología superficial utilizando microscopía de Fuerza Atómica (AFM).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Obtención de las películas

El proceso de producción de las películas se esquematiza en la Figura 26. Para ello se partió de las diferentes dispersiones de biomasa fúngica obtenidas según el ítem 2.3 (Capítulo I). Una vez obtenidas las dispersiones mediante los diferentes tratamientos de ruptura se agregó como agente plastificante glicerol al 25 % p/p, respecto al peso seco de la biomasa total presente en la dispersión. La mezcla se homogeneizó con ayuda de un agitador magnético durante 10 minutos a baja velocidad para evitar la formación de burbujas. Las películas se obtuvieron por el método de casting (evaporación del solvente) para ello se colocaron 20,0 g de la dispersión (3 % p/p b.s) en placas de Petri de plástico de 90 mm (Ø) y se secó en estufa a 37 °C durante entre 14-20 horas. Las películas se acondicionaron a 43 % de humedad relativa (h.r), mediante una solución saturada de K_2CO_3 , para su posterior caracterización.

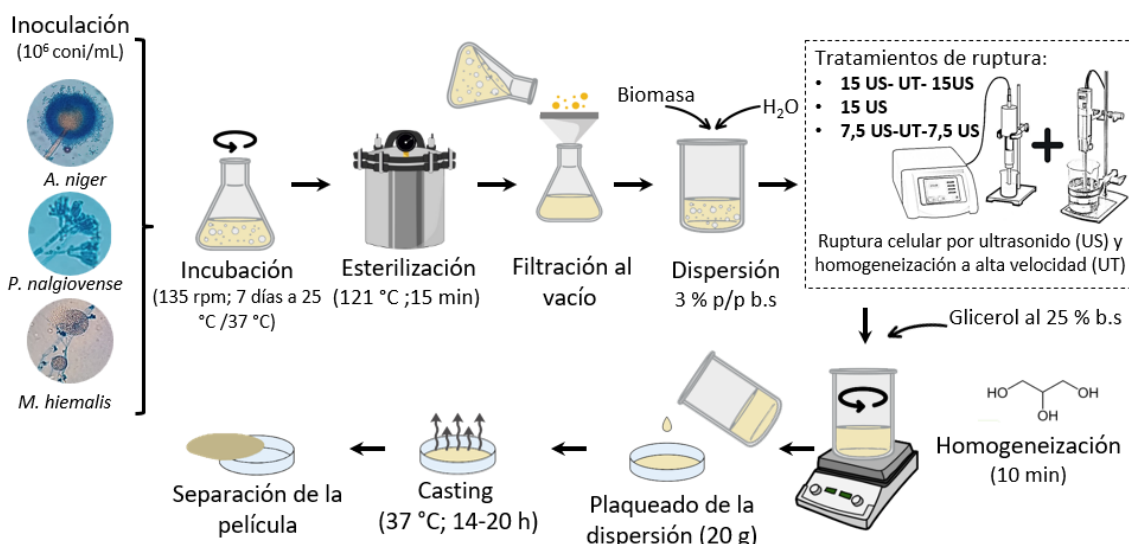


Figura 26. Esquema de preparación de las películas fúngicas.

2.1.1. Aspecto visual de las películas fúngicas

La calidad de las películas obtenidas se evaluó de acuerdo con el método propuesto por De Moraes et al. (2013) considerando aspectos de maleabilidad, homogeneidad y continuidad. La maleabilidad informa si la película puede manipularse sin dañarse; la continuidad considera la ausencia o presencia de rupturas en las películas, mientras que la homogeneidad informa sobre la uniformidad de la película.

2.1.2. Determinación del color

El color puede ser evaluado de forma visual e instrumental. Ambos métodos presentan ventajas e inconvenientes. Los métodos sensoriales son necesarios para conocer la valoración del consumidor acerca de la calidad visual del producto, pero se ven afectados por un gran número de factores, como las condiciones de iluminación, el ángulo de observación y las preferencias individuales del observador. Además, el ojo humano distingue cualitativamente el color, pero no lo cuantifica, por lo que no resulta un medio objetivo para realizar medidas de color. La ventaja del empleo de métodos instrumentales para cuantificar el color es que estos son repetibles y objetivos. Su desventaja es que, a menudo, son difíciles de interpretar por las personas no familiarizadas con ellos. Los colorímetros son equipos que cuantifican el color y que

presentan una mayor sensibilidad que la del ojo humano, cuyas medidas son reproducibles y bien correlacionadas con la percepción humana (Canada, 2001). El colorímetro mide la luz reflejada por la muestra por medio de un fotodetector, codificando esta señal en términos de algún sistema de medición lumínico de espacio polar, como es el caso de la Escala de CIE (Chacón-Villalobos y Pineda-Castro, 2009).

La autoridad en la ciencia de la luz y el color (CIE: Comisión Internationale de L'Eclairage, 1986) ha definido espacios de color, incluyendo CIE XYZ, CIE LCh, y CIE Lab, para comunicar y expresar el color objetivamente. El espacio de color Lab, también referido como CIELAB, es actualmente uno de los espacios de color más populares y uniforme usado para evaluar el color de un objeto. Este espacio de color es ampliamente usado porque correlaciona los valores numéricos de color consistentemente con la percepción visual humana. Investigadores y fabricantes lo usan para evaluar los atributos de color, identificar inconsistencias, y expresar precisamente sus resultados a otros en términos numéricos. El espacio de color CIELAB utiliza una terna de ejes ortogonales, basado en el modelo de los colores opuestos, y define cada color a partir de unas coordenadas denominadas L (claridad/oscuridad: 0, negro, a 100, blanco), a (coordenadas rojo/verde: +a indica rojo; -a indica verde), y b (coordenadas amarillo/azul: +b indica amarillo; -b indica azul) (Gilabert, 1992). De esta manera, los colores se representan en el espacio a unas distancias proporcionales a las diferencias visuales entre ellos (Figura 27).

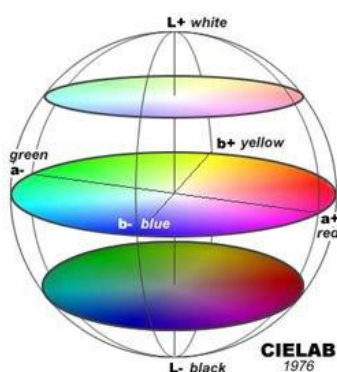


Figura 27. Sistema de ejes para la determinación de color por coordenadas CIELAB (C.I.E., 1986).

Según Casassa y Sari (2006) la llamada “Diferencia de color CIELAB” (ΔE) cuantifica numéricamente la diferencia de percepción de color, para el ojo humano, entre dos

muestras. La diferencia de color (ΔE) viene determinada por la siguiente ecuación (Calvo y Durán, 1997):

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2} \quad (\text{Ecuación 9})$$

Donde ΔE es la diferencia total de color; ΔL la diferencia en luz y oscuridad; Δa la diferencia en rojo y verde y Δb la diferencia en amarillo y azul. Los valores de ΔE obtenidos para una muestra en referencia al estándar permiten evidenciar si el observador podrá o no percibir la diferencia de color.

El color de las películas obtenidas se determinó utilizando un colorímetro Konica Minolta modelo CR-400. Las películas se colocaron en una platina blanca y se determinaron los parámetros L, a, b y ΔE . Se midieron 5 puntos de cada película y se tomó una platina blanca como patrón. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado. Los datos experimentales se sometieron a un Análisis de Varianza (ANOVA) para evaluar diferencias significativas y las diferencias de medias se discriminaron con la prueba post-hoc de Tukey ($\alpha=0,05$) (según ítem 2.4- Capítulo I).

Adicionalmente, se ingresó las coordenadas CIELAB promedio de las películas de cada hongo en el software Photoshop CS6 y se obtuvieron los códigos Hexadecimal de los colores más similares para cada uno. Con estos códigos se ingresó al sitio web: <https://www.color-name.com/hex/> y se obtuvieron los códigos y nombres de los colores más cercanos dentro de las paletas de los sistemas hexadecimal y RAL classic, un sistema europeo de combinación de colores que define colores para pinturas, plásticos y recubrimientos.

2.1.3. Determinación de la Opacidad

La opacidad es una propiedad óptica que refleja la capacidad de un material para impedir el paso de la luz a través de su estructura. Este parámetro se encuentra influenciado por factores como el espesor, la homogeneidad interna o la presencia de pigmentos naturales, entre otros. La opacidad de las películas se determinó midiendo la absorbancia de la película en 600 nm con un espectrofotómetro UV-9000S (Shanghai Metash Instruments Co., China) (Park y Zhao, 2004). Las películas se cortaron en

probetas rectangulares, se midió su espesor, y se colocaron directamente en la celda de prueba del espectrofotómetro. Se utilizó una celda de prueba vacía como blanco. Los resultados se informaron como absorbancia a 600 nm dividida por el espesor de la película (mm). Cada condición se evaluó por triplicado. Los datos se sometieron a un Análisis de Varianza (ANOVA) para evaluar diferencias significativas y las diferencias de medias se discriminaron con la prueba post-hoc de Tukey ($\alpha=0,05$) (según ítem 2.4-Capítulo I).

2.1.4. Análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia infrarroja (IR) se basa en el hecho de que la mayoría de las moléculas absorben la luz en la región infrarroja del espectro electromagnético, convirtiéndola en vibración de sus enlaces covalentes. Las vibraciones posibles pueden ser de deformación o flexión (*bending*) o de tensión o estiramiento (*stretching*). En las vibraciones de tensión cambia la distancia entre los dos átomos que intervienen en un enlace a lo largo de su eje. En cambio, las vibraciones de flexión se caracterizan por un cambio en el ángulo existente entre dos enlaces (Barraza-Garza et al., 2013).

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es una técnica de análisis espectroscópica que utiliza una parte del espectro electromagnético en la región del “Infrarrojo Medio” (longitudes de onda entre los 2500- 25000 nm / equivalente a número de onda 4000-400 cm^{-1}). La luz emitida por una fuente que produce todo el espectro completo de longitudes de onda se hace pasar por un dispositivo llamado interferómetro, el cual modifica la luz de una manera particular que permite el consiguiente procesamiento de datos. El haz de luz atraviesa la muestra y esta absorbe parte de la energía. Al otro lado, un detector recibe el haz de luz que deja pasar la muestra y lo envía a un ordenador. Este procesa toda la información, infiere cuál es la absorción correspondiente a cada longitud de onda y genera un espectro utilizando la técnica de la Transformada de Fourier (Mills, 2018). El análisis de una muestra por FTIR provee como resultado un espectro de absorción de infrarrojo el cual proporciona información de la estructura y concentración molecular. Todas las moléculas pueden manifestar una serie de bandas de absorción, cada banda corresponde con un movimiento de vibración de un enlace específico dentro de la molécula, a este conjunto de señales se les conoce

como la "huella dactilar" del compuesto. Moléculas tales como lípidos, proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y otras presentes en una muestra biológica tienen cada una un espectro de infrarrojo específico. La radiación es absorbida por un enlace cuando la frecuencia vibracional de la onda electromagnética usada es la misma que la del propio enlace, haciendo posible la asignación de picos de absorción a grupos funcionales específicos (Barraza-Garza et al., 2013).

Los espectros infrarrojos de las muestras se obtuvieron utilizando un analizador de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) (Affinity-1, Shimadzu Co., Japón) equipado con un módulo de punta de diamante de reflectancia total atenuada (ATR) (GladiATR, Pike Technologies, EE. UU.). Los espectros se obtuvieron en el rango de 4000–400 cm^{-1} como un promedio de 48 escaneos con resolución de 4,0 cm^{-1} y apodización Happ-Genzel. Para compensar el efecto de la humedad y el dióxido de carbono en el aire, se realizó un espectro en blanco antes de cada prueba (Ramírez Tapias et al., 2022). Los espectros se obtuvieron al menos por duplicado.

2.1.5. Estudio de las propiedades mecánicas: Ensayo de tracción uniaxial

Uno de los ensayos mecánicos de esfuerzo-deformación más comunes es el ensayo de tracción uniaxial, el cual puede ser utilizado para determinar varias propiedades de los materiales que son importantes para el diseño. El ensayo de tracción consiste en someter una muestra o probeta a la deformación hasta su rotura, con una carga que aumenta gradualmente y que es aplicada uniaxialmente a lo largo del eje de la probeta. Se utilizan probetas normalizadas de sección circular o rectangular y se montan con sus extremos en las mordazas de la máquina de ensayos. Esta procede a alargar la probeta a una velocidad constante, midiendo continua y simultáneamente la carga instantánea aplicada y el alargamiento resultante. El ensayo dura varios minutos y es destructivo (Callister, 1995). Como resultado del ensayo se obtiene la curva tensión-deformación (Figura 28), característica de cada material, a partir de la cual es posible determinar diversas propiedades mecánicas, tales como el módulo de elasticidad o módulo de Young (YM, MPa), la elongación a la rotura (EB, %) y la resistencia a la tracción o tensión máxima (TS, MPa), entre otras. El módulo de Young (YM) indica la rigidez del material y se calcula a partir de la pendiente de la región elástica de la curva tensión-deformación,

es decir, del segmento lineal inicial; valores más altos reflejan un material más rígido y menos susceptible a deformaciones elásticas. La resistencia a la tracción o tensión máxima (TS) corresponde a la mayor tensión que el material puede soportar antes de iniciar la fractura. Por su parte, la elongación a la rotura (EB%) representa la capacidad del material de estirarse antes de fracturarse, aportando información sobre su flexibilidad o ductilidad. La combinación de estos tres parámetros permite caracterizar de manera integral la resistencia, rigidez y adaptabilidad del material, ofreciendo una visión completa de su comportamiento mecánico (Callister, 1995).

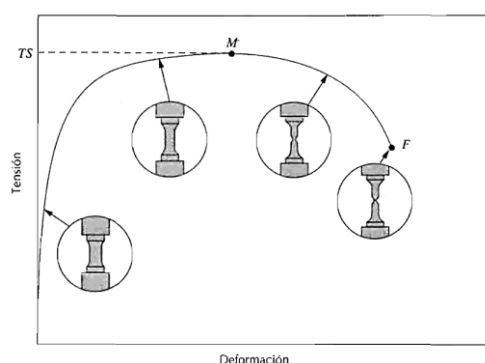


Figura 28. Curva típica de tracción hasta la fractura, punto F. La resistencia a la tracción TS está indicada en el punto M. Los insertos circulares representan la geometría de la probeta deformada en varios puntos de la curva. (Callister, 1995)

El estudio de las propiedades mecánicas de las películas obtenidas se realizó mediante un ensayo de tracción uniaxial utilizando una máquina de ensayos universales Megatest® TC-500 serie II (Micrometric SRL, Buenos Aires, Argentina) (Figura 29, A). Para ello se cortaron 10 probetas rectangulares de 50 × 10 mm (Figura 29, B y C) de cada condición a evaluar y se midió el espesor en 5 puntos diferentes, con micrómetro digital Insize 3109-25A (0-25 mm) para luego calcular el área transversal a la fuerza aplicada. El comportamiento mecánico de las películas es fuertemente dependiente de su hidratación o contenido de agua, ya que esta puede actuar como plastificante. Por este motivo, previamente al ensayo, las probetas fueron acondicionadas durante una semana a 22 °C y 52 % h.r en un desecador con una solución saturada de $Mg(NO_3)_2$ ubicada en su interior. Para la prueba se utilizó una celda de carga de 30 Kgf y una distancia de 25 mm entre mordazas. El ensayo se realizó a una velocidad de 5 mm/min. A partir de las curvas de tensión-deformación obtenidas se determinó, para cada una de

las muestras, el módulo de Young YM (MPa), la elongación a la ruptura EB (%), y la resistencia a la tracción o tensión máxima TS (MPa), como un promedio de diez ensayos según la norma ASTM D882-97.

Los resultados obtenidos fueron evaluados mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) y aplicando el test de Tukey para la comparación de las medias ($\alpha=0,05$) (Según el ítem 2.4-Capítulo I).

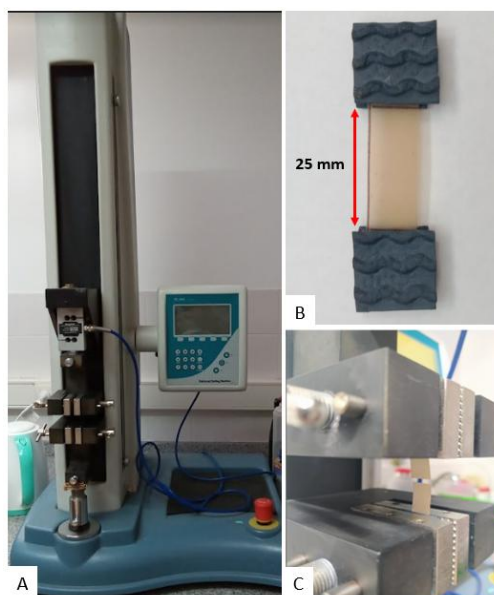


Figura 29. A) Máquina de ensayos universales Megatest® TC-500 serie II; B) Probeta preparada; C) Probeta entre las mordazas del equipo luego de la ruptura.

2.1.6. Análisis termogravimétrico (TGA)

La termogravimetría es una técnica utilizada para la caracterización de materiales. El análisis termogravimétrico (TGA, por sus siglas en inglés) dinámico consiste en registrar continuamente la variación de la masa del material en estudio, en una atmósfera controlada, conforme se varía la temperatura a una tasa térmica constante (cambio de temperatura lineal) (Skoog et al., 2002; Rodríguez y Villegas, 2012). Entre las aplicaciones más importantes del análisis termogravimétrico están el análisis de los perfiles de descomposición y el estudio de la estabilidad térmica de los materiales. En los estudios sobre polímeros, los termogramas proporcionan información sobre los mecanismos de descomposición de diversas preparaciones poliméricas. Además, los

patrones de descomposición son característicos de cada tipo de polímero y, en algunos casos, pueden utilizarse con fines de identificación (Skoog et al., 2002).

En este trabajo se estudió la degradación térmica de las películas fúngicas obtenidas y de la biomasa sin tratar (control) mediante un análisis termogravimétrico (TGA) a partir de la pérdida de masa en función de la temperatura. Para ello se utilizó una termobalanza Q-500 (TA Instruments, Delaware, USA) en el rango de temperatura de 30 a 600 °C. Se pesaron entre 6 y 10 mg de muestra, previamente acondicionada a 43 % h.r., y se analizaron a 10 °C/min bajo atmósfera de nitrógeno (60 mL/min). La temperatura de degradación inicial (T_0) se determinó al 5 % de pérdida de masa seca, mientras que las temperaturas a la máxima tasa de degradación (T_{max}) para cada etapa de degradación se determinaron a partir de los picos de las curvas derivadas (DTGA). Todas las muestras se analizaron por duplicado.

2.1.7. Permeabilidad experimental al vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua es uno de los principales parámetros que definen las propiedades de barrera de un material. El análisis de las interacciones de las películas biobasadas y las moléculas de agua tiene gran importancia en el área del envasado, con el fin de saber si las películas se pueden aplicar como una barrera eficaz para evitar la hidratación o deshidratación del producto (Ramos et al., 2012; Delgado et al., 2018a). El transporte de agua a través de películas poliméricas no ocurre a través de poros, pero puede entenderse a través de un modelo que propone que el proceso ocurre en cuatro etapas: (i) absorción de vapor de agua sobre la superficie de la matriz polimérica; (ii) solubilización de vapor de agua en la matriz polimérica; (iii) difusión de agua a través de la matriz; y (iv) desorción de vapor de agua de la otra superficie de la película. Por lo tanto, la permeabilidad al vapor de agua en estos materiales depende de la hidratación o solubilidad del agua en la película, así como de la movilidad del agua dentro de la matriz (Delgado et al., 2018a).

La permeabilidad al vapor de agua se puede determinar experimentalmente mediante mediciones en estado estacionario, cuantificando el movimiento de vapor de agua a través de la película de forma gravimétrica.

En este trabajo, la permeabilidad al vapor de agua de las películas se determinó mediante el método gravimétrico de la copa ASTM E-96 con algunas modificaciones (Delgado et al., 2018a). Las películas se colocaron, en celdas de acrílico de boca circular de aproximadamente 53 mm, las cuales contenían una solución saturada de BaCl_2 , que generaba una h.r. del 90 % (Figura 30). Entre la celda y la película se colocaron O-rings ligeramente engrasados y se dejó un espacio de aire estanco entre la película y la solución saturada. Luego, se colocó la parte superior de la celda y se ajustó cuidadosamente con tornillos para sellarlas evitando dañar la película. El conjunto película-celda se pesó ($t=0$ min) y se colocó en un desecador que contenía una solución saturada de NaOH que generaba una h.r. del 10 %. De esta manera una cara de la película quedaba expuesta a una h.r. del 90 % y la otra cara a 10 % h.r. Se utilizó un desecador acoplado con un ventilador dentro para mantener las condiciones de aire uniformes (Mc Hugh et al., 1993; Gennadios et al., 1994; Delgado et al., 2018a). Las mediciones se realizaron pesando la cápsula en balanza analítica ($\pm 10^{-3}$) a intervalos de tiempo determinados durante aproximadamente 32 h. El experimento se realizó a una temperatura constante de 22 °C. A esta temperatura, la cara de la película expuesta a 10 % h.r. soportaba una presión parcial de vapor de agua (p_w) de 263,93 Pa, mientras que la expuesta a 90 % h.r. soportaba una p_w de 2375,41 Pa, generándose una diferencia de presión parcial de vapor de agua (Δp_w) de 2111,47 Pa entre ambas caras de la película. La transferencia de agua a través de la película ocurre debido a la fuerza impulsora originada por la diferencia de presión de vapor de agua (Δp_w) que existe las dos caras. De esta forma se genera un flujo de agua desde el interior de la celda a alta h.r. hacia el ambiente del desecador a baja h.r., produciéndose una disminución del peso de la celda. Cuando la pérdida de peso de la celda (Δm) en función del tiempo presenta una relación lineal, luego de determinado tiempo de iniciado el experimento, el flujo difusivo de agua se vuelve constante, alcanzando de esta forma el estado estacionario. De esta manera, se graficó la pérdida de peso del conjunto película-celda (Δm) versus el tiempo y se calculó el flujo de vapor de agua (J_w) mediante la pendiente de una regresión lineal de pérdida de peso versus tiempo ($\Delta m/\Delta t$) mediante la Ecuación 10.

$$J_w = \frac{1}{A} \left(\frac{\Delta m}{\Delta t} \right) \quad (\text{Ecuación 10})$$

donde A corresponde al área efectiva de difusión de vapor de agua de la película para las celdas usadas; y $(\Delta m/\Delta t)$ es la pendiente de la zona lineal de la curva Δm vs. t .

La permeabilidad experimental al vapor de agua (P_w^{exp}) se determinó según la Ecuación 11.

$$P_w^{exp} = \frac{J_w}{\Delta p_w} * E \quad (\text{Ecuación 11})$$

donde E es el espesor de la sección de la película expuesta al flujo (promedio de 30 mediciones) y Δp_w es la diferencia de presión parcial del vapor de agua que existe entre ambas caras de la película. Por convención, la permeabilidad al vapor de agua se expresó en unidades de $10^{-10} \text{ g s}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$. Todas las muestras se analizaron por duplicado.

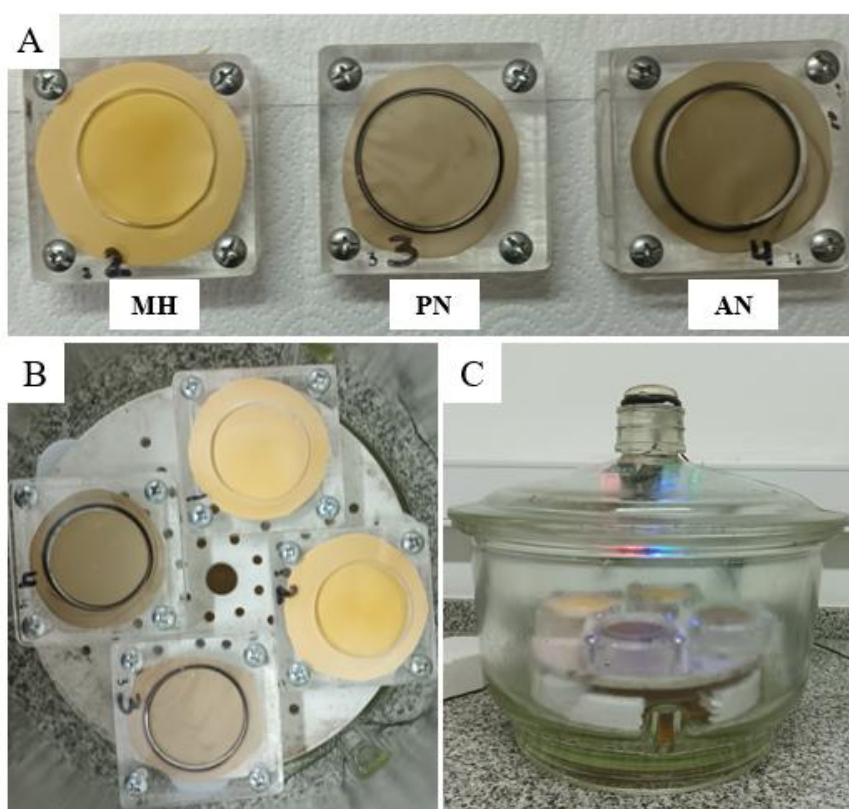


Figura 30. A) Conjunto película-celda: (MH) *M. hiemalis*; (PN) *P. nalgiovense*; (AN) *A. niger*. B; C) Celdas dispuestas en el desecador durante el experimento.

2.1.8. Microscopía de fuerza atómica (AFM)

El Microscopía de Fuerza Atómica (AFM, por sus siglas en inglés) es una técnica que se utiliza ampliamente para la obtención de imágenes superficiales de alta resolución; así como para obtener información de las propiedades mecánicas de un material. Como principal ventaja tiene la posibilidad de hacer medidas sin ningún tratamiento previo de la muestra a medir, y sin la necesidad de emplear vacío. El sistema del AFM permite desarrollar un perfil en tres dimensiones de la superficie, lo que resulta en un ensayo de topografía. Su funcionamiento se basa en una pequeña punta situada en el extremo de una palanca flexible (cantiléver) que realiza un barrido sobre la superficie de la muestra a ser evaluada, de forma que va tomando los datos para determinar las características topográficas y de fases del material. Un haz láser se refleja en la parte posterior del cantiléver hacia un fotodiodo de cuatro cuadrantes, el cual detecta los pequeños desplazamientos producidos por las fuerzas de interacción (van der Waals, electrostáticas y repulsivas). Las diferencias en la señal registrada por los fotodiodos superior, inferior, derecho e izquierdo permiten calcular la deflexión proporcional de la viga, mientras que un sistema de retroalimentación controlado por software ajusta continuamente la posición de la punta para mantener constante la altura o la fuerza aplicada (Figura 31). Esta herramienta cuenta con diversos modos de operación, algunos de ellos son: estáticos, dinámicos, tapping y contacto, entre otros (García y Kikut Cruz; 2020).

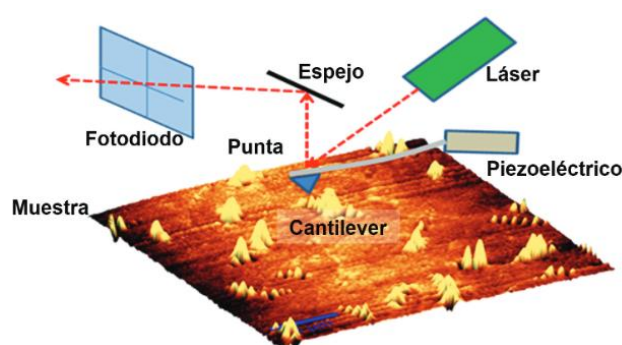


Figura 31. Funcionamiento del AFM (García y Kikut Cruz, 2020).

La topografía de las películas fúngicas obtenidas bajo el tratamiento 15US-UT-15US fueron analizadas mediante AFM. Las imágenes se obtuvieron en un nanoscopio

multimodo V (Veeco, Santa Bárbara, CA, EE. UU.) operando en modo de tapping con una sonda de silicio grabada modelo Arrow-NCR-50 Nano World (frecuencia de resonancia del cantiléver de 258 kHz, fuerza constante de 42 N/m, radio de la punta de 5 a 10 nm). Las velocidades de escaneo típicas fueron de 1 a 1,5 Hz.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Aspecto visual de las películas fúngicas

Fue factible obtener películas maleables a partir de todas las dispersiones obtenidas de *M. hiemalis*, *A. niger* y *P. nalgiovense*, independientemente de la condición de ruptura aplicada (Figura 32). Las películas de *P. nalgiovense* y *A. niger* se separaron fácilmente de las placas de Petri al contrario que las películas de *M. hiemalis*. En general todas las películas presentaron una textura suave con una adecuada continuidad y homogeneidad, sin burbujas ni aglomerados independientemente del tratamiento de ruptura celular aplicado.

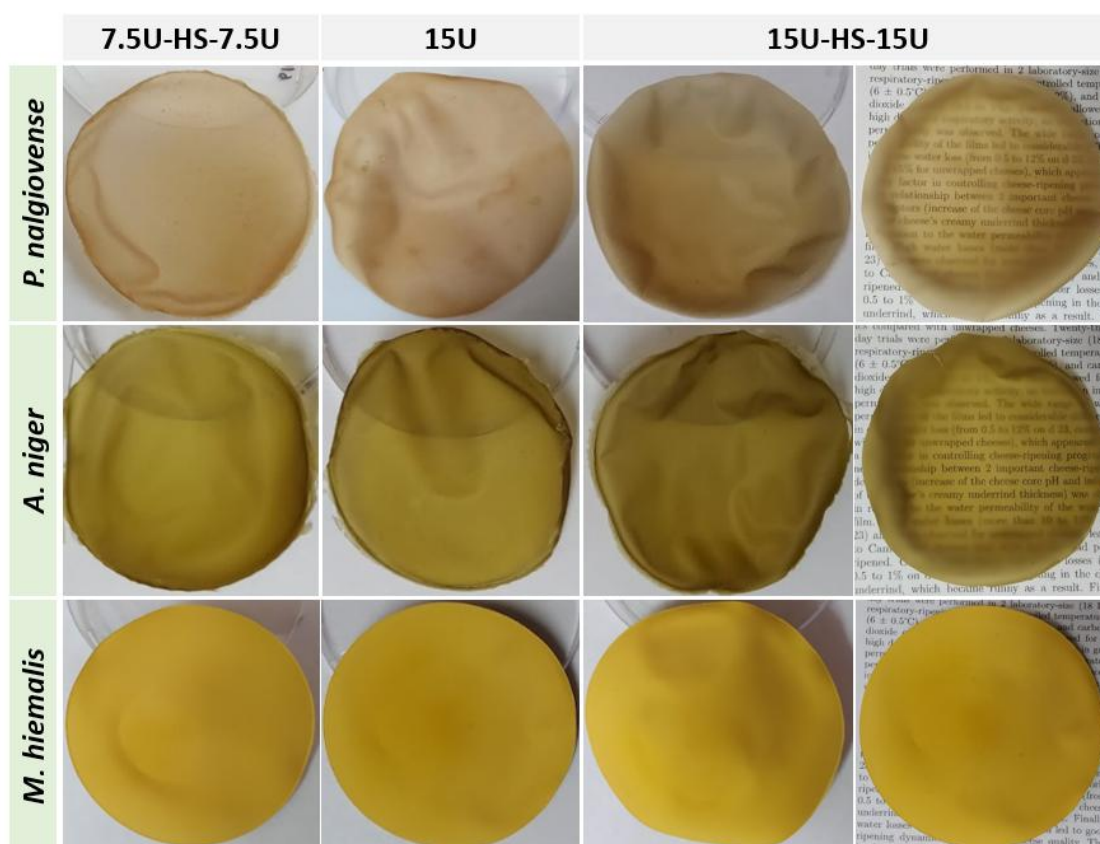


Figura 32. Películas obtenidas a partir de biomasa de A-D) *P. nalgiovense*, E-H) *A. niger*, y I-L) *M. hiemalis* con diferentes tratamientos de ruptura.

No obstante, las películas de *P. nalgiovense*, obtenidas con dispersiones de 15 minutos de ultrasonido presentaron sutiles zonas de menor uniformidad debida a aglomerados de biomasa sin romper (Figura 33). Estos aglomerados fueron más grandes y localizados en películas obtenidas con dispersiones tratadas por 15US que en las obtenidas a partir de dispersiones 7,5US-UT-7,5US. La heterogeneidad observada en estas películas sugiere que el tratamiento con 15U no es del todo suficiente para obtener películas completamente homogéneas y uniformes para esta cepa fúngica. La Figura 32 muestra que las películas de *P. nalgiovense* y *A. niger* fueron bastante translúcidas, lo que permitía ver a través de ellas, contrariamente a las de *M. hiemalis* que resultaron totalmente opacas.

Todas las películas obtenidas conservaron sus propiedades iniciales de apariencia y maleabilidad durante el almacenamiento en condiciones ambientales, sin evidenciar contaminación microbiana a lo largo del tiempo.

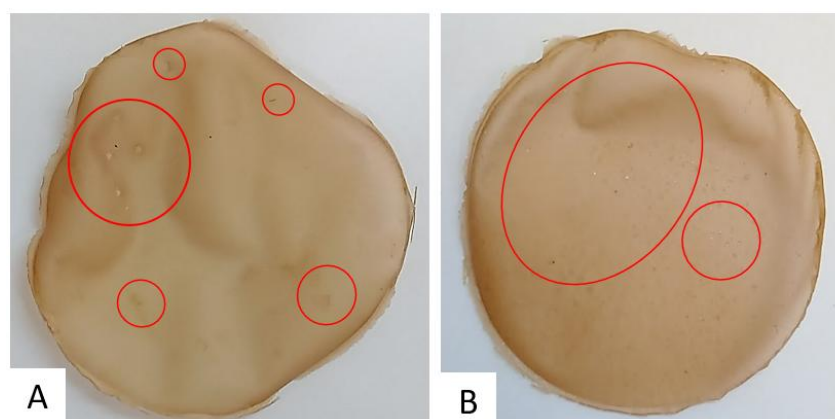


Figura 33. Películas obtenidas a partir de biomasa de *P. nalgiovense* con diferentes tratamientos de ruptura. A) 15US; b) 7,5US-UT-7,5US. En rojo se señalan las áreas de heterogeneidad.

3.2. Determinación del color y opacidad

La Tabla 8 reúne los resultados del análisis de color y opacidad para las películas de *Mucor hiemalis*, *Aspergillus niger* y *Penicillium nalgiovense*. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en los valores de las coordenadas CIELAB para las películas preparadas con dispersiones provenientes de diferentes tratamientos de ruptura celular. Las películas de *M. hiemalis* presentaron los valores más altos de los

parámetros L y b indicando mayor luminosidad y coloración amarilla, respectivamente. Las películas de *A. niger* mostraron una luminosidad neutra. Por otro lado, los valores de los parámetros a y b de las películas de *A. niger* y *P. nalgiovense* indicaron una coloración marrón, mostrando *P. nalgiovense* una tendencia mayor al color rojo. Estos resultados concuerdan con otros estudios que reportan que el color de las películas está fuertemente influenciado por el tipo de microorganismos que las componen o la biomasa microbiana utilizada para elaborar las películas. En este sentido, Coma et al. (2019) obtuvieron películas transparentes e incoloras a base de granos de kéfir de agua, mientras que Delgado et al. (2021) desarrollaron películas de color ámbar basadas en biomasa de levadura.

Muestra	Parámetro	7,5US-UT-7,5US	15US	15US-UT-15US
MH	L	69,55 ± 0,30 ^a	70,02 ± 0,44 ^a	69,81 ± 0,37 ^a
	a	3,23 ± 0,21 ^a	3,25 ± 0,15 ^a	3,09 ± 0,22 ^a
	b	30,39 ± 0,08 ^a	30,60 ± 0,23 ^a	30,63 ± 0,29 ^a
	ΔE	35,20 ± 0,21 ^a	35,08 ± 0,31 ^a	35,21 ± 0,33 ^a
	Opacidad	14,91 ± 1,02 ^a	14,19 ± 1,51 ^a	15,13 ± 0,56 ^a
AN	L	53,33 ± 1,46 ^a	53,33 ± 0,83 ^a	54,70 ± 1,60 ^a
	a	2,08 ± 0,34 ^a	1,70 ± 0,14 ^a	1,79 ± 0,39 ^a
	b	21,18 ± 0,57 ^a	21,65 ± 0,26 ^a	21,21 ± 0,63 ^a
	ΔE	42,38 ± 1,23 ^a	42,55 ± 0,75 ^a	41,15 ± 1,34 ^a
	Opacidad	12,07 ± 0,14 ^a	11,63 ± 0,79 ^a	11,37 ± 0,23 ^a
PN	L	57,92 ± 3,22 ^a	57,81 ± 2,52 ^a	59,77 ± 3,30 ^a
	a	5,73 ± 0,64 ^a	5,33 ± 0,63 ^a	5,26 ± 0,53 ^a
	b	18,79 ± 0,46 ^a	18,84 ± 0,46 ^a	18,56 ± 0,51 ^a
	ΔE	37,61 ± 2,97 ^a	37,66 ± 2,38 ^a	35,80 ± 3,04 ^a
	Opacidad	9,54 ± 0,11 ^b	8,78 ± 0,36 ^{ab}	8,65 ± 0,03 ^a

*Diferentes letras en una misma fila indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre tratamientos para un mismo hongo mediante la prueba de Tukey.

Tabla 8. Resultados del análisis colorimétrico CIELAB y de opacidad de películas a base de biomasa fúngica. Valores expresados como media ± DS. (MH) *Mucor hiemalis*; (PN) *Penicillium nalgiovense*; (AN) *Aspergillus niger*.

La Figura 34 muestra los nombres de los colores de las películas obtenidas en la paleta de color hexadecimal y RAL classic. El sistema RAL classic es un sistema europeo de combinación de colores que define colores para pinturas, plásticos y recubrimientos. En dicha paleta de color los colores más similares a los obtenidos fueron: amarillo arena (1002), gris oliva (7002) y amarillo oliva (1020) para *M. hiemalis*, *A. niger* y *P. nalgiovense*, respectivamente.

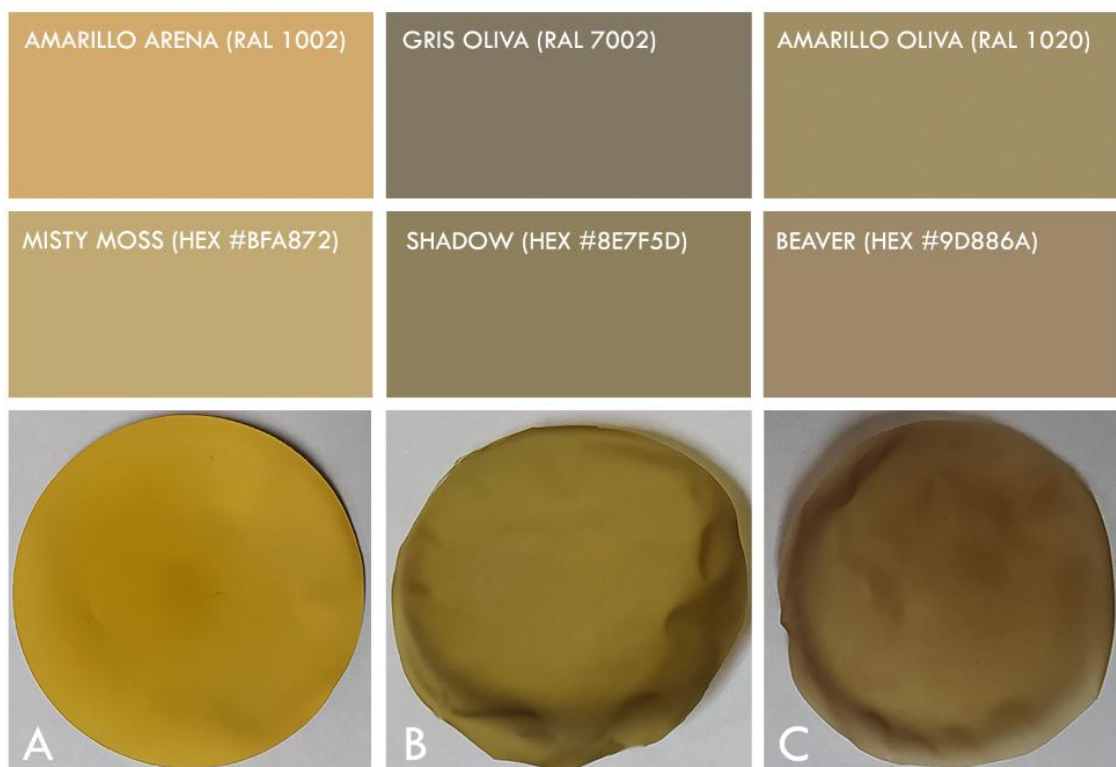


Figura 34. Nombres de los colores de las películas (15US) obtenidos según las paletas hexadecimal y RAL classic A) *M. hiemalis*; B) *A. niger*; C) *P. nalgiovense*.

En cuanto a la opacidad, las únicas películas que mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos de ruptura fueron las de *P. nalgiovense* obtenidas con las dispersiones 15US-UT-15US y 7,5US-UT-7,5US, posiblemente debido a la presencia de aglomerados en estas últimas. Las películas *P. nalgiovense* y *A. niger* presentaron menor opacidad, mientras que las de *M. hiemalis* se destacaron por presentar la mayor opacidad, siendo completamente opacas al ojo humano (Figura 32).

3.3. Análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros FTIR de las películas de micelio se muestran en la Figura 35. Para la comparación estandarizada, los espectros se normalizaron frente a la banda que se encuentra alrededor de 1030 cm^{-1} asignada como una señal representativa de polisacáridos (Ramírez Tapias et al., 2022). Estos espectros mostraron similitud con los reportados para hongos filamentosos y se asociaron con las diferentes biomoléculas que los componen. En todas las condiciones, se pudieron distinguir seis zonas bien definidas. La zona I con bandas en $3700\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ se atribuyó a las vibraciones de estiramiento de grupos O-H debidas al agua, los polisacáridos y las moléculas de glicerol (Haneef et al. 2017; Kachel-Jakubowska et al., 2017; Lopez-Díaz et al., 2017; Ramírez Tapias et al., 2022) y al estiramiento N-H de aminas secundarias, que también puede ser asociado con la quitina (Dzurendova et al. 2020). La banda de absorción en la región alrededor de $3000 - 2800\text{ cm}^{-1}$ (zona II) correspondió a diferentes modos de estiramiento de CH_2 y CH_3 asociados con lípidos (Lecellier et al., 2015; Haneef et al. 2017; Dzurendova et al. 2020). En la zona III, un pequeño pico alrededor de 1740 cm^{-1} se atribuyó al estiramiento de C=O debido a la presencia de lípidos (Haneef et al., 2017; Dzurendova et al., 2020). La Zona IV mostró vibraciones de amida asociadas con proteínas y quitina, representadas por dos picos distintos alrededor de $1650\text{-}1580\text{ cm}^{-1}$ y $1549\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$ que correspondían a la amida I y la amida II, respectivamente (Haneef et al., 2017; Lorenz-Fonfria, 2020). El intervalo entre $1449\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$ (zona V) a menudo se considera como una región "mixta" que incluye vibraciones asociadas con lípidos, proteínas (amida III), grupos funcionales unidos en polisacáridos, quitina, ácidos nucleicos y fosfolípidos (Lecellier et al., 2015; Haneef et al. 2017; Saif et al., 2020). La última zona (zona VI) incluía la región entre $1249\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ atribuida principalmente a polisacáridos con máximos alrededor de 1030 cm^{-1} . Además de los polisacáridos, esta región también se asoció con el estiramiento de grupos C-O-C, C-O y P=O atribuidos a la ribosa, el glucógeno y los ácidos nucleicos (Lecellier et al., 2015; Haneef et al. 2017; Saif et al., 2020; Šimonovicová et al., 2021).

Aunque las diferencias observadas entre hongos fueron sutiles, los espectros obtenidos para *P. nalgiovense* y *A. niger* mostraron mayor similitud entre ellos que los obtenidos para *M. hiemalis* (principalmente en las zonas II, IV y V) como era de esperar debido a

las diferencias en su composición. No se evidenciaron diferencias en los espectros entre los tratamientos de ruptura celular evaluados para las películas de *A. niger*. Por otro lado, para las películas de 7,5US-UT-7,5US de *P. nalgiovense*, los espectros mostraron una reducción en las bandas de absorción de las zonas IV y V en comparación con los otros tratamientos, probablemente asociado con una menor homogeneidad de los materiales debido a la menor intensidad del tratamiento. Los espectros de *M. hiemalis* 15US mostraron diferencias en las bandas de absorción en la zona II respecto a las muestras con un tratamiento intermedio de UT. Esto sugiere que un tratamiento intermedio con UT podría contribuir a homogeneizar la matriz favoreciendo la interacción entre polímeros.

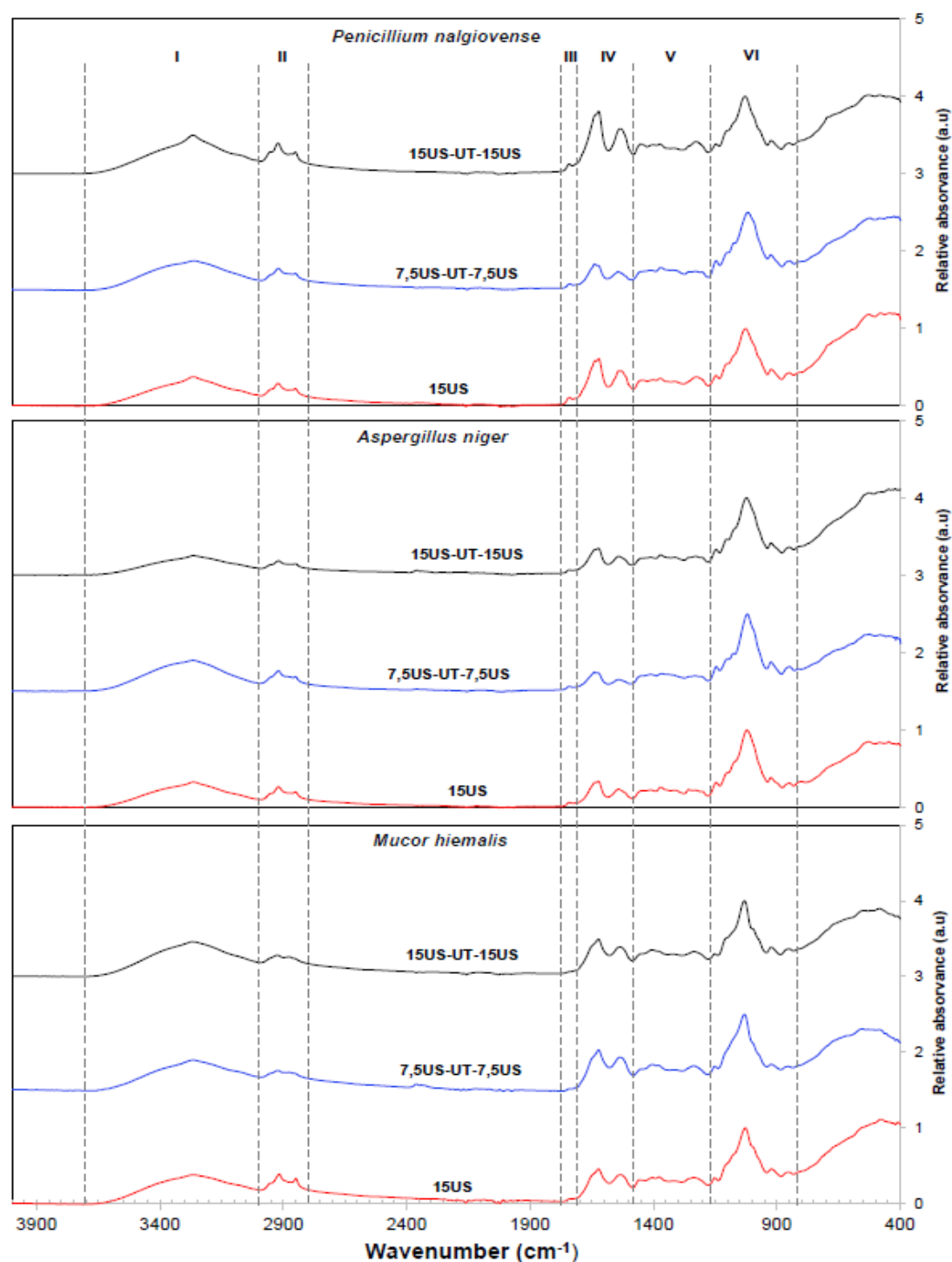


Figura 35. Espectros FTIR de películas obtenidas en el rango de 4000 a 400 cm^{-1} . Las zonas espectrales características correspondientes a las principales macromoléculas se indican entre líneas de puntos.

3.4. Estudio de las propiedades mecánicas: Ensayo de tracción uniaxial

En la Tabla 9 se muestran los resultados de las propiedades mecánicas (módulo de Young (YM), elongación a la ruptura (EB) y resistencia máxima a la tracción (TS)) de las películas de *M. hiemalis*, *A. niger* y *P. nalgiovense* obtenidas con dispersiones sometidas a diferentes tratamientos de ruptura.

Muestra	Parámetro	7,5US-UT-7,5US	15US	15US-UT-15US
MH	TS(MPa)	2,62 ± 0,58 ^a	2,04 ± 0,54 ^a	2,63 ± 0,65 ^a
	YM (MPa)	112,66 ± 16,87 ^a	91,16 ± 19,69 ^a	100,58 ± 14,34 ^a
	EB (%)	3,52 ± 0,62 ^a	3,31 ± 0,74 ^a	3,13 ± 0,85 ^a
AN	TS(MPa)	7,50 ± 2,12 ^a	5,75 ± 1,94 ^a	6,65 ± 1,68 ^a
	YM (MPa)	131,41 ± 48,06 ^a	107,06 ± 39,06 ^a	136,33 ± 51,78 ^a
	EB (%)	15,65 ± 3,72 ^a	15,47 ± 2,06 ^a	11,90 ± 3,75 ^a
PN	TS (MPa)	4,72 ± 0,63 ^a	4,07 ± 1,01 ^a	3,96 ± 0,42 ^a
	YM (MPa)	92,77 ± 18,42 ^a	85,23 ± 21,68 ^a	80,17 ± 13,50 ^a
	EB (%)	16,60 ± 2,18 ^b	11,70 ± 3,39 ^a	14,43 ± 2,99 ^{ab}

*Diferentes letras en una misma fila indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$) mediante la prueba de Tukey.

Tabla 9. Resultados del ensayo de tracción uniaxial (TS: Resistencia máxima a la tracción; MY: Módulo de Young; EB: Elongación a la ruptura). Valores expresados como media ± DS. (MH) *M. hiemalis*; (PN) *P. nalgiovense*; (AN) *A. niger*.

No se encontraron diferencias significativas en el módulo de Young, elongación a la rotura y resistencia máxima a la tracción entre los diferentes tratamientos de ruptura celular para las películas de *M. hiemalis* y *A. niger*. Las películas de *P. nalgiovense* presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en los parámetros de elongación a la rotura entre películas preparadas con dispersiones 15US y 7,5US-UT-7,5US. Las películas de *A. niger* se caracterizaron por los valores más altos de módulo de Young y la máxima resistencia a la tracción. Por otro lado, las películas de *M. hiemalis* presentaron los valores más bajos de resistencia máxima a la tracción y elongación a la rotura. En general, la pared celular de las hifas es una red resistente que está formada por una matriz interna de quitina-glucano altamente entrecruzada seguida de una capa externa rica en proteínas que le confiere importantes características mecánicas y estructurales (Amobonye et al., 2023). Según Lew (2019), la mecánica del estrés de las hifas fúngicas se puede atribuir a su elasticidad, rigidez y plasticidad, que son las diversas respuestas intrínsecas de sus paredes celulares al estrés. Si bien las estructuras de quitina-glucano son responsables de la resistencia de la estructura, la plasticidad se puede atribuir al componente proteico (Amobonye et al., 2023). En los mucorales, la falta de tabicación regular, y su composición de glucanos, quitina y otros polisacáridos estructurales (Bracker y Butler, 1963; Seiler y Heilig, 2019) podría contribuir a la naturaleza frágil de

sus hifas y de las películas basadas en estos microorganismos. Se observó que el ajuste de las propiedades mecánicas de los materiales basados en micelio se puede atribuir al contenido variable de quitina, glucanos y proteínas dentro de sus paredes de las hifas (Bustillos et al., 2020). Esto se corresponde con las diferencias observadas en el contenido de glucanos y proteínas del micelio de las especies fúngicas estudiadas. Esto puede observarse en las curvas de tensión vs deformación de las películas (Figura 36) evidenciándose la mayor fragilidad de las películas de *M. hiemalis* en comparación con las de *A. niger* y *P. nalgiovense*, que resultaron ser más rígidas y elásticas respectivamente.

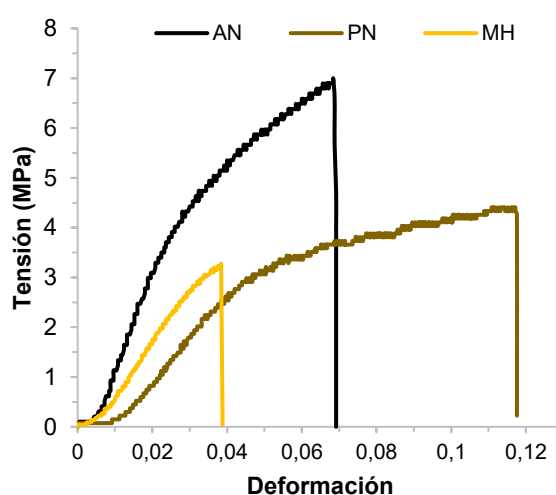


Figura 36. Curva Tensión vs Deformación correspondiente a las películas obtenidas bajo el tratamiento 15US-UT-15US. (MH) *M. hiemalis*; (PN) *P. nalgiovense*; (AN) *A. niger*.

La Tabla 10 muestra los valores de las pruebas mecánicas de diferentes materiales, tanto de base biológica como no sostenibles, encontrados en la literatura. Como se pudo observar, los valores de los parámetros obtenidos para los materiales desarrollados en este trabajo fueron comparables a los obtenidos para otras películas de base biológica plastificadas (Thomazine et al., 2005; Delgado et al., 2018b; Coma et al., 2019; Ramírez Tapias et al., 2020; Martínez et al., 2024).

Material	Acondicionamiento		Glicerol (% p/p)	TS (MPa)	YM (MPa)	EB (%)	Referencia
	HR	T (°C)					
<i>Schizophyllum commune</i> (MMP)	-	-	0	5	470	1.5	Appels et al., 2020
<i>Schizophyllum commune</i> (MMP)	-	-	32	1.8	3	29.6	Appels et al., 2020
<i>Ganoderma lucidum</i> (MMP)	-	23	0	1,1	12	14	Haneef et al., 2017
<i>Pleurotus ostreatus</i> (MMP)	-	23	0	0,7	28	4	Haneef et al., 2017
<i>Ganadera curtisii</i> (MMP)	50	25	0	0,84	128,8	1,55	César et al., 2021
<i>Aurantiporus</i> sp. (MMP)	50	25	0	0,91	112,5	1,45	César et al., 2021
<i>Paecilomyces variotii</i> (PM)	52	22	0	9	712	2	Martínez et al., 2024
<i>Paecilomyces variotii</i> (PM)	52	22	25	4	63	10	Martínez et al., 2024
Nanocelulosa de té de Kombucha	52	22	0	25	723	12	Ramírez Tapias et al., 2020
Nanocelulosa de té de Kombucha	52	22	20	9	90	18	Ramírez Tapias et al., 2020
Películas de nanocelulosa	50	23	0	110	3300	12	Thomazine et al., 2005
Película de celofán comercial	50	23	0	120	2820	20	Leppänen et al., 2020
Gelatina	58	22	25	21	6	37	Thomazine et al., 2005
Almidón de maíz		22	20	0,54	6	17	Nasir y Othman, 2021
Quitosano	57	25	25	20	-	40	Epure et al., 2011
Películas de biomasa de levadura	52	25	30	0,7	9	11	Delgado et al., 2018b
PLA comercial	-	-	0	59	1280	7	Farah et al., 2016
HDPE	-	-	-	16-31	0,98	20-50	Bastarrachea et al., 2011; Nwapa et al., 2020
LDPE	65	20-25	0	7-25	0,15-0,34	300-900	Bastarrachea et al., 2011
PET			0	157-177	3,5	70	Bastarrachea et al., 2011
PP	65	20-25	0	27-98	1,8	200-1000	Bastarrachea et al., 2011

Tabla 10. Valores de las propiedades mecánicas de distintos materiales biobasados y no sostenibles que se encuentran en la literatura (TS: Resistencia máxima a la tracción; MY: Módulo de Young; EB: Elongación a la rotura). (PLA) ácido poliláctico; (HDPE) Polietileno de alta densidad, (LDPE) Polietileno de baja densidad; (PET) Tereftalato de polietileno; (PP) Polipropileno (MMP) material de micelio puro; (PM) película de micelio.

En cuanto a las películas de micelio, los valores de módulo de Young y resistencia máxima a la tracción obtenidos en este trabajo fueron superiores a los informados por Haneef et al. (2017) para películas de los hongos *Ganoderma lucidum* y *Pleurotus ostreatus* cultivados sobre celulosa, a pesar de estar plastificados con glicerol. César et al. (2021) demostraron una amplia variación en el comportamiento mecánico entre películas de micelio obtenidas de seis especies diferentes de basidiomicetes. En dicha investigación, los valores de módulo de Young más altos obtenidos para películas de *Ganoderma curtisii* y *Aurantiporus* sp. fueron comparables a los obtenidos en el presente trabajo.

El presente estudio es el primer acercamiento al desarrollo de películas de micelio a partir de dispersiones formadoras de película de *M. hiemalis*, *A. niger* y *P. nalgiovense*. Si bien *M. hiemalis* no mostró la mayor resistencia, las otras características obtenidas como el color y la opacidad, además de su rápido crecimiento, alientan a seguir estudiando esta especie para desarrollar materiales de base biológica. Las propiedades mecánicas obtenidas animan a seguir trabajando con estas matrices, probando diferentes formulaciones, o combinándolas con otras fuentes de polímeros naturales para mejorar sus propiedades mecánicas.

3.5. Análisis termogravimétrico (TGA)

Los termogramas de las películas de micelio, obtenidas por diferentes tratamientos de ruptura, y de la biomasa sin tratar (control), mostraron perfiles de degradación múltiple con diferentes zonas de degradación como se muestra en la Figura 37. Se puede observar que las curvas TGA mostraron tres zonas de pérdida de masa que presentan particularidades según la cepa fúngica utilizada. La primera zona de degradación, hasta los 100 °C, se atribuyó a la evaporación del agua y a la degradación de moléculas de bajo peso molecular. En la segunda zona, de 100 °C a 200 °C, se observó principalmente la pérdida de glicerol (Jang et al., 2004) y la descomposición inicial de proteínas. Los controles de biomasa no presentaron el pico de glicerol en esta zona. La tercera zona, entre 200-500 °C, correspondió a la descomposición térmica completa de los componentes del micelio, como proteínas, quitina y glucanos (Jang et al., 2004; Erdogan

et al., 2017; Almazrouei et al., 2017; Delgado et al., 2018b). En esta zona hubo dos eventos diferentes para *P. nalgiovense* y *A. niger*, mientras que los perfiles de *M. hiemalis* presentaron al menos 4 picos. Los últimos picos de degradación, con máximos alrededor de 450 °C, podrían estar relacionados con la degradación de complejos entre quitina-glucano y quitina pura (Girometta et al., 2020). Estas diferencias probablemente se deban a la diferente composición de cada cepa fúngica como se discutió anteriormente. Los perfiles de varias etapas durante la degradación térmica coincidieron con los reportados para películas de base biológica realizadas con biomasa microbiana (Delgado et al., 2018b; César et al., 2021).

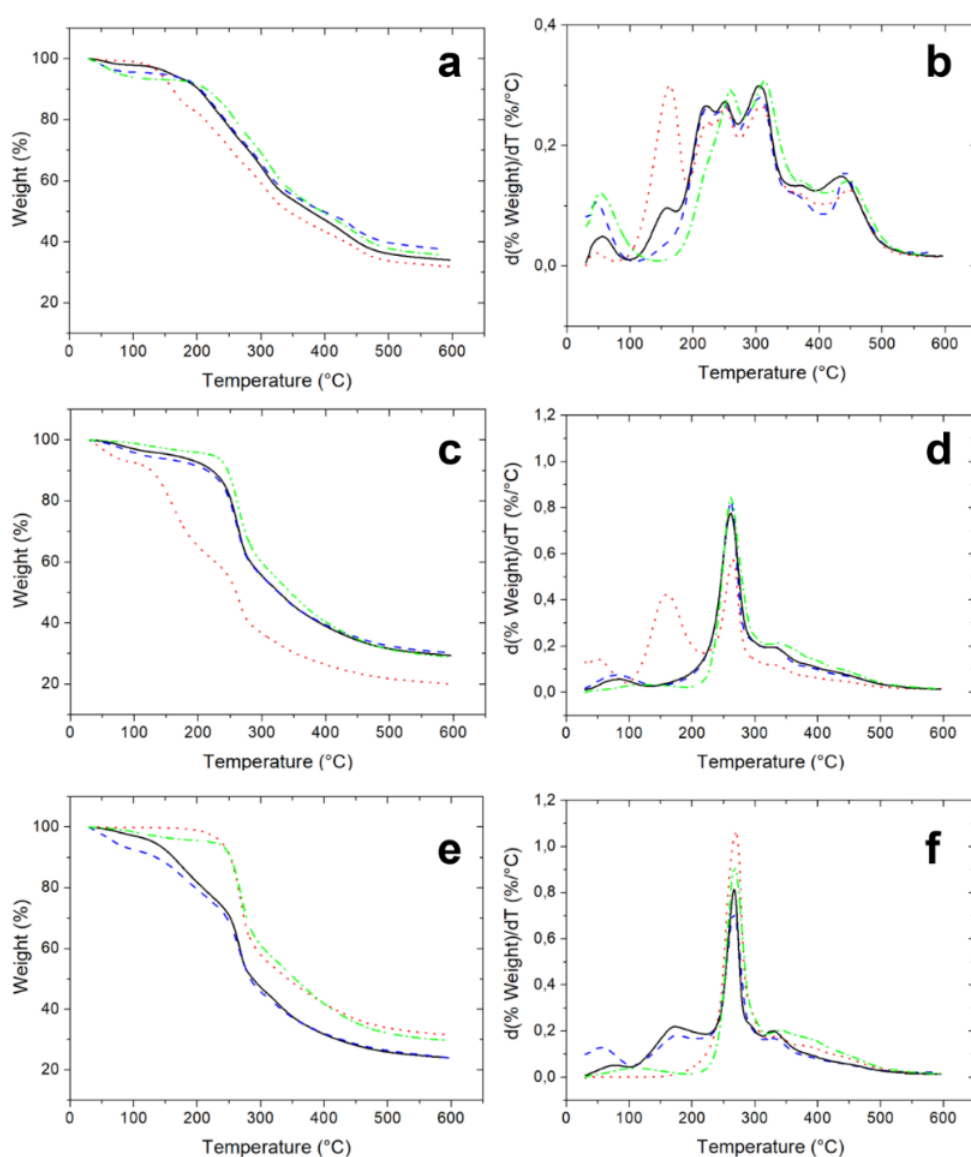


Figura 37. Termogramas de las películas fúngicas: peso (%) y primera derivada del peso (% °C⁻¹) con respecto a la temperatura (a, b) *M. hiemalis*; (c, d) *A. niger* (e, f) *P. nalgiovense* (control —•—; —15US- UT -15US; 15US; ---7,5US- UT- 7,5US)

ZONAS DE DEGRADACIÓN								
			2 ^{da} Zona		3 ^{ra} Zona			
	Tratamiento	T ₀ (°C)	Tmax 1 (°C)	Tmax 1 (°C)	Tmax 2 (°C)	Tmax 3 (°C)	Tmax 4 (°C)	Tmax 5 (°C)
MH	Control	221,2 ± 0,7			260,2 ± 0,1	314,0 ± 1,5	374,9 ± 3,3	445,1 ± 1,9
	7,5US- UT-7,5US	211,5 ± 7,4		222,7 ± 0,7	251,1 ± 0,4	301,3 ± 4,9	364,6 ± 0,6	447,1 ± 8,9
	15US	153,0 ± 8,5	162,4 ± 0,1	221,7 ± 0,5	251,1 ± 0,6	306,6 ± 0,3	365,1 ± 1,4	444,3 ± 2,1
AN	15US-UT-15US	169,9 ± 19,9	177,3 ± 15,3		254,3 ± 4,6	307,7 ± 5,5	371,1 ± 3,9	445,4 ± 14,9
	Control	243,4 ± 0,4	121,8 ± 2,9	262,1 ± 0,0	337,7 ± 0,8			
	7,5US-UT-7,5US	235,0 ± 1,8		261,3 ± 0,0	332,2 ± 0,4			
PN	15US	137,6 ± 10,7	156,6 ± 3,3	266,4 ± 3,5	333,4 ± 12,4			
	15US-UT-15US	226,4 ± 13,2		262,0 ± 1,2	331,5 ± 2,3			
	Control	242,9 ± 0,3	120,8 ± 0,1	267,4 ± 0,1	343,0 ± 3,5			
PN	7,5US-UT-7,5US	161,5 ± 16,3	176,8 ± 2,1	271,7 ± 5,6	335,3 ± 4,6			
	15US	200,5 ± 43,1		272,6 ± 4,4	335,7 ± 2,6			
	15US-UT-15US	154,6 ± 52,2	171,7 ± 1,1	267,1 ± 0,4	330,0 ± 0,8			

Tabla 11. Parámetros obtenidos de ensayos de degradación térmica de las películas de biomasa fúngica en el rango de 30-600 °C. (MH) *Mucor hiemalis*; (AN) *Aspergillus niger*; (PN) *Penicillium nalgiovense*.

En la Tabla 11 se muestran los parámetros obtenidos a partir de las curvas TGA como la temperatura de degradación inicial (T_0) y las temperaturas a la máxima tasa de degradación (T_{max}) correspondientes a la 2ª y 3ª zona de degradación. Las películas de *A. niger* y *M. hiemalis* obtenidas con un tratamiento UT intermedio con 15 minutos de US mostraron una T_0 promedio más alta, lo que indica un aumento de la resistencia térmica de esas películas. Esto podría explicarse por una distribución más homogénea de las partículas que confieren una mejor disposición de la matriz, como se discutió anteriormente en este Capítulo I

3.6. Permeabilidad experimental al vapor de agua

La Tabla 12 reúne los resultados del ensayo de permeabilidad experimental para las películas obtenidas. Los valores de permeabilidad al vapor de agua (P_w^{exp}) obtenidos para las películas elaboradas a partir de micelio de *Aspergillus niger* y *Penicillium nalgiovense* se ubicaron en el orden de $10^{-10} \text{ g}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$, con variaciones entre 4,0 y $4,7 \times 10^{-10} \text{ g}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$, mientras que las películas derivadas de *Mucor hiemalis* presentaron valores más elevados ($\approx 20 \times 10^{-10} \text{ g}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$), aunque no comparables directamente debido a su mayor espesor.

	Tratamiento	Espesor (10^{-5} m)	J_w ($10^{-3} \text{ g}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$)	P_w^{exp} ($10^{-10} \text{ g}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$)
MH	15US	$20,5 \pm 1,1$	$21,0 \pm 0,2$	$20,4 \pm 0,2$
	15US-UT-15US	$20,8 \pm 1,6$	$21,0 \pm 0,4$	$20,7 \pm 0,4$
AN	15US	$11,1 \pm 0,7$	$9,0 \pm 0,1$	$4,7 \pm 0,1$
	15US-UT-15US	$11,3 \pm 0,9$	$8,6 \pm 0,1$	$4,6 \pm 0,1$
PN	15US	$11,2 \pm 0,6$	$7,5 \pm 0,1$	$4,0 \pm 0,1$
	15US-UT-15US	$11,6 \pm 0,7$	$8,0 \pm 0,1$	$4,4 \pm 0,1$

Tabla 12. Valores del flujo de vapor de agua (J_w), y permeabilidad al vapor de agua experimental (P_w^{exp}). (MH) *Mucor hiemalis*; (AN) *Aspergillus niger*; (PN) *Penicillium nalgiovense*. (media $\pm$ DS)

En una película polimérica ideal, la permeabilidad al vapor de agua es independiente del espesor de la película (Bertuzzi et al., 2002). Sin embargo, se ha demostrado que, para las películas poliméricas hidrofílicas, la permeabilidad al vapor de agua aumenta cuando se incrementa el espesor de la película (McHugh et al., 1993, Gennadios et al., 1994; Park y Chinnan, 1995; Delgado et al., 2018a). Es por esto por lo que no se puede

establecer una comparación entre la permeabilidad de las películas de *P. nalgiovense* y *A. niger* con respecto a las de *M. hiemalis* dado que estas difieren considerablemente en su espesor. La razón de esta desviación está relacionada con la naturaleza hidrofílica de la matriz polimérica, pero no existe una respuesta completa que explique el fenómeno a nivel microscópico (Delgado et al., 2018a). Se han reportado diferentes explicaciones para el efecto del espesor sobre la permeabilidad al vapor de agua. McHugh et al. (1993) reportaron que a medida que el espesor de la película aumenta, se incrementa la resistencia a la transferencia de masa a través de ella, en consecuencia, la presión parcial de vapor de agua de equilibrio en la superficie inferior de la película se incrementa, dando como resultado valores más altos de permeabilidad. Otros autores atribuyen el efecto del espesor a cambios en la estructura de la película ocasionados por el hinchamiento que provoca el agua en la matriz polimérica de la película (Banker, 1966). Dicho hinchamiento ocurre en la cara de la película en contacto con la atmósfera de mayor humedad y afecta solo a una parte delgada de la película. La proporción de dicho hinchamiento podría ser menor a medida que la película se vuelve más gruesa. Por lo tanto, en películas más delgadas donde la proporción de hinchamiento se vuelve notable, el movimiento del agua podría retrasarse disminuyendo la difusión y la permeabilidad (Delgado et al., 2018a).

De manera general, no se observaron grandes diferencias en los valores de permeabilidad al vapor de agua entre las películas obtenidas a partir de dispersiones provenientes de diferentes tratamientos de ruptura. Las permeabilidades de las películas de *P. nalgiovense* y *A. niger* resultaron similares entre sí y en el orden de $10^{-10} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$. Estos valores fueron comparables con las permeabilidades de otras películas elaboradas a base de biopolímeros de similar espesor (Delgado et al., 2018a; Martínez et al., 2024).

3.7. Microscopía de fuerza atómica (AFM)

La microscopía de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés) permitió analizar la topografía superficial de las películas fúngicas de *A. niger*, *M. hiemalis* y *P. nalgiovense*, obtenidas mediante el protocolo de ruptura celular 15US-UT-15US. Las diferencias

morfológicas entre los tres materiales se observan en la Figuras 38, que reúnen las imágenes de altura, fase y amplitud obtenidas mediante microscopía AFM.

En el caso de *A. niger*, las micrografías de altura evidenciaron una superficie relativamente homogénea. La señal de fase sugiere una distribución más uniforme de las fases amorfas y semi cristalinas, posiblemente asociadas a la composición de la pared celular (quitina, glucanos y proteínas asociadas). Esta homogeneidad superficial puede estar relacionada con una mejor cohesión interna de la película y podría favorecer propiedades mecánicas más estables. Por el contrario, las películas de *M. hiemalis* presentaron una topografía más rugosa, con elevaciones y depresiones distribuidas heterogéneamente. La imagen de fase revela mayor contraste, lo que indica la presencia de regiones con distinta composición. Finalmente, las películas de *P. nalgiovense* mostraron una morfología intermedia: la topografía evidenció cierta heterogeneidad, pero menos marcada que en las películas de *M. hiemalis*. El contraste en la señal de fase sugiere la presencia de micro dominios bien definidos, lo que podría asociarse a la redistribución parcial de los polímeros de la pared celular.

Estas diferencias se corresponden con las diferencias observadas en su composición y en los resultados de sus pruebas mecánicas. El predominio proteico y la escasez de polisacáridos estructurales (glucanos) de *M. hiemalis* podría influir en la formación de una red continua. Las proteínas tienden a formar agregados irregulares y menos cristalinos, generando películas con mayor rugosidad y heterogeneidad mecánica. Esto explicaría la superficie accidentada observada en las micrografías AFM y puede asociarse a la mayor fragilidad observada en las propiedades mecánicas de las películas de *M. hiemalis*.

En términos generales, las microscopías AFM confirman que, aun bajo un mismo procesamiento, la estructura microscópica y la rugosidad superficial dependen fuertemente de la especie fúngica. Estos hallazgos resaltan la importancia de la selección del microorganismo para diseñar películas con propiedades específicas, ya sea priorizando uniformidad (*A. niger*), rugosidad y texturización (*M. hiemalis*) o un equilibrio entre ambas (*P. nalgiovense*).

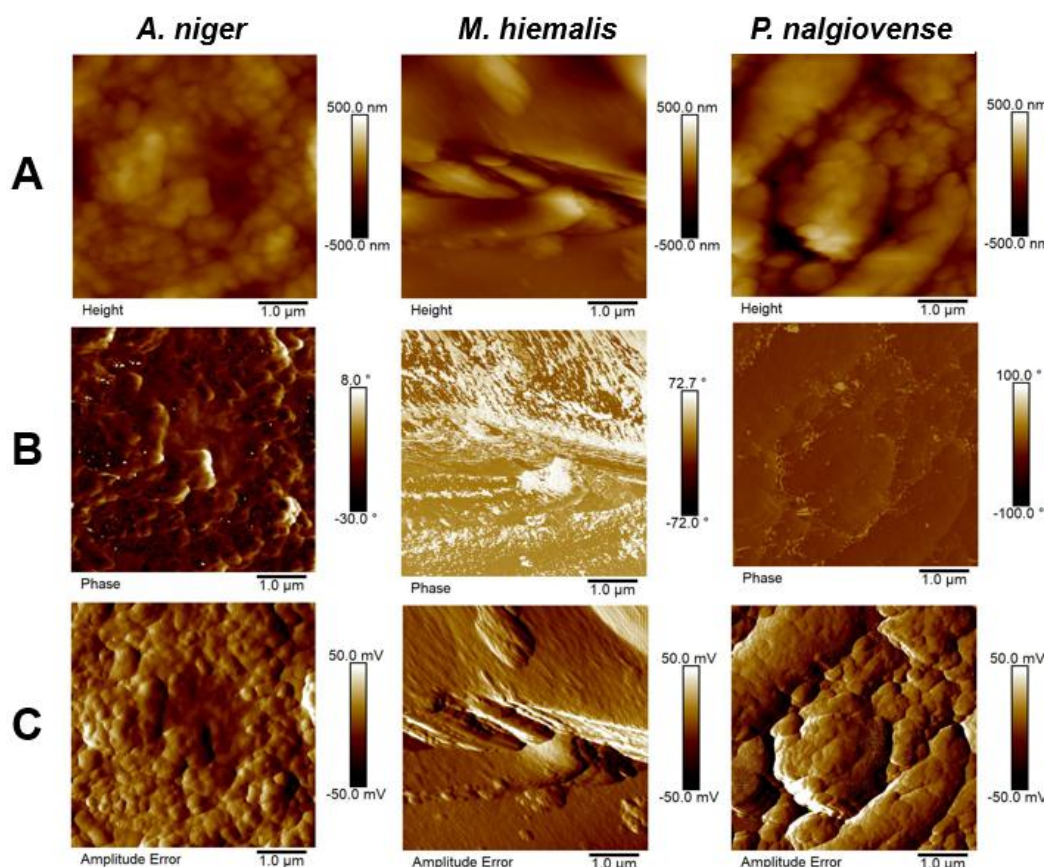


Figura 38. Imágenes AFM de altura (A), fase (B) y de amplitud (C) de películas de *A. niger*, *M. hiemalis* y *P. nalgiovense* obtenidas a partir de dispersiones 15US-UT-15US

4. REFERENCIAS

- Almazrouei M., Samad T.E., Janajreh I. (2017) Thermogravimetric Kinetics and High Fidelity Analysis of Crude Glycerol. Energy Procedia, 142: 1699–1705. <https://doi:10.1016/j.egypro.2017.12.552>
- Amobonye A., Lalung j., Kumar Awasthi M., Pillai S. (2023) Fungal mycelium as leather alternative: A sustainable biogenic material for the fashion industry, Sustainable Materials and Technologies, Volume 38, e00724,ISSN 2214-9937, <https://doi.org/10.1016/j.susmat.2023.e00724>
- Appels F.V.W., Van den Brandhof J.G., Dijksterhuis. J, de Kort G.W., Wösten H.A.B. (2020) Fungal mycelium classified in different material families based on glycerol treatment. Commun Biol 3:334. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-1064-4>

- ASTM D882-97 (1997) Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. En: Annual book of ASTM standards. Philadelphia: American Society for Testing and Materials.
- ASTM-E96 (2016) Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials. [https://doi: 10.1520/E0096_E0096M-16](https://doi.org/10.1520/E0096_E0096M-16).
- Banker, G.S. (1966) Film coating theory and practice. Journal of pharmaceutical sciences, 55 1, 81-9.
- Barraza-Garza, G, de la Rosa, L., Martínez-Martínez, A., Castillo-Michel. H., Cotte, M., Alvarez-Parrilla, E. (2013) La microespectroscopía de infrarrojo con transformada de fourier (ftirm) en el estudio de sistemas biológicos. Rev. latinoam. quím vol.41 no.3 Naucalpan de Juárez
- Bastarrachea L, Dhawan S., Sablani S.S. (2011) Engineering properties of polymeric-based antimicrobial films for food packaging: a review. Food Engineering Reviews, 3(2): 79-93. <https://doi.org/10.1007/s12393-011-9034-8>
- Bertuzzi, M.A., Armada, M., Gottifredi, J.C., Aparicio, A. R. y Jimenez, P. (2002). Estudio de la permeabilidad al vapor de agua de films comestibles para recubrir alimentos. Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología NOA 2002.
- Bracker Jr C.E., y Butler E.E. (1963) The ultrastructure and development of septa in hyphae of *Rhizoctonia solani*. Mycologia, 55(1):35-58. <http://doi.org/10.2307/3756380>
- Bustillos J., Loganathan A., Agrawal R., Gonzalez B.A, Perez M.G., Ramaswamy S., Boesl B., Agarwal A. (2020) Uncovering the mechanical, thermal, and chemical characteristics of biodegradable mushroom leather with intrinsic antifungal and antibacterial properties. ACS Appl Bio Mater 3:3145–3156. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c00164>
- C.I.E. (1986). Colorimetrie, 2nd ed. Publication C.I.E. Nº15, 2. Viena: Central Bureau of the Comisión Internationale de L'Eclairage.
- Callister J. W. D. (1995) Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales. Capítulo 6 Editorial Reverté, Barcelona, España.
- Calvo, C. y Durán, L. (1997) Propiedades físicas II: Ópticas y color. Temas en Tecnología de Alimentos. Editado por J. M. Aguilera. Instituto Politécnico Nacional, México.

- Canada, J. (2001) Caracterización sensorial y físicoquímica del Queso Serpa. Tesis presentada en la Universidad de Extremadura. Facultad de Veterinaria, para optar por el grado de Doctorado en Tecnología de Alimentos.
- Casassa, F. y Sari, S. (2006) Aplicación del Sistema Cie-Lab a los vinos tintos. Correlación con algunos parámetros tradicionales. Revista Enología, 5:56-62
- César, E., Canche-Escamilla, G., Montoya, L., Ramos, A., Duarte-Aranda, S., Bandala V., (2021) Characterization and Physical Properties of Mycelium Films Obtained from Wild Fungi: Natural Materials for Potential Biotechnological Applications. J. Polym. Environ. 29, 4098–4105. <https://doi.org/10.1007/s10924-021-02178-3>.
- Chacón-Villalobos, A. y Pineda-Castro, M.L. (2009) Características químicas, físicas y sensoriales de un queso de cabra adaptado del tipo “Crottin de Chavignol”. Agronomía mesoamericana 20(2):297-309
- Coma M.E., Peltzer M.A., Delgado J.F., Salvay A.G. (2019) Water kefir grains as an innovative source of materials: Study of plasticiser content on film properties. Eur Polym J 120, 109234. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.109234>
- De Moraes J.O., Scheibe A.S., Sereno A, Laurindo J.B. (2013) Scale-up of the production of cassava starch based films using tape-casting. J Food Eng 119(4): 800–808. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.07.009>.
- Delgado J.F., Peltzer M.A., Wagner J.R., y Salvay A.G. (2018a) Hydration and water vapour transport properties in yeast biomass based films: a study of plasticizer content and thickness effects. European Polymer Journal, 99, 9-17.
- Delgado J.F., Salvay A., de la Osa O., Wagner J., Peltzer M.A. (2021) Impact of the film-forming dispersion pH on the properties of yeast biomass films. J Sci Food Agric 101: 5636-5644. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11216>.
- Delgado, J. F., Peltzer, M. A., Salvay, A.G., de la Osa, O., Wagner, J., (2018b) Characterization of thermal, mechanical and hydration properties of novel films based on *Saccharomyces cerevisiae* biomass. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 48, 240-247. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.06.017>.
- Dzurendova S., Zimmermann B., Kohler A., Tafintseva V., Slany O., Certik M. Shapaval V. (2020) Microcultivation and FTIR spectroscopy-based screening revealed a nutrient-induced coproduction of high-value metabolites in oleaginous

Mucoromycota fungi. PLoS ONE 15(6):e0234870.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234870>

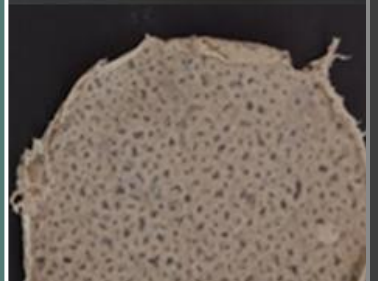
- Epure V., Griffon M., Pollet E., Avérous L. (2011) Structure and properties of glycerol-plasticized chitosan obtained by mechanical kneading. *Carbohydrate Polymers*, 83(2): 947-952. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.09.003>.
- Erdogan S., Kaya M., Akata I. (2017) Chitin extraction and chitosan production from cell wall of two mushroom species (*Lactarius vellereus* and *Phyllophora ribis*) AIP Conference Proceedings 1809: 020012. <https://doi.org/10.1063/1.4975427>
- Farah S., Anderson D.G., Langer R. (2016) Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 107:367-392. ISSN 0169-409X. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.012>.
- García, A, y Kikut Cruz, K (2020) Microscopía de fuerza atómica como herramienta en la investigación de asfaltos. *Infraestructura Vial*, 22(40), 20-27. <https://dx.doi.org/10.15517/iv.v22i40.42057>
- Gennadios A., Weller C.L., Gooding C.H. (1994) Measurement errors in water vapor permeability of highly permeable, hydrophilic edible films. *Journal of Food Engineering*, 21, 395-409.
- Gilabert, E. (1992) Medida del color. Servicio de publicaciones. Valencia Servicio de Publicaciones, Universidad Politécnica de Valencia, ISBN: 84-9705-174-2
- Girometta C., Dondi D., Baiguera R.M., Bracco F., Branciforti D.S., Buratti S., ... Savino, E. (2020). Characterization of mycelia from wood-decay species by TGA and IR spectroscopy. *Cellulose*, 27(11), 6133–6148. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03208-4>
- Haneef M., Ceseracciu L., Canale C., Bayer IS, Heredia-Guerrero J.A., Athanassiou A. (2017) Advanced materials from fungal mycelium: fabrication and tuning of physical properties. *Sci Rep* 24 (7) 41292. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.10.006>.
- Jang M.K., Kong B.G., Jeong Y.I., Lee C.H., Nah, J.W. (2004). Physicochemical characterization of α -chitin, β -chitin, and γ -chitin separated from natural resources. *J Pol Sci Part A: Polymer Chemistry* 42(14):3423–3432. <https://doi.org/10.1002/pola.20176>.

- Kachel-Jakubowska M., Matwijczuk A., Gagoś M. (2017) Analysis of the physicochemical properties of post-manufacturing waste derived from production of methyl esters from rapeseed oil. *Int Agrophysics* 31:1-8. <http://doi.org/10.1515/intag-2016-0042>.
- Lecellier A., Gaydou V., Mounier J., Hermet A., Castrec L., Barbier G., Ablain W., Manfait M., Toubas D., Sockalingum G.D. (2015) Implementation of an FTIR spectral library of 486 filamentous fungi strains for rapid identification of molds. *Food Microbiol* 45(Pt A):126-34. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2014.01.002>.
- Leppänen I., Vikman M., Harlin A. (2020) Enzymatic Degradation and Pilot-Scale Composting of Cellulose-Based Films with Different Chemical Structures. *J Polym Environ* 28:458–470. <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01621-w>
- Lew R.R., (2019) Biomechanics of hyphal growth, in: D. Hoffmeister, M. Gressler (Eds.), *Biology of the Fungal Cell*, Springer, Cham, pp. 83–94, https://doi.org/10.1007/978-3-030-05448-9_5.
- Lopez-Díaz A.S, Ríos-Corripio M.A, S., Ramírez-Corona N., López-Malo A., Palou E. (2017) Effect of short wave ultraviolet radiation on selected properties of edible films formulated with pomegranate juice and chitosan. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*.17:63-73 <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2018v17n1/Lopez>
- Lorenz-Fonfria V.A. (2020) Infrared Difference Spectroscopy of Proteins: From Bands to Bonds. *Chem. Rev.* 120, 7: 3466–35760. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00449>
- Martínez, E.A., Salvay, A.G., Sanchez-Díaz, M.R., Ludemann V., Peltzer M.A (2024) Functional characterization of biodegradable films obtained from whole *Paecilomyces variotii* biomass. *Int Microbiol* 27, 1573–1585 (2024). <https://doi.org/10.1007/s10123-024-00501-1>
- McHugh T. H, Avena-Bustillos R., Krochta J. M. (1993) Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. *J Food Sci* 58(4):899-903.
- Mills, R. (2018) Fundamentos del análisis FTIR. FOSS®. <https://www.fossanalytics.com/es-ar/news-articles/technologies/a-short-intro-to-ftir-analysis>

- Nasir N.N., y Othman S.A. (2021) The Physical and Mechanical Properties of Corn-based Bioplastic Films with Different Starch and Glycerol Content. *Journal of Physical Science*, 32(3). <https://doi.org/10.21315/jps2021.32.3.7>.
- Nwapa C., Okunwaye O.J., Okonkwo C. L., Chimezie O.W. (2020) Mechanical Properties of High Density Polyethylene and Linear Low Density Polyethylene Blend. *SSRG International Journal of Polymer and Textile Engineering* vol 7(1):23-28, <https://doi.org/10.14445/23942592/IJPTE-V7I1P103>.
- Park H.J., y Chinnan M.S. (1995) Gas and water vapor barrier properties of edible films from protein and cellulosic materials, *J. Food Eng.* 25 (1995) 497–507.
- Park, Sl. y Zhao, Y. (2004) Incorporation of a High Concentration of Mineral or Vitamin into Chitosan-Based Films. *J. Agric. Food Chem.* 52, 1933–1939.
- Ramírez Tapias Y.A., Di Monte M.V., Peltzer M.A., Salvay A.G. (2022) Bacterial cellulose films production by Kombucha symbiotic community cultured on different herbal infusions. *Food Chem* 372:131346. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131346>
- Ramírez Tapias Y.A., Peltzer M.A., Delgado J.F., Salvay A.G. (2020) Kombucha Tea By-product as Source of Novel Materials: Formulation and Characterization of Films. *Food and Bioprocess Technology*. <http://doi.org/10.1007/s11947-020-02471-4>.
- Ramos, O. L., Fernandes, J. C., Silva, S. I., Pintado, M. E. y Malcata, X. (2012) Edible Films and Coatings from Whey Proteins: A Review on Formulation, and on Mechanical and Bioactive Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52, 533-552. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.500528>
- Rodríguez, E., y Villegas, E. (2012) Caracterización de polímeros aplicando el método termogravimétrico. *Métodos y Materiales*. Vol. 2. Noviembre. ISSN-e 2215-4558, ISSN 2215-342X, págs. 25-32
- Saif F.A., Yaseen S.A., Alameen AS, Mane SB, Undre PB (2020) Identification and Characterization of *Aspergillus* Species of fruit rot fungi using Microscopy, FT-IR, Raman and UV-Vis spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 119010. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119010>
- Seiler S., y Heilig Y. (2019) Septum formation and cytokinesis in ascomycete fungi, In: Hoffmeister D, Gressler M (Eds.) *Biology of the Fungy Cell*, 3rd Edition. The Mycota VIII. Springer Nature Switzerland AG. ISBN: 978-3-030-05448-9

- Šimonovicová A., Takáčová A., Šimkovic I., Nosalj S. (2021) Experimental Treatment of Hazardous Ash Waste by Microbial Consortium *Aspergillus niger* and *Chlorella* sp.: Decrease of the Ni Content and Identification of Adsorption Sites by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. Front Microbiol 12:792987. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2021.792987>
- Skoog, A. D., Holler F. J., y Crouch R. S. (2002) Principios de Análisis Instrumental. Madrid España, Mc Graw Hill, 893-909.
- Thomazine M., Carvalho R.A., Sobral P.J.A. (2005) Physical properties of gelatin films plasticized by blends of glycerol and sorbitol. Journal of Food Science, 70(3): 172-176, <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07132.x>.

CAPÍTULO III: OBTENCIÓN DE MATERIALES DE MICELIO PURO



1. OBJETIVO

El objetivo de este capítulo fue evaluar la factibilidad de obtener materiales a partir de micelio puro sin ruptura celular de los hongos filamentosos *Aspergillus niger*, *Monascus ruber* y *Penicillium nalgiovense*. Para ello se propuso:

- Reactivar y confirmar la identidad de la cepa *Monascus ruber*.
- Caracterizar en el color y las propiedades mecánicas a los materiales obtenidos bajo distintas condiciones de cultivo.
- Investigar si los pigmentos retenidos en el micelio de *Monascus ruber* confieren actividad antioxidante y/o antimicrobiana a los materiales obtenidos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Obtención de los materiales de micelio puro (MMP)

2.1.1 Confirmación de identidad de las cepas de trabajo

Se trabajó con las cepas de *Aspergillus niger* (AN) y *Penicillium nalgiovense* (PN) descritas en el Capítulo I y se incorporó una cepa de *Monascus ruber* (MR) aislada en la Provincia de Santa Fe disponible en el cepario del laboratorio de Micología de Alimentos de la Universidad Nacional de Quilmes (ID: MNR1). Los microorganismos se reactivaron y se realizó la confirmación de identidad de la cepa de *M. ruber* de acuerdo con lo descripto en el ítem 2.1 (Capítulo I).

2.1.2. Preparación del inóculo

Los inóculos de *Aspergillus niger* (AN) y *Penicillium nalgiovense* se realizaron de acuerdo con el ítem 2.2.1 (Capítulo I). Debido a que *Monascus ruber* (MR) es un hongo de crecimiento y esporulación lenta la suspensión de conidios se preparó a partir de las colonias crecidas en agar PDA por 14 días a 25 °C. Se preparó una suspensión de conidios

con una concentración aproximada de 10^8 conidios/mL para *A. niger* y *P. nalgiovense*, y de 10^6 conidios/mL para *M. ruber* para ser utilizadas como inóculos.

2.1.3. Cultivo sumergido

Considerando que las condiciones de cultivo influyen sobre la producción de biomasa y metabolitos de hongos filamentosos, se evaluó la producción de materiales de micelio puro (MMP) de *Aspergillus niger* (AN) y *Monascus ruber* (MR) bajo diferentes condiciones de cultivo sumergido: agitado (A), estático (E) y combinado (AE). Los cultivos se realizaron en Erlenmeyers de 500 mL con 250 mL de medio Sabouraud glucosado comercial (Britania) estéril, e inoculados en una concentración final aproximada de 10^6 conidios/ml para *A. niger* y 10^4 conidios/ml para *M. ruber*. La condición A consistió en una incubación bajo agitación a 135 rpm, la E en incubación estática, mientras que en la condición AE se llevó a cabo una agitación por 24 h, para estimular la colonización del medio, y luego se completó el tiempo de incubación en estático sin agitación. Se incubaron por un total de 7 días a 37 °C para *A. niger* y 14 días a 25 °C para *M. ruber*. Luego del tiempo de incubación, los cultivos se esterilizaron en autoclave (121 °C, 15 min) y los micelios (MMP) se separaron mediante extracción directa, cuando el crecimiento fue como micelio flotante, y por filtración al vacío utilizando papel de filtro Whatman N°1, cuando fue en forma de pellets.

Se determinó la biomasa obtenida y se calculó el extracto seco por secado en estufa a 105 °C hasta peso constante (AOAC 925.10) para determinar el rendimiento en base seca. Se registró el pH final del medio, antes y después de la incubación, mediante pH-metro TPA-V con electrodo ALPHA PY41. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

2.1.4. Plastificación y prensado

Los MMP de las dos condiciones más favorables en cuanto a apariencia y rendimiento de biomasa para cada hongo se trataron sumergiendo los micelios en glicerol 25 % y 50 % p/p por 3, 12 y 24 h. Los MMP se colocaron en recipientes con las distintas concentraciones de glicerol y se fueron retirando a los tiempos indicados. Al sacar las muestras se les quitó el exceso de glicerol con papel absorbente y se las reservó en

bolsas herméticas para ponerlas a prensar todas juntas. Se reservaron micelios de cada condición sin plastificar como control. Los micelios se prensaron por compresión con una presión de $6,4 \text{ g/cm}^2$ por 72 h entre hojas de papel antiadherente para evitar que se peguen a la prensa. Luego del prensado los MMP se dejaron orear a temperatura y humedad ambiente, se los observó por 100 días y se evaluó la condición de plastificación más conveniente. La Figura 39 muestra el esquema de obtención de los MMP. En ensayos siguientes se procedió a realizar la producción en frascos de 13,9 cm de diámetros.

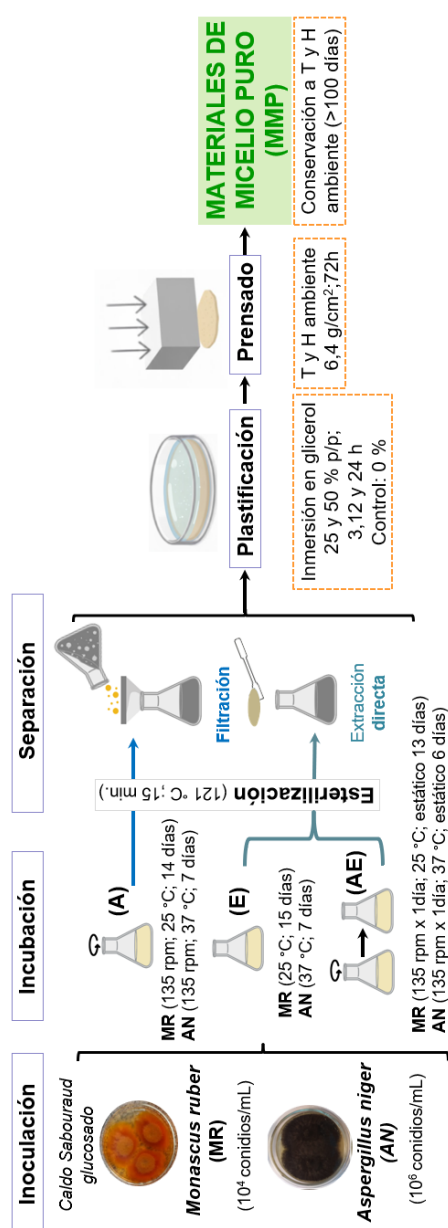


Figura 39. Esquema de obtención de los materiales de micelio puro (MMP).

2.2. Caracterización de los MMP

2.2.1. Determinación del color

El color de los micelios de *A. niger* (A y AE), *M. ruber* (A y E) y *P. nalgiovense* (AE), obtenidos mediante el protocolo en 25 % glicerol por 3 h, se determinó mediante un colorímetro digital CR-400 (Konica Minolta, Osaka, Japón) de acuerdo con lo descripto en el ítem 2.1.2 (Capítulo II). Las mediciones se realizaron en 5 puntos aleatorios en ambas caras de los micelios (anverso y reverso). Adicionalmente, los valores promedio de las coordenadas CIELAB obtenidos se convirtieron en códigos de color hexadecimal mediante Photoshop CS6 y se compararon con los estándares de color más similares en las paletas de color del sistema RAL classic, que define colores para pinturas, plásticos y recubrimientos.

2.2.2. Estudio de las propiedades mecánicas: Ensayo de tracción uniaxial

Para los ensayos de propiedades mecánicas se procedió a realizar la producción de *A. niger* y *M. ruber* en frascos de 13,9 cm de diámetros con 350 mL de caldo Sabouraud glucosado comercial y se incubó en condiciones AE y E, respectivamente, según el ítem 2.1.3 (Capítulo III). Adicionalmente, se evaluaron las propiedades de MMP de *P. nalgiovense* cultivados bajo condiciones AE por 7 días a 25 °C. Los MMP obtenidos se plastificaron por inmersión en 25 y 50 % p/p de glicerol por 3 horas y se prensaron por 72 horas (6,4 g/cm²).

Se determinaron las propiedades mecánicas (resistencia máxima a la tracción (TS), módulo de Young (YM) y elongación a rotura (EB)) de los MMP tratados con 0, 25 y 50 % glicerol mediante un ensayo de tracción uniaxial según lo descripto en el ítem 2.1.5 (Capítulo II). Los resultados obtenidos fueron evaluados mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) y aplicando el test de Tukey para la comparación de las medias, utilizando el software Infostat versión 2020e (Grupo Infostat, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Se utilizó un nivel de significancia de $\alpha=0,05$.

2.2.3. Determinación de la capacidad antioxidante de los micelios de *M. ruber*

Los radicales libres son moléculas o fragmentos de moléculas caracterizadas por tener uno o más electrones desapareados en su orbital externo, condición que los torna altamente reactivos. La degradación oxidativa es un proceso en el cual estos radicales, debido a su alta inestabilidad, sustraen electrones de otras moléculas para alcanzar estabilidad. Este mecanismo genera daños en macromoléculas biológicas como lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, provocando alteraciones en los procesos celulares (funcionalidad de las membranas, producción de enzimas, respiración celular, inducción génica, etc.) (Elejalde Guerra, 2001; Guija-Poma et al., 2015). La actividad antioxidante es la capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa (por ejemplo, la peroxidación lipídica), de tal manera que un antioxidante actúa, principalmente, gracias a su capacidad para reaccionar con radicales libres (Londoño Londoño, 2012). Se han descrito diversas técnicas para evaluar la capacidad antioxidante como por ejemplo aquellas que utilizan el radical libre DPPH (Brand-Williams et al., 1995) y al radical ABTS (Re et al., 1999).

Los hongos del género *Monascus spp.* producen pigmentos naturales a los que se ha atribuido actividad antioxidante (Pineda Insuasti et al., 2016; Husáková y Patáková, 2025) es por ello que se evaluó la actividad antioxidante intrínseca de sus micelios.

2.2.3.a. Método ABTS

El método ABTS es uno de los métodos espectrofotométricos que ha sido utilizado para medir la actividad antioxidante de soluciones o sustancias puras y mezclas acuosas. Este método se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno o de electrones (Re et al., 1999). El radical catiónico $\text{ABTS}^{\bullet+}$ es un cromóforo verde-azulado, que absorbe a una longitud de onda de 734 nm, y se genera por una reacción de oxidación del ABTS (2,2'-azinobis- (3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio)) con persulfato de potasio (Mesa et al., 2011). Ante presencia de antioxidantes los cationes radicales $\text{ABTS}^{\bullet+}$ preformados pueden ser neutralizados generando una disminución en la coloración de la solución y por lo tanto una reducción en su absorbancia (Huet Breña, 2017) (Figura 40). El resultado final del ensayo dependerá de la concentración del antioxidante y tiempo de contacto

entre el mismo y el catión radical (Re et al., 1999). Uno de los parámetros utilizados para medir la capacidad antioxidante es el porcentaje de inhibición radicalaria (% RSA), el cual relaciona la absorbancia de una solución de ABTS^{•+} puro (blanco) con una solución de ABTS^{•+} con la muestra. El valor del % RSA se obtiene a partir de la Ecuación 12.

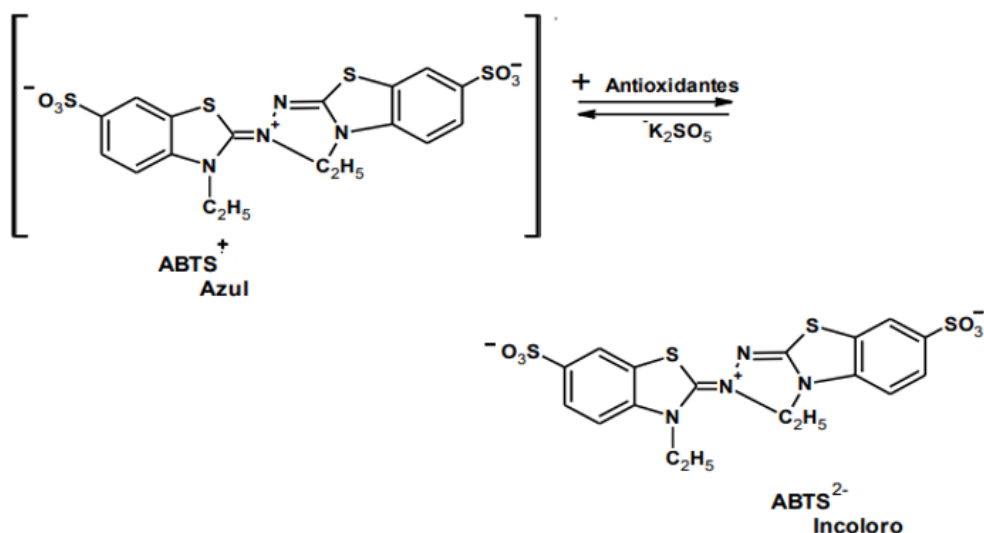


Figura 40. Estructura del ABTS•+ antes y después de la reacción con el antioxidante (adaptado de Zuleta et al., 2009).

$$\%RSA = \left(\frac{Abs_{blanco} - Abs_{muestra}}{Abs_{blanco}} \right) \times 100 \quad (\text{Ecuación 12})$$

La actividad antioxidante de los micelios de *M. ruber* se determinó por contacto directo con ABTS^{•+}. Se preparó una solución (solución A) con ABTS (7 mM), persulfato de potasio (2.45 mM) y agua Mili Q, en un frasco de vidrio color caramelo y cubierto con papel aluminio, para proteger la solución de la luz y evitar reacciones de degradación secundarias. Dicha solución se dejó reaccionar en oscuridad durante al menos 16 horas a temperatura ambiente (22 °C) para garantizar la formación del radical ABTS^{•+}. El día del ensayo, se preparó la solución de trabajo (solución B) diluyendo 1 mL de la solución A en 80 mL de agua Milli-Q. La absorbancia se ajustó entre 0,680 y 0,720 a 734 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (Shanghai 9000, Laboratorio Instrumental, UNQ).

Para llevar a cabo el análisis, se colocaron 10 ± 1 mg de micelio de *M. ruber* de cada condición de cultivo (A, E y AE) en tubos eppendorf, se adicionó 1 mL de solución B, se

dejó reaccionar a temperatura ambiente en oscuridad por 15 y 30 minutos y se registró la absorbancia a 734 nm. Como blanco se utilizó 1 mL de solución B sin la adición de la muestra utilizando los mismos tiempos de reposo estudiados para los micelios. Este procedimiento se realizó por triplicado. Los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición radicalaria (% RSA) relativo a cada tiempo (Ecuación 12).

2.2.3.b. Método DPPH

Para obtener una visión más completa de la actividad antioxidante de un material es necesario evaluarla mediante diferentes métodos, ya que cada uno de puede detectar diferentes mecanismos de acción antioxidante. Es por eso que además del método ABTS se evaluó la capacidad antioxidante por el método DPPH. Esta técnica utiliza al radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo conocido por las siglas DPPH (Brand-Williams et al., 1995). Este radical libre es susceptible de reaccionar con compuestos antioxidantes a través de un proceso caracterizado por la cesión de un átomo de hidrógeno proporcionado por el agente antioxidante (Guija-Poma et al., 2015). El radical DPPH posee un electrón desapareado y es de color morado, decolorándose hacia amarillo pálido por la reacción de la presencia de una sustancia antioxidante (Figura 41). La reacción, entre el DPPH y un antioxidante puede seguirse midiendo la disminución de la absorbancia de la mezcla a 517 nm en función del tiempo (Castañeda Castañeda et al., 2008).

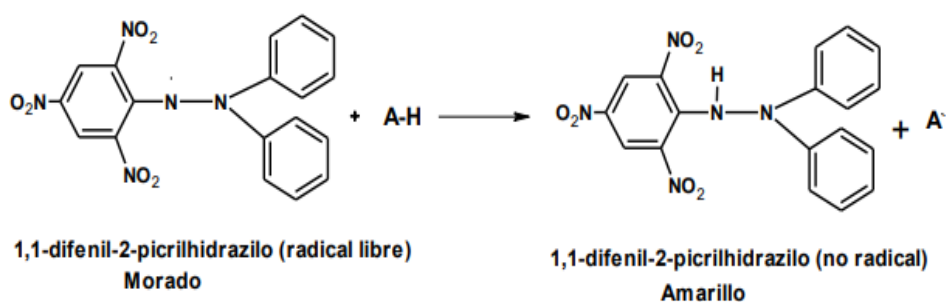


Figura 41. Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante (Alam et al., 2012)

La estimación de la actividad antioxidante de los micelios de *M. ruber* se realizó por contacto directo con DPPH. Se preparó DPPH en etanol analítico en una concentración

de 1 mM y se dejó reaccionar 30 minutos en oscuridad (solución A). Para llevar a cabo el análisis, se colocaron 10 ± 1 mg de micelio de *M. ruber* de cada condición de cultivo (A, E y AE) en tubos eppendorf, se adicionó 0,9 mL de etanol analítico y 0,1 mL de la solución A. Se dejó reaccionar a temperatura ambiente en oscuridad por 15 y 30 minutos y se registró la absorbancia a una longitud de onda de 517 nm. Como blanco se utilizó 0,9 mL de etanol analítico y 0,1 mL de la solución A sin la muestra utilizando los mismos tiempos de reposo estudiados para los micelios. Este procedimiento se realizó por triplicado. Los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición radicalaria (% RSA) relativo a cada tiempo (Ecuación 12).

2.2.4. Determinación de la actividad antimicrobiana de los micelios de *M. ruber*

Los pigmentos producidos por los hongos del género *Monascus* spp. han sido asociados con actividad antimicrobiana (Husáková y Patáková, 2025) es por ello que se evaluó la actividad antimicrobiana intrínseca de sus micelios. Existen una amplia variedad de métodos de laboratorio para evaluar la actividad antimicrobiana in vitro de un extracto o un compuesto puro, siendo los más conocidos y básicos la difusión en disco y la dilución en caldo o agar (Balouiri et al., 2016).

2.2.4.a. Método de difusión en disco

La prueba de difusión de disco en agar, desarrollada por Heatley (1944), es el método oficial utilizado en muchos laboratorios de microbiología para las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos de rutina. En este método, las placas de agar se inoculan con un inóculo estandarizado del microorganismo de prueba. A continuación, se colocan sobre la superficie del agar discos estériles (de aproximadamente 6 mm de diámetro), de papel de filtro o del material que contienen el compuesto de ensayo a la concentración deseada. Las placas de Petri se incuban en condiciones adecuadas. Generalmente, el agente antimicrobiano se difunde en el agar e inhibe la germinación y el crecimiento del microorganismo de prueba y luego se miden los diámetros de las zonas de inhibición de crecimiento. Dado que la inhibición del crecimiento bacteriano

no significa la muerte bacteriana, este método no puede distinguir los efectos bactericidas y bacteriostáticos.

La actividad antimicrobiana de los micelios obtenidos se determinó mediante el método de difusión en agar (Balouiri et al., 2016). Se prepararon suspensiones de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Escherichia coli* (ATCC 25922) de McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) a partir de cultivos en Agar nutritivo (Anexo I) (48 h, 37 °C) y se realizaron las diluciones seriadas correspondientes hasta lograr inóculos en el orden de 10^6 UFC/mL. Se procedió a sembrar, 100 μ L de cada inóculo sobre placas de Petri con agar nutritivo (Anexo I) con ayuda de un hisopo estéril esparciéndolo sobre toda la superficie del agar para garantizar una distribución homogénea sobre la totalidad de la placa. Para el análisis de los micelios se cortaron discos de 6 mm de diámetro de los micelios obtenidos de cada condición de cultivo. Con el objetivo de reducir la carga bacteriana de los mismos se trataron bajo luz UV por 15 minutos de cada lado. Luego se colocaron con pinzas estériles sobre las placas previamente sembradas con los inóculos bacterianos. Adicionalmente, para evaluar la carga original en los micelios, se realizó un ensayo con los micelios sin tratamiento UV. Las placas se incubaron por 24 h a 37 °C.

Finalmente, para determinar la actividad antimicrobiana se procedió a medir el halo de inhibición (mm) de desarrollo del microorganismo inoculado asociado a cada uno de los discos. Se midió en dirección vertical y horizontal para obtener un valor promedio. En caso de no existir halo se consideró que no existió inhibición. Los ensayos se realizaron por duplicado.

2.2.4.b. Método de contacto de con suspensión bacteriana

Adicionalmente, se determinó la actividad antimicrobiana de los micelios mediante un análisis por contacto con una suspensión bacteriana. Se utilizaron inóculos de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Escherichia coli* (ATCC 25922) preparados de acuerdo al ítem anterior (2.2.4.a). En tubos de ensayo estériles se colocaron 500 μ L la suspensión bacteriana y un disco de micelio de 6 mm de diámetro, y se homogeneizó bien. Inmediatamente después, para evaluar el poder antimicrobiano a tiempo cero (T_0), se realizaron diluciones seriadas en agua de peptona 0,1 %, se sembró en superficie en

agar nutritivo, se incubó por 24 h a 37 °C y se obtuvo el recuento bacteriano. Los tubos con las mezclas se incubaron por 24 h a 37 °C. Tras la incubación estos se homogeneizaron, se realizaron diluciones seriadas, se sembró en superficie agar nutritivo, se incubó por 24 h a 37 °C y se obtuvieron los recuentos bacterianos para determinar el poder antimicrobiano tras 24 h (T_f).

Se realizó un control del recuento de cada inóculo para asegurarse que estuvieran en la concentración deseada. Para economizar recursos, los recuentos se realizaron por siembra en superficie de 5 μ L por el método de la gota. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Obtención de los materiales de micelio puro (MMP)

3.1.1. Confirmación de identidad de *M. ruber*

En medio CYA se desarrollaron colonias de color blanco de 18 mm de diámetro promedio, flocosas de reverso incoloro. Las colonias en MEA se caracterizaron por tener un diámetro promedio 38 mm, por ser planas y flocosas, con anverso blanco y centro naranja, y reverso pálido en los márgenes y centro anaranjado. En G25N se observaron colonias de 10 mm de diámetro promedio, bajas, escasas y flocosas, con anverso blanco y reverso incoloro. No se observó crecimiento a 5 °C. En CYA a 37 °C se observaron colonias con un diámetro promedio de 21 mm, bajas y escasas, con anverso con centro blanco y extremos sepia claro, y reverso con centro marrón y resto sepia. La Figura 42 ilustra las características macroscópicas obtenidas tras 7 días de incubación.

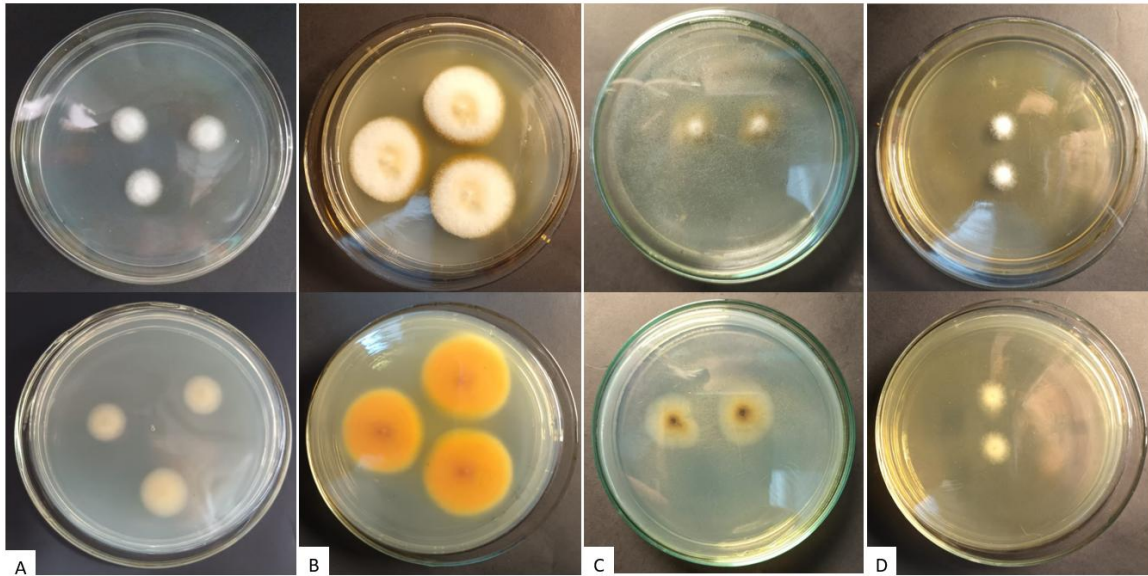


Figura 42. Colonias de *M. ruber* tras 7 días de incubación en diferentes medios de cultivo: A) CYA a 25 °C; B) MEA a 25 °C; C) CYA a 37 °C; D) G25N a 25 °C. (Superior: anverso; Inferior reverso).

La observación microscópica de los preparados permitió apreciar hifas hialinas septadas de paredes lisas, conidios, de forma esférica y piriforme que nacen en forma de cadenas en los lados y extremos de las hifas, y cleistotecios esféricos, de aproximadamente 45 mm de diámetro promedio, de paredes definidas de color marrón, llenos de ascoporas incoloras, lisas y elipsoidales (Figura 43).

Las características macroscópicas y microscópicas observadas se corresponden con lo descrito por Pitt y Hocking (2009), confirmándose la identidad del aislamiento como *Monascus ruber*.

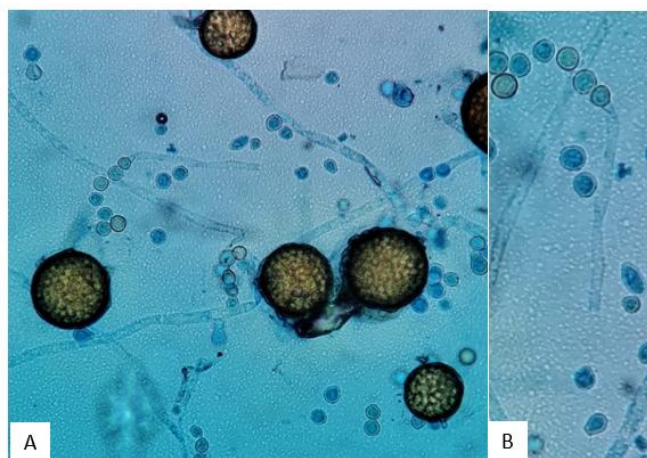


Figura 43. Ampliaciones desde microscopías de aislamientos de *M. ruber* A) cleistotecios 40X; B) conidios 100X.

3.1.2. Cultivo sumergido

Los cultivos de *Aspergillus niger* y *Monascus ruber* en medio en cultivo agitado (A), estático (E) y combinado (AE) presentaron micelios con apariencias diferentes según la condición de cultivo y cepa fúngica. La Figura 44 muestra la comparación de las diferentes morfologías de crecimiento y los micelios obtenidos para *A. niger*. El crecimiento de AN en medio Sabouraud glucosado comercial bajo la condición A fue similar a lo obtenido en el ítem 3.2.1. (Capítulo I) con medio CSGM obteniéndose pellets esféricos similares a dientes de león. Tras el filtrado se obtuvieron discos de micelios de color grisáceo constituido por una red de pellets que adoptaron forma del filtro. Se obtuvo un disco de micelio o MMP por cada Erlenmeyer cultivado. El cultivo obtenido en condiciones estáticas (E) dio como resultado un patrón de crecimiento restringido a la superficie del medio, formando un micelio de color beige que no cubrió completamente el área disponible (interfaz medio-aire) como si lo hizo AN cuando creció estático en CSGM. Si bien esta morfología superficial es característica de algunos cultivos de hongos filamentosos en condiciones estáticas, resultó subóptima para la producción escalable de materiales de micelio puro (MMP) de *A. niger*. Esto podría estar asociado a la ausencia de dispersión inicial del inóculo, a diferencia del método combinado (AE), que limitó la distribución uniforme del crecimiento fúngico, conduciendo a la obtención de materiales con áreas inconsistentes y baja integridad estructural. Por esta razón, los MMP obtenidos bajo la condición E fueron descartados para las caracterizaciones posteriores, lo que resalta la importancia de una fase de agitación inicial para promover un crecimiento uniforme y, en consecuencia, la producción de materiales más cohesivos y consistentes. Por el contrario, la condición de cultivo AE resultó en la formación de MMP blanco-beige homogéneos que cubrieron completamente la interfaz medio-aire, con una pequeña cantidad de biomasa dispersa que permaneció en el medio de cultivo (R_{AE}) (Figura 45).



Figura 44. Izq) Diferentes morfologías de crecimiento de *A. niger* bajo diferentes condiciones de cultivo. Der.) Micelios obtenidos. A: agitado; E: estático; AE: combinado

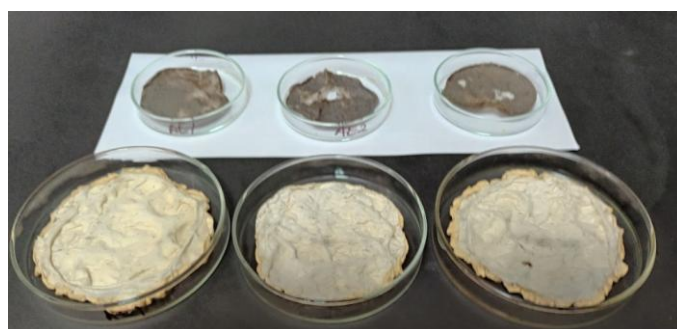


Figura 45. Micelios y biomasa remanente en medios AE de *A. niger*.

A pesar de las claras diferencias morfológicas, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en cuanto a la producción de micelio y valores de pH entre las tres condiciones de cultivo evaluadas (Tabla 13). Estos valores de producción de biomasa (g/L) concuerdan con reportes previos sobre la producción de biomasa de *A. niger* en cultivo

sumergido. Comparativamente, Zheng et al. (2012) demostraron que *A. niger* cultivado con glucosa o xilosa como única fuente de carbono produjo una producción de 5,8 y 4,6 g/L, respectivamente. De igual manera, Colin et al. (2013) observaron niveles de biomasa de entre 2 y 6 g/L tras 72 h en un medio mineral suplementado con sacarosa. Los rendimientos de micelio obtenidos bajo las condiciones E y A en caldo Sabouraud glucosado comercial resultaron ser 3,3 y 1,8 veces superiores a los obtenidos con CSGM, respectivamente (ítem 3.2.1-Capítulo I). Estas diferencias pueden deberse a que el medio comercial posee tripteína en lugar de hidrolizado de caseína, la cual es obtenida por la hidrólisis enzimática de caseína en lugar de una hidrólisis ácida lo que la hace más rica en aminoácidos sobre todo en triptófano.

Condición	g/L (b.s)	pH _{final} medio
E	4,69 ± 0,81 ^a	3,7 ± 0,1 ^a
A	4,33 ± 0,25 ^a	3,9 ± 0,6 ^a
AE	4,11 ± 0,46 ^a	3,7 ± 0,3 ^a
R _{AE}	1,64 ± 0,01 ^b	

*Diferentes letras en una misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$) mediante la prueba de Tukey

Tabla 13. Rendimientos de micelio de *A. niger* en b.s y pH al final de la incubación (*pH inicial 5,8 ± 0,1). A: agitado; E: estático; AE: combinado, R_{AE}: biomasa residual de AE. Media ± DS.

En la Figura 46 pueden observarse las diferentes morfologías de crecimiento y los micelios obtenidos para *M. ruber* en cultivo agitado (A), estático (E) y combinado (AE). Todos los cultivos se caracterizaron por la producción de pigmentos solubles de color rojizo en mayor o menor medida. Los cultivos bajo agitación se caracterizaron por crecimiento en forma de pellets esféricos obteniéndose MMP rosados que adoptaron la forma del filtro luego del filtrado. Las condiciones E y AE resultaron muy similares entre sí, caracterizándose por caldos más rojos y micelios flotantes de color rojizo, heterogéneos, y con reverso de color rojo más oscuro.

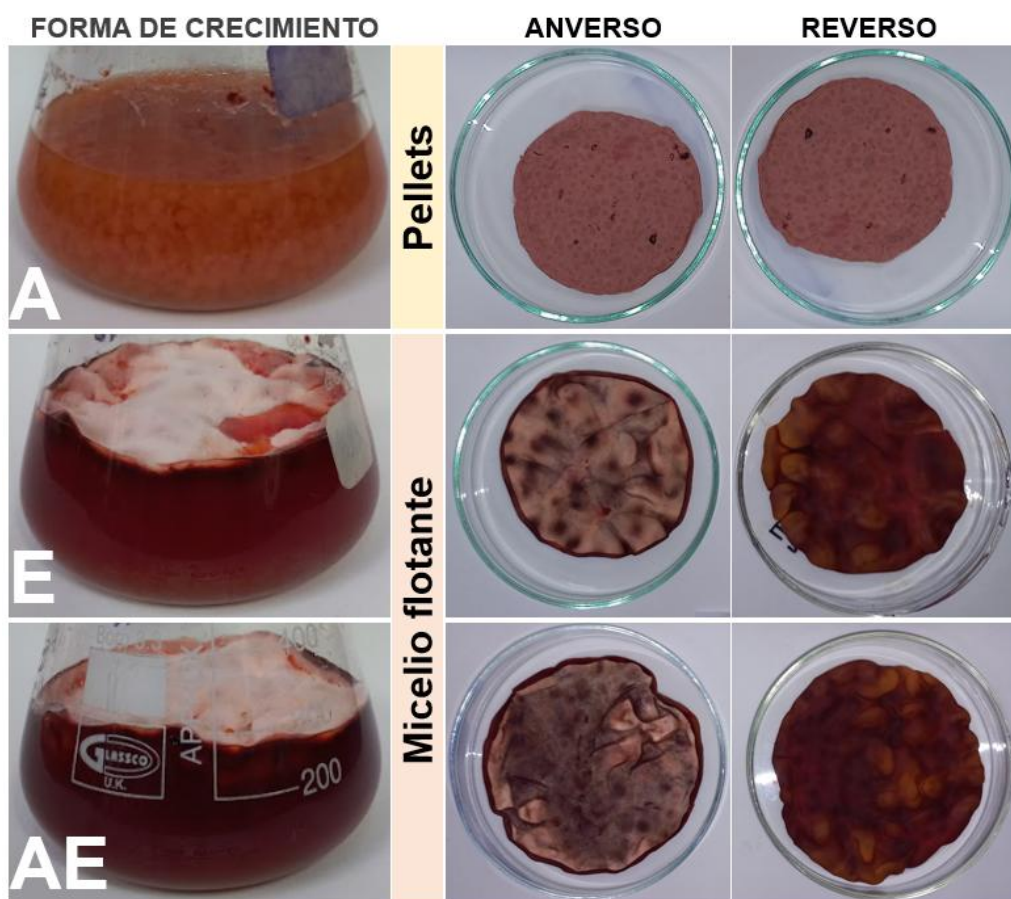


Figura 46. Izq.) Diferentes morfologías de crecimiento de *Monascus ruber* bajo diferentes condiciones de cultivo. Der.) Anverso y reverso de los micelios obtenidos. A: agitado; E: estático; AE: combinado

Los valores obtenidos de producción de micelio se encuentran dentro del rango reportado para *M. ruber* (3-9,5 g/L) en cultivos sumergidos (Vendruscolo et al., 2016; Darwesh et al., 2023). La condición A de *M. ruber* se destacó por la mayor producción de micelio siendo esta significativamente mayor a las obtenidas bajo E y AE (Tabla 14). Este comportamiento es comparable con lo reportado por Hajjaj et al. (1999). En dicho trabajo se obtuvo una mayor producción de biomasa de *M. ruber* con el aumento de la agitación o la aireación del medio. Los autores sugieren que esto se debe a una producción de energía más eficiente cuando el aporte de oxígeno era mayor. En estas condiciones, se produce más ATP, por fosforilación oxidativa, por cada glucosa catabolizada, y, por lo tanto, se forma mayor cantidad de micelio por cada glucosa consumida. Los valores de pH finales resultaron similares para las tres condiciones de cultivo.

Condición	g/L (B g/L (b.s)	pH final medio
A	5,90 ± 0,08 ^a	5,8 ± 0,5 ^a
E	3,87 ± 0,23 ^b	5,1 ± 0,1 ^a
AE	4,32 ± 0,55 ^b	5,4 ± 0,1 ^a

*Diferentes letras en una misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$) mediante la prueba de Tukey.

Tabla 14. Rendimientos de micelio de *M. ruber* en base seca y pH al final de la incubación (pH inicial 5,8 ± 0,1) A: agitado; E: estático; AE: combinado. Media ± DS.

Tanto para *A. niger* como *M. ruber* los MMP provenientes del filtrado de pellets (condición A) resultaron menos cohesivos que los provenientes de micelios flotantes y se caracterizaron por una mayor homogeneidad respecto al espesor. Esto se debe a que durante el filtrado al vacío la red de pellets se compacta dando un espesor más homogéneo.

3.1.3. Plastificación y prensado

Debido a que a temperatura y humedad ambiente todos los micelios se deshidrataron rápidamente (dentro de las primeras 24 h), resultando en materiales quebradizos, se procedió a plastificarlos mediante su inmersión en soluciones de glicerol. Para la prueba de plastificación se seleccionaron las mejores condiciones de crecimiento obtenidas para cada hongo. Para *M. ruber* se utilizaron los micelios de las condiciones A y E (Figura 46). Las condiciones E y AE tuvieron resultados similares de producción micelio, sin embargo, la condición E presentó la ventaja de no requerir agitación y disminuir así el equipamiento necesario. En cuanto a *A. niger* se seleccionaron las condiciones A y AE, dado que la condición E no logró obtener un micelio flotante que cubriera toda la sección del recipiente (Figura 44). La Figura 47 muestra los micelios de *M. ruber* y de *A. niger* bajo los diferentes tratamientos de inmersión en glicerol después del prensado.

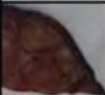
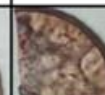
<i>A. niger</i>								
Glicerol (% p/p)	controles		Tiempo de inmersión					
			3 horas		12 horas		24 horas	
	A	AE	A	AE	A	AE	A	AE
0			-	-	-	-	-	-
25	-	-						
50	-	-						
<i>M. ruber</i>								
Glicerol (% p/p)	controles		Tiempo de inmersión					
			3 horas		12 horas		24 horas	
	A	E	A	E	A	E	A	E
0			-	-	-	-	-	-
25	-	-						
50	-	-						

Figura 47. Micelios de *M. ruber* (MR) y *A. niger* (AN) obtenidos en diferentes condiciones de cultivo e inmersión en glicerol (25 y 50 %p/p) por 3, 12 y 24 h y sus respectivos controles (glicerol 0 % p/p). (A) cultivo agitado, (E) estático y (AE) combinado.

Tras 72 h de compresión, se obtuvieron láminas de micelio con un espesor promedio de aproximadamente 0,2 mm y 0,4 mm para *A. niger* y *M. ruber*, respectivamente en todas las condiciones probadas. Los controles no plastificados exhibieron mayor rigidez en comparación con sus contrapartes tratadas con glicerol que parecían menos secas y maleables (Figura 48). Se observó que los materiales obtenidos bajo la condición A presentaron bordes irregulares debido a la ligera desintegración después de la inmersión en glicerol, siendo esta desintegración mayor para el 25 % que el 50 % p/p (Figura 49). Esto podría atribuirse a una mayor desintegración de la red de pellets de micelio a concentraciones más bajas de glicerol. Este efecto podría estar probablemente asociado con una mayor absorción de agua y una plastificación insuficiente, lo que

debilita la cohesión entre los pellets y favorece su desprendimiento parcial. En concordancia con esto, Appels et al. (2020) demostraron que el glicerol reduce la absorción de agua en la matriz de las hifas en películas de micelio. Por el contrario, este comportamiento no se observó en los materiales de micelio plastificados obtenidos bajo las condiciones E y AE, es por eso que estos se seleccionaron para experimentos posteriores.

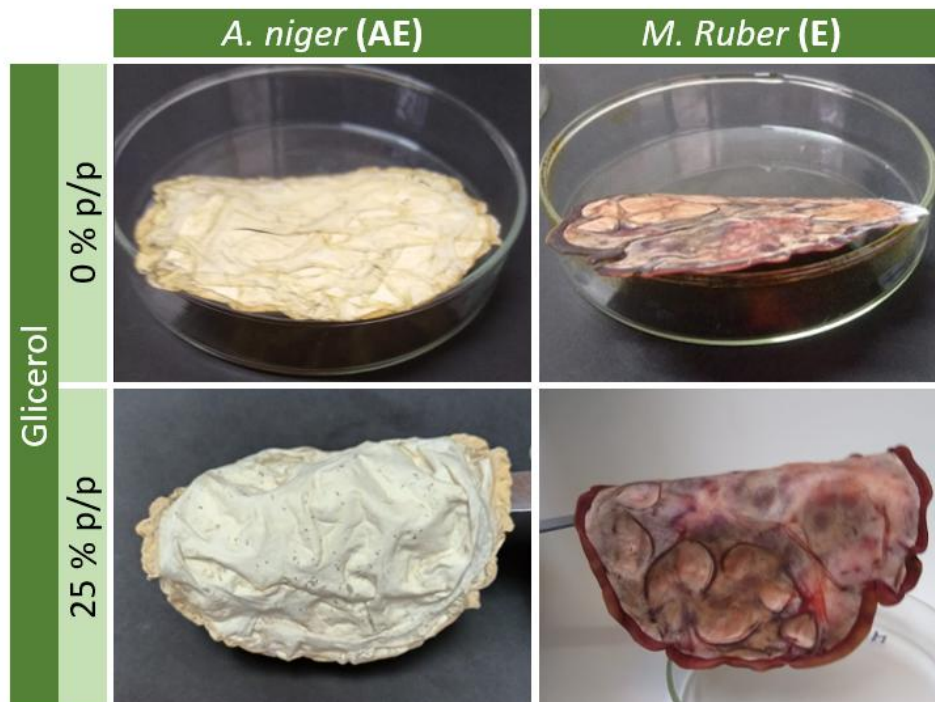


Figura 48. Micelios de *A. niger* y *M. ruber* obtenidos de cultivos combinado (AE) y estático (E) tratados por inmersión en 25 % p/p glicerol (3 h) y sus controles (0 % p/p) luego del prensado.

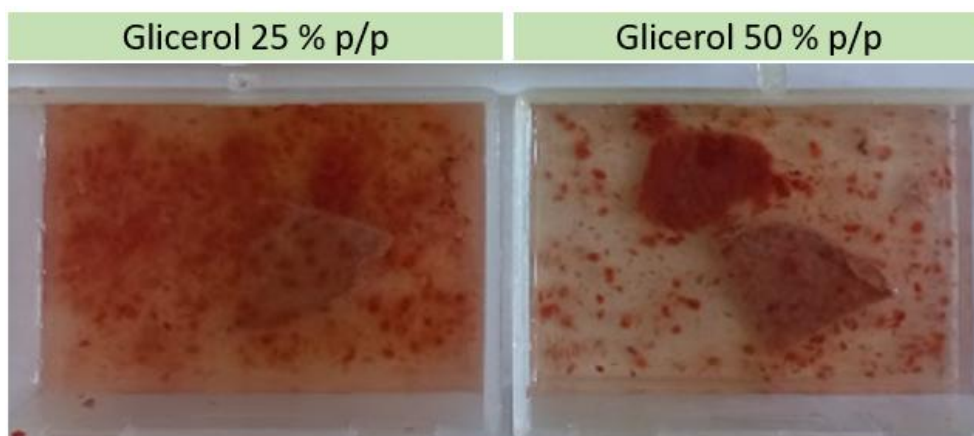


Figura 49. Desintegración de micelios de *M. ruber* durante la inmersión en glicerol 25 y 50 % p/p.

Tras 24 h de salidos de la prensa todos los MMP plastificados se observaron sin contaminación microbiana y conservaron su maleabilidad. Sin embargo, todos los micelios sin plastificar presentaron contaminaciones y presentaron mayor deshidrataron haciéndolos muy rígidos y quebradizos. A simple vista no se observó demasiada variación entre los distintos tiempos de inmersión.

Tras 100 días de almacenamiento en condiciones ambientales, todos los MMP plastificados permanecieron visualmente inalterados y sin signos de contaminación microbiana, lo que se asoció con sus bajos valores de actividad de agua ($0,4 \pm 0,1$). El protocolo de inmersión de 3 horas fue suficiente para mejorar la durabilidad y la manipulación de los materiales miceliales, ya que no se observaron diferencias apreciables entre los tiempos de inmersión.

3.2. Caracterización de los MMP

3.2.1. Determinación del color

Para la determinación del color, además de los MMP de *A. niger* y *M. ruber*, se incluyeron MMP de *P. nalgiovense* obtenidos bajo condiciones AE. Se optó por realizar el cultivo de *P. nalgiovense* directamente bajo esta condición considerando los resultados previos, que evidenciaron un bajo crecimiento en condiciones estáticas (ítem 3.2.1 – Capítulo I) y la desintegración de los micelios obtenidos por agitación (3.1.3 - Capítulo III).

La Tabla 15 muestra los resultados del análisis de color para los materiales de micelio puro (MMP) de *A. niger* (condiciones A y AE), *M. ruber* (condiciones A y E) y *P. nalgiovense* (condición AE). Las propiedades colorimétricas de los MMP variaron notablemente en función de la cepa fúngica y de las condiciones de cultivo (estático, agitado o combinadas). Las Figuras 50 a 52 presenta los códigos de color hexadecimal y RAL classic, más cercanos derivados de las coordenadas promedio CIELAB, junto con sus nombres de color estándar correspondientes obtenidos para los MMP de *A. niger*, *P. nalgiovense*, y *M. ruber*.

		A _A	A _R	AE _A	AE _R
AN	L	39,97 ± 0,44	39,17 ± 0,97	81,34 ± 1,63	69,99 ± 3,11
	a	2,78 ± 0,41	3,13 ± 0,53	-0,38 ± 0,48	1,71 ± 0,66
	b	11,07 ± 1,40	11,25 ± 1,12	12,43 ± 0,83	22,74 ± 1,73
	ΔE	52,34 ± 0,25	53,17 ± 0,90	13,86 ± 1,75	29,33 ± 1,93
		A _A	A _R	E _A	E _R
MR	L	51,62 ± 0,52	51,39 ± 0,44	29,01 ± 4,84	34,69 ± 3,88
	a	18,00 ± 0,27	18,82 ± 0,06	17,32 ± 3,17	15,95 ± 3,23
	b	3,28 ± 0,40	3,00 ± 0,56	10,69 ± 6,59	14,99 ± 5,14
	ΔE	42,79 ± 0,40	43,28 ± 0,44	65,75 ± 2,74	60,56 ± 1,94
		-	-	AE _A	AE _R
PN	L	-	-	73,00 ± 4,36	73,33 ± 2,08
	a	-	--	1,33 ± 0,58	-0,33 ± 0,58
	b	-	-	9,33 ± 2,31	14,67 ± 0,58
	ΔE	-	-	19,67 ± 4,90	21,65 ± 1,48

Tabla 15. Resultados del análisis colorimétrico CIELAB en el anverso (A) y reverso (R) de los MMP de *A. niger* (AN), *M. ruber* (MR) y *P. nalgiovense* (PN). (A) cultivo agitado, (E) estático y (AE) combinado. Valores expresados como media ± DS.

En cuanto a los MMP de *A. niger*, los valores de L fueron significativamente más bajos en las condiciones de cultivo agitado (A), tanto en el anverso como en el reverso del material, lo que indica un alto nivel de oscuridad. El parámetro a con valores positivos (≈ 3) y el parámetro b (≈ 11) confirman una tendencia hacia tonos rojizos y amarillentos, respectivamente. La combinación de estos valores cromáticos resultó en un color general marrón-grisáceo. En contraste, los materiales de *A. niger* obtenidos bajo condiciones combinadas (AE) mostraron un aumento sustancial en la luminosidad (L), especialmente en el anverso ($81,34 \pm 1,63$). Esto sugiere que la morfología del micelio bajo condiciones AE favorece la formación de superficies más claras. En el reverso se observó un aumento del parámetro b ($22,74 \pm 1,73$) confirmando un matiz amarillo más intenso que en el anverso. Esta diferencia entre ambas caras podría deberse a una mayor exposición del reverso al medio de cultivo. Estos resultados fueron consistentes con los códigos hexadecimales y RAL classic obtenidos, mostrando colores marrón-grisáceos oscuro y colores claros blanco-beige para los materiales provenientes de cultivos A y AE, respectivamente (Figura 50).

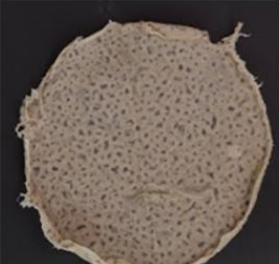
AE		A	
ANVERSO	REVERSO	ANVERSO	REVERSO
PAPYRUS WHITE (RAL 9018)	BEIGE (RAL 1001)	PALE BROWN (RAL 8025)	PALE BROWN (RAL 8025)
PALE SILVER (HEX #D1CAB3)	ECRU (HEX #BAA982)	WENGE (HEX #685C4C)	QUINCY (HEX #675A4A)
			

Figura 50. Códigos y nombres de los colores similares según las paletas hexadecimal y RAL classic de los materiales de *A. niger* bajo diferentes condiciones de cultivo. (A) cultivo agitado y (AE) combinado.

En general, los MMP de *M. ruber* obtenidos mediante el cultivo estático (E) presentaron mayor heterogeneidad en ambas caras, lo que se evidenció como una mayor desviación estándar en los valores de todas las coordenadas cromáticas. Los MMP de *M. ruber* exhibieron una tendencia opuesta a los de *A. niger*. Los valores de L fueron notablemente más bajos en el cultivo estático (E), lo que refleja un oscurecimiento apreciable. Los valores considerablemente más altos para el parámetro a (≈ 18) en todas las condiciones evidencian una fuerte presencia de pigmentos rojos característicos de este género. La variación global del color (ΔE) fue significativamente mayor en el cultivo estático de *M. ruber*. Este comportamiento puede atribuirse a la producción de pigmentos característicos del género *Monascus*, cuya biosíntesis en cultivo sumergido se ve influenciada por las condiciones de aireación del medio. Se ha reportado que, en cultivos de *Monascus spp.* con alta aireación (bajo agitación), la producción de pigmentos y metabolitos secundarios se ve disminuida debido a la producción de ácidos orgánicos inhibitorios (de Carvalho et al., 2006; Pineda Insuasti et al., 2016). Es por eso que bajo condiciones estáticas la coloración de los MMP, debida a la producción de pigmentos, se vio aumentada respecto aquellos bajo agitación. Si bien la correlación visual de los códigos hexadecimal y RAL obtenidos para los materiales de *M. ruber* no fue tan similar como para *A. niger*, la variación cromática en ambas condiciones de

cultivo fue visible obteniéndose colores más claros con tonos rosa-beige en la condición A y marrón-rojizo oscuro en la condición E (Figura 51).

E		A	
ANVERSO	REVERSO	ANVERSO	REVERSO
RED BROWN (RAL 8012)	SIGNAL BROWN (RAL 8002)	PEARL BEIGE (RAL 1035)	PEARL BEIGE (RAL 1035)
LIVER CHESTNUT (HEX #603A34)	COFFEE (HEX #6F483B)	BAZAAR (HEX #986E75)	BAZAAR (HEX #986D75)
			

Figura 51. Códigos y nombres de los colores similares según las paletas hexadecimal y RAL classic de los materiales de *M. ruber* obtenidos bajo diferentes condiciones de cultivo. (A) cultivo agitado y (E) estático.

Por último, los MMP obtenidos con *P. nalgiovense* cultivado en condiciones combinadas (AE) presentaron una coloración predominantemente clara en ambas caras del material, con valores de luminosidad ($L \approx 73$) elevados y ΔE más bajos (≈ 20). Los parámetros cromáticos a y b indicaron tonos neutros con ligeras tendencias hacia el amarillo, especialmente en el reverso, de manera similar a los MMP de *A. niger* obtenidos en AE. Estos resultados fueron consistentes con los códigos hexadecimales y RAL classic obtenidos, mostrando colores claros gris-beige para los MMP de *P. nalgiovense* provenientes de cultivo A y AE, respectivamente (Figura 52).

Los valores colorimétricos CIELAB obtenidos en la Tabla 15 fueron consistentes con los códigos de color hexadecimal y RAL classic a pesar de las sutiles diferencias en la percepción visual. En conjunto, estos resultados refuerzan la idea de que el color de los MMP depende tanto de la especie fúngica como de las condiciones de cultivo. Mientras *A. niger* y *P. nalgiovense* producen MMP de apariencia más clara en cultivo AE, *M. ruber* genera MMP intensamente pigmentados, con predominancia de tonalidades rojas y

mayores contrastes cromáticos. Estas características podrían aprovecharse en aplicaciones donde la estética o las propiedades cromáticas del material resulten relevantes, como en diseño sustentable o packaging. En particular, los MMP de *M. ruber* podrían resultar atractivos en aplicaciones donde el color constituya un valor agregado, mientras que los de *A. niger* y *P. nalgiovense* podrían ser más adecuados en contextos que requieran tonalidades neutras y mayor uniformidad visual.

AE	
ANVERSO	REVERSO
SILK GREY (RAL 7044)	PEBBLE GREY (RAL 7032)
SILVER PINK (HEX #BAB2A3)	KHAKI (HEX #BCB398)
	

Figura 52. Códigos y nombres de los colores similares según las paletas hexadecimal y RAL classic de los materiales de *P. nalgiovense* obtenidos bajo cultivo combinado (AE).

3.2.2. Estudio de las propiedades mecánicas: Ensayo de tracción uniaxial

La Figura 53 muestra los cultivos y micelios utilizados para evaluar propiedades mecánicas. La producción en frascos permitió obtener micelios superficiales flotantes de una mayor sección que los obtenidos con el cultivo en Erlenmeyer lo que facilitó la obtención de las probetas. En este ensayo también se incorporaron MMP de *P. nalgiovense* cultivado bajo condiciones AE, empleando protocolos de inmersión en glicerol al 25 y 50 % durante 3 h. En todos los casos, se obtuvieron micelios superficiales flotantes que cubrieron la totalidad de la sección del frasco de color blanco-beige para *A. niger* y *P. nalgiovense* y rojizos para *M. ruber*. La tonalidad roja de los micelios de *M. ruber* se vio disminuida respecto a la obtenida mediante la producción en Erlenmeyer. Esto podría estar asociado a una mayor aireación debida a una mayor superficie de

contacto medio-aire, lo que llevó a una menor producción de pigmentos (de Carvalho et al., 2006; Pineda Insuasti et al., 2016).

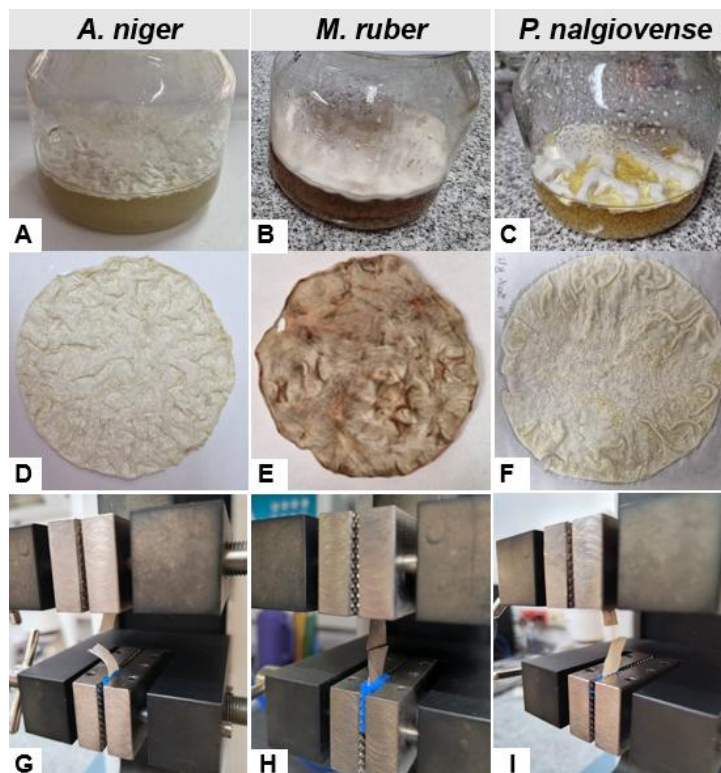


Figura 53. A-F: Micelios obtenidos de *A. niger*, *M. ruber* y *P. nalgiovense* utilizados para evaluar sus propiedades mecánicas. G-H: Materiales de micelio entre las mordazas del equipo luego de la ruptura.

La Tabla 16 reúne los resultados de las pruebas mecánicas de los materiales de micelio de *A. niger* (AE), *P. nalgiovense* (AE) y *M. ruber* (E) con y sin plastificación con glicerol. Los materiales de *A. niger*, *P. nalgiovense* y *M. ruber* presentaron espesores promedio de $0,25 \pm 0,05$, $0,25 \pm 0,01$, $0,44 \pm 0,07$ mm, respectivamente. En todas las especies evaluadas se observó que la incorporación de glicerol redujo significativamente la resistencia máxima a la tracción (TS) y el módulo de Young (YM), al mismo tiempo que aumentó notablemente la elongación a la rotura (EB), lo que indica un efecto plastificante característico. La misma tendencia fue reportada por varios estudios que evaluaron el efecto de la plastificación sobre las propiedades físicas de películas (Gao et al., 2006; Appels et al., 2020; Ben et al., 2022).

En general, la plastificación con glicerol contribuyó al desarrollo de materiales de micelio más dúctiles y menos rígidos. Lo anterior puede observarse gráficamente mediante las curvas de tensión vs deformación de los materiales de micelio (Figura 54).

No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las dos concentraciones de glicerol evaluadas, lo que sugiere que una solución al 25 % p/p fue suficiente para alcanzar el efecto plastificante deseado. Una posible explicación de este fenómeno puede encontrarse a nivel molecular. A bajas concentraciones de glicerol, las interacciones predominantes son proteína-proteína y proteína-glicerol. A medida que aumenta la concentración de glicerol, también lo hace el número de interacciones glicerol-glicerol, lo que puede alterar el comportamiento mecánico del material. Gao et al. (2006), mediante análisis espectroscópico de películas de kafirina, concluyeron que a concentraciones de glicerol entre 30 y 40 %p/p ocurren suficientes interacciones glicerol-glicerol para inducir una transición vítrea.

Los controles de *P. nalgiovense* exhibieron los valores más altos de TS (3,45 MPa) y YM (324,23 MPa), superando a las otras especies evaluadas. Por su parte, *A. niger* y *M. ruber* mostraron una elongación considerablemente mayor tras la plastificación, alcanzando valores de hasta 39,25 % y 30,3 %, respectivamente, frente a valores inferiores al 2 % en sus respectivos controles.

Hongo	Parámetro	CONTROL	25 % GLI	50 % GLI
AN	TS(MPa)	0,69 ± 0,04 ^a	0,25 ± 0,05 ^b	0,33 ± 0,08 ^b
	YM (MPa)	64,98 ± 16,12 ^a	0,57 ± 0,21 ^b	0,94 ± 0,18 ^b
	EB (%)	1,67 ± 0,10 ^a	39,25 ± 6,54 ^b	34,10 ± 6,64 ^b
MR	TS(MPa)	1,55 ± 0,52 ^a	0,30 ± 0,07 ^b	0,26 ± 0,05 ^b
	YM (MPa)	163,57 ± 23,11 ^a	2,57 ± 1,18 ^b	1,66 ± 0,34 ^b
	EB (%)	1,13 ± 0,10 ^a	25,08 ± 4,34 ^b	30,28 ± 5,34 ^b
PN	TS(MPa)	3,45 ± 0,64 ^a	0,45 ± 0,09 ^b	0,50 ± 0,04 ^b
	YM (MPa)	324,23 ± 63,63 ^a	2,04 ± 0,50 ^b	2,46 ± 0,46 ^b
	EB (%)	1,34 ± 0,35 ^a	23,13 ± 3,14 ^b	21,49 ± 2,88 ^b

* Diferentes letras minúsculas en una misma fila indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,05$) mediante la prueba de Tukey.

Tabla 16. Resultados del ensayo de tracción uniaxial (TS: Resistencia máxima a la tracción; YM: Módulo de Young; EB: Elongación a la rotura). Valores expresados como media ± DS. (AN) *Aspergillus niger*; (MR) *Monascus ruber*; (PN) *Penicillium nalgiovense*. GLI: glicerol.

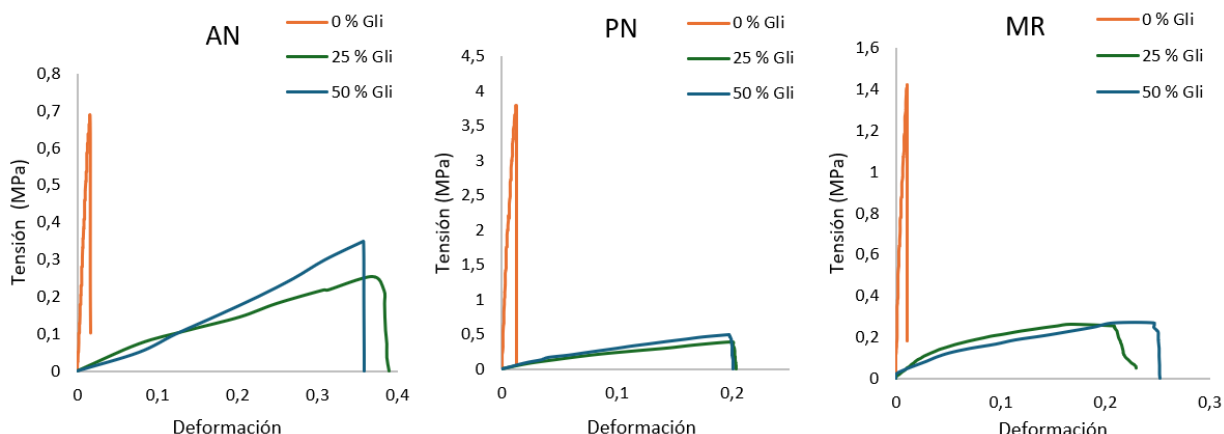


Figura 54. Curvas Tensión vs Deformación correspondientes a los materiales de micelio de *A. niger* (AN), *P. nalgiovense* y *M. ruber* (MR) y tratados con 0, 25 y 50 % de Glicerol (Gli).

La Tabla 10 (Capítulo II) muestra los valores de ensayos mecánicos de varios materiales de base biológica y no sostenibles reportados en la literatura. Los materiales de micelio obtenidos en este estudio mostraron la misma tendencia descrita por Appels et al. (2020) para materiales de micelio puro de *Schizophyllum commune*: la adición de glicerol redujo la rigidez y aumentó la flexibilidad. Los valores de propiedades mecánicas reportados por Appels et al. (2020) resultaron comparables y de un orden similar a los obtenidos en el presente trabajo. En todos los casos los MMP plastificados de *A. niger*, *P. nalgiovense* y *M. ruber* presentaron valores de TS inferiores a los reportados en dicho trabajo para MMP plastificados. Además, los MMP plastificados de *P. nalgiovense* y *M. ruber* presentaron valores similares de YM y EB, mientras que los de *A. niger* presentaron menor YM y una EB levemente mayor.

Las muestras control exhibieron propiedades mecánicas comparables a las reportadas por Haneef et al. (2017) y César et al. (2021) para micelios sin plastificar obtenidos de *Pleurotus ostreatus* y *Ganoderma curtisii*, respectivamente, mientras que las muestras plastificadas mostraron menores valores de YM y TS, y mayor EB.

En relación con lo descrito previamente para las películas fúngicas (ítem 3.4- Capítulo II) los materiales de micelio plastificados en este estudio alcanzaron mayores valores de elongación que las películas obtenidas mediante casting a partir de dispersiones al 3 % p/p plastificadas con glicerol (25 % p/p), que, en contraste, presentaron mayor resistencia a la tracción y mayor rigidez (TS y YM más elevado).

3.2.3. Determinación de la capacidad antioxidante de los micelios de *M. ruber*

Como puede observarse en la Tabla 17, los MMP de MR presentaron una actividad antioxidante baja (inferior al 25 %RSA) tanto por el método de ABTS como por el de DPPH, tras 15 y 30 minutos de reacción. Esto sugiere que los pigmentos intracelulares quedan retenidos sin estar disponibles para actuar como antioxidantes. Ambos métodos mostraron tendencias de actividad antioxidantes diferentes probablemente debido a que cada método solubiliza diferentes tipos de compuestos.

Muestra	%RSA			
	ABTS		DPPH	
	15 min.	30 min.	15 min.	30 min.
A	0,0 ± 0,1	0,0 ± 0,1	5,6 ± 0,1	7,8 ± 7,1
E	10,1 ± 1,9	24,6 ± 2,3	7,7 ± 0,7	4,3 ± 2,4
AE	18,9 ± 1,1	19,5 ± 3,8	2,4 ± 0,3	0,0 ± 0,1

Tabla 17. Porcentajes de inhibición radicalaria (%RSA) tras 15 min de reacción. Media ± DS

3.2.4. Determinación de la capacidad antimicrobiana de los micelios de *M. ruber*

Los ensayos de difusión en agar no mostraron halos de inhibición en ninguna de las condiciones ensayadas (Figura 55). Análogamente ninguna condición de MMP exhibió reducción del crecimiento microbiano para ninguno de los microorganismos evaluados por el método de contacto con suspensión bacteriana tras 24 h de incubación conjunta (Tabla 18).

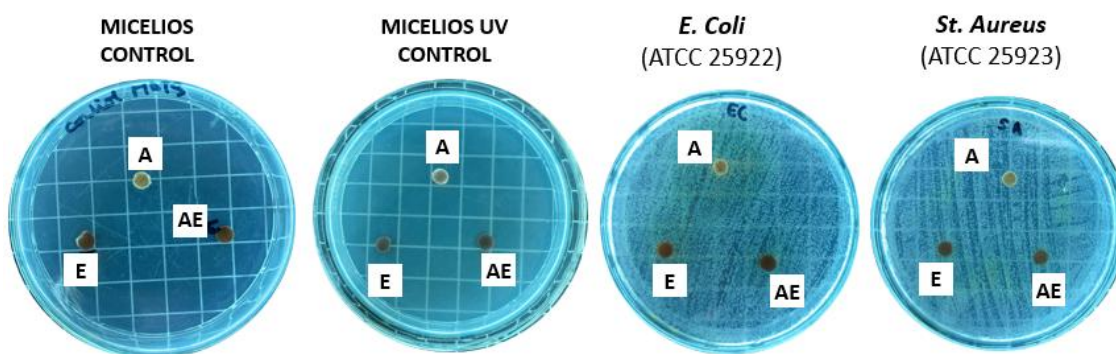


Figura 55. Resultados obtenidos en el ensayo de difusión en disco de los micelios: A: agitado; E: estático; AE: combinado

Inóculo	<i>E. coli</i>		<i>St. aureus</i>	
	1,1x10 ⁶ UFC/mL		1,0x10 ⁶ UFC/mL	
Muestra	T ₀ (UFC/mL)	T _f (UFC/mL)	T ₀ (UFC/mL)	T _f (UFC/mL)
C	4,4x10 ⁵	2,3x10 ⁸	5,3x10 ⁵	2,6x10 ⁸
A	5,5x10 ⁵	2,9x10 ⁸	1,0x10 ⁶	3,5x10 ⁷
E	6,5x10 ⁵	1,5x10 ⁸	4,5x10 ⁵	4,9x10 ⁷
AE	5,3x10 ⁵	2,7x10 ⁸	5,5x10 ⁵	2,6x10 ⁷

Tabla 18. Recuentos obtenidos en el ensayo de actividad antimicrobiana de los micelios. T₀: 0h; T_f: 24h. A: agitado; E: estático; AE: combinado, C: control

En conjunto, los resultados obtenidos indican que los pigmentos retenidos en el micelio no confieren actividad antioxidante ni antimicrobiana a los materiales obtenidos.

4. REFERENCIAS

- Alam M.N., Bristi N.J., Rafiquzzaman M. (2012). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharmaceutical Journal; 21: 143-152.
- AOAC 925.10 (2005) Solids (Total) and Moisture in Flour. In: Official Methods of Analysis, 18th Edition, AOAC International, Gaithersburg, MD.
- Appels, F.V.W., van den Brandhof, J.G., Dijksterhuis, J. et al. (2020) Fungal mycelium classified in different material families based on glycerol treatment. Commun Biol 3, 334 <https://doi.org/10.1038/s42003-020-1064-4>
- Balouiri, M., Sadiki, M., y Ibensouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of pharmaceutical analysis, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
- Ben Z.Y., Samsudin, H., Yhaya, M.F (2022) Glycerol: Its properties, polymer synthesis, and applications in starch based films, European Polymer Journal, Volume 175.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, LWT - Food Science and Technology, Volume 28, Issue 1, 25-30, ISSN 0023-6438. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).

- Castañeda Castañeda B., Ramos Llica E., Ibáñez Vasquez L. (2008) Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. Horiz Med [Internet]. 30 de diciembre de 2008 [citado 11 de marzo de 2024];8(1):56-72.
- César, E., Canche-Escamilla, G., Montoya, L., Ramos, A., Duarte-Aranda, S., Bandala V., (2021) Characterization and Physical Properties of Mycelium Films Obtained from Wild Fungi: Natural Materials for Potential Biotechnological Applications. J. Polym. Environ. 29, 4098–4105. <https://doi.org/10.1007/s10924-021-02178-3>.
- Colin V.L., Baigorí M.D. y Pera L.M. (2013) Tailoring fungal morphology of *Aspergillus niger* MYA 135 by altering the hyphal morphology and the conidia adhesion capacity: Biotechnological applications. AMB Express, 3(1), 27. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-27>.
- Darwesh, O.M., Badr, M.R., Salem, M.A., Atta, M.B., y El-sayed, M.E. (2023) Production of biopigment by *Monascus ruber* AUMC 245 under submerged fermentation and its application as colorants of some food products. Natural Resources Conservation and Research, 6(2). <https://doi.org/10.24294/nrcr.v6i2.2418>.
- de Carvalho J.C., Pandey A., Oishi B.O., Brand D., Rodriguez-Leon J.A., Soccol C.R. (2006) Relation between growth, respirometric analysis and biopigments production from *Monascus* by solid-state fermentation. Biochem Eng J. 29(3):262-9 doi:10.1016/j.bej.2006.01.008.
- Elejalde Guerra, J. I. (2001) Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. Anales de Medicina Interna, 18(6), 50–59. ISSN 0212-7199.
- Gao, C., Stading, M., Wellner, N., Parker, M. L., Noel, T. R., Mills, E. N. C., y Belton, P. S. (2006). Plasticization of a protein-based film by glycerol: A spectroscopic, mechanical, and thermal study. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(13), 4611–4616. <https://doi.org/10.1021/jf060611w>
- Guija-Poma, E., Inocente-Camones, M.A., Ponce-Pardo, J. y Zarzosa-Norabuena, E. (2015). Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. Horizonte Médico (Lima), 15(1), 57-60. ISSN 1727-558X.
- Hajjaj H., Blanc P.J, Groussac E, Goma G, Uribelarrea JL, Loubiere P. (1999) Improvement of red pigment/citrinin production ratio as a function of

environmental conditions by *Monascus ruber*. Biotechnol Bioeng. 1999 Aug 20;64(4):497-501. PMID: 10397888.

- Haneef M., Ceseracciu L., Canale C., Bayer I.S., Heredia-Guerrero J.A., Athanassiou A. (2017) Advanced materials from fungal mycelium: fabrication and tuning of physical properties. Sci Rep 24 (7) 41292. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.10.006>.
- Heatley N.G. (1944) A method for the assay of penicillin. Biochem. J.; 38:61–65.
- Huet Breña, C. (2017) Métodos Analíticos para la Determinación de Antioxidantes en Muestras Biológicas. Trabajo final de grado. Facultad de Farmacia Universidad Complutense.
- Husáková, M., y Patáková, P. (2025) Purified *Monascus* pigments: Biological activities and mechanisms of action. Journal of Natural Products, 88(2), 607–615. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.4c01008>.
- Londoño Londoño, J. (2012) Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. En Desarrollo y Transversalidad serie Lasallista Investigación y Ciencia. Corporación Universitaria Lasallista. 129-162.
- Mesa, A.M., Rincón, D., Toro, John F., Tamayo, A., Blair, S. y Rojano, B. A. (2011) Actividad antioxidante de *Piper Piedecuestanum* Trel. y Yunck. y Piper Subpedale Trel. y Yunck. Revista latinoamericana de química, 39(3), 91-99.
- Pineda Insuasti, J., Duarte Trujillo, A., Ayala-Pastaz, K., Soto-Arroyave, C., Pineda Soto, C A (2016) Production of metabolites by *Monascus spp.*: a review. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. 50. 43-52.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pan-Nala, A.; Yang, M., Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay Free Radic. Biol. Med., 26, 1231-1237
- Vendruscolo, F., Schmidell, W., Moritz, D. E., Bühler, R. M. M., de Oliveira, D., y Ninow, J. L. (2016). Isoelectric point of amino acid: Importance for *Monascus* pigment production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 5, 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.12.006>.
- Zheng Y., Yu X., Zeng J., Chen S. (2012) Feasibility of filamentous fungi for biofuel production using hydrolysate from dilute sulfuric acid pretreatment of wheat straw. Biotechnol Biofuels. 2012;5: 50. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-50>

- Zuleta A., Esteve M., Frigola A. (2009) ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. Food Chemistry; 114: 310-316

CAPÍTULO IV:

CONTRIBUCIÓN A LA

SOSTENIBILIDAD DE LOS

MATERIALES



1. OBJETIVO

El objetivo de este capítulo fue analizar aspectos asociados a la sostenibilidad ambiental de los materiales desarrollados. Para ello se planteó:

- Determinar la capacidad de desintegración en compost doméstico de películas y materiales de micelio puro.
- Evaluar el uso de extractos de bagazo cervecero como única fuente de nutrientes para la producción de biomasa de *A. niger*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Evaluación de la desintegración en compost de los materiales de micelio

Un aspecto fundamental para validar la sostenibilidad de los materiales desarrollados es su biodegradabilidad en condiciones reales de compostaje doméstico, ya que este proceso constituye una vía accesible y de bajo costo para su gestión al final de la vida útil. La desintegración en compost permite transformar la materia orgánica en dióxido de carbono, agua y biomasa microbiana, cerrando el ciclo de vida de los materiales y reduciendo su impacto ambiental.

Para el estudio de desintegración en compost, se utilizó un compost hogareño estacionado producido durante 12 semanas, ajustando su humedad a 50 % h.r (Silbert Voldman et al., 2018). Finalizado este período, el compost se tamizó con una malla de 15 mm y se dejó madurar a temperatura ambiente durante 2-3 semanas. Posteriormente, el compost se distribuyó en recipientes plásticos (≈ 1 kg por recipiente; 7 cm de profundidad), perforados (diámetro medio de poro: 0,5 cm; aproximadamente 1 poro/cm²) para garantizar una aireación adecuada y favorecer la actividad microbiana aerobia. El contenido inicial de humedad del compost fue de $47,3 \pm 1,5$ %, ajustándose al 50 % y manteniéndose en este nivel durante todo el ensayo mediante correcciones semanales.

Para el ensayo de desintegración en compost doméstico, se seleccionaron las películas de *A. niger*, *M. hiemalis* y *P. nalgiovense*, obtenidas por el tratamiento 15 US, y los MMP de *A. niger* obtenidos mediante el método de cultivo AE y plastificados por inmersión en glicerol 25 % p/p por 3 h. Los materiales se cortaron en piezas de 25x25 mm, se pesaron en balanza analítica y se colocaron en bolsas red plásticas correctamente identificadas, para contener la muestra evitando su dispersión en el compost una vez iniciada la degradación. El peso seco inicial de las muestras preparadas se determinó mediante secado en estufa a 50 °C durante 3 h y pesado posterior (precisión $\pm 0,0001$ g). Las muestras se enterraron en compost y se sometieron a ensayos de desintegración bajo condiciones mesofílicas (23 ± 2 °C).

La recuperación de las muestras se realizó en intervalos predeterminados durante 77 y 95 días para las películas y los MMP, respectivamente. Tras la extracción, se limpiaron cuidadosamente con un cepillo, se secaron a 50 °C durante 3 h, se pesaron y se retiraron de la red plástica. Se efectuó un análisis visual mediante registro fotográfico antes y después del proceso de desintegración. Cada intervalo de muestreo se evaluó por duplicado en las películas y por triplicado en los MMP. La Figura 56 presenta un esquema secuencial de la metodología. El porcentaje de pérdida de peso gravimétrica se calculó mediante la Ecuación 13.

$$\%Pérdida\ de\ peso = \frac{m_0 - m_t}{m_0} \times 100 \quad (\text{Ecuación 13})$$

Donde m_t es el peso final de la muestra seca extraída al tiempo t , m_0 es el peso inicial de la muestra seca.

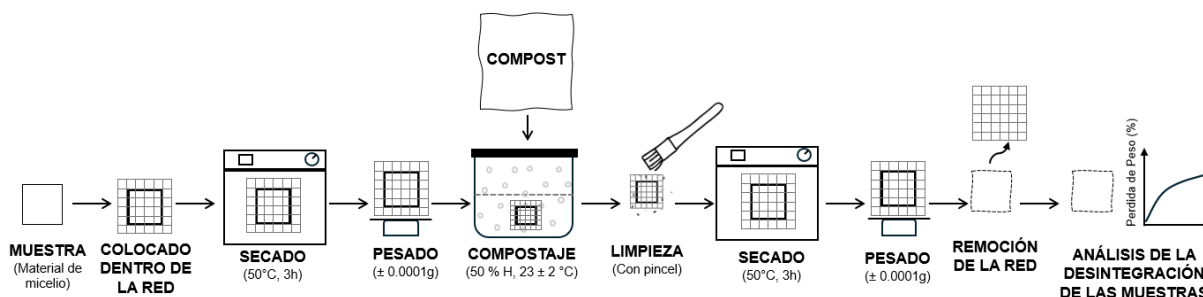


Figura 56. Esquema general de la metodología y el equipo para la desintegración de los materiales de micelio.

2.2. Producción de micelio de *A. niger* en extractos de bagazo cervecero

El aprovechamiento de residuos agroindustriales como sustrato de cultivo de hongos filamentosos constituye una estrategia clave para el desarrollo de materiales sostenibles. En este trabajo se evaluó la utilización en particular del bagazo cervecero, uno de los residuos lignocelulósicos más abundantes a nivel global. El bagazo de cervecería o bagazo cervecero (BC) es el residuo sólido que queda después de la maceración y el lavado, y consiste principalmente en las cáscaras del grano de cebada y otros compuestos residuales que no se convirtieron en azúcares fermentables durante el proceso de maceración (Aregbesola y Omafuvbe, 2014). Es por ello que el aprovechamiento del BC mediante el cultivo de hongos filamentosos ofrece un enfoque circular para la valorización y reutilización este residuo agroindustrial.

2.2.1. Preparación de los extractos de bagazo cervecero

Se elaboraron tres medios de cultivo líquidos mediante la extracción sólido-líquido de bagazo cervecero (BC), en medio acuoso y enzimático, con el fin de analizar la eficiencia de la extracción según la concentración de azúcares. Se utilizó bagazo de cervecería obtenido de una cervecería artesanal local (Buenos Aires, Argentina), secado a 80 °C hasta peso constante. Este se molió utilizando un molino de cuchillas y se tamizó por medio de tamices con número de malla 35 y 20 para obtener una fracción de trabajo con diámetros de partículas de entre 500 y 841 μm . La fracción de bagazo obtenida se mezcló en una relación 1:10 p/p en agua o soluciones enzimáticas, y se llevó a baño de agua a 80 °C durante 2 horas para obtener los extractos. Las soluciones enzimáticas se prepararon con 2,5 y 5 % v/v de preparado enzimático FoodPro® AHT (IFF, Bélgica) en buffer citrato 0,1 M pH 6,0. La formulación enzimática utilizada fue una solución de α -amilasa bacteriana termoestable, derivada de *Bacillus licheniformis*, que produce hidrólisis de almidones a altas temperaturas con el objetivo de favorecer la extracción de los azúcares del bagazo. Luego de la extracción los extractos se filtraron a vacío y se esterilizaron en autoclave a 121 °C por 15 minutos. Por último, se filtró al vacío en esterilidad para eliminar los residuos de sólidos en suspensión.

2.2.2. Cultivo sumergido en extractos de bagazo cervecero

Se colocaron alícuotas de 40 mL de cada extracto en frascos de vidrio estériles. Se utilizó 40 mL de Sabouraud glucosado (Britania) como control. Cada medio fue inoculado con una suspensión de *A. niger* a razón de 10^6 conidios/mL e incubado a 37 °C, con agitación a 135 rpm durante las primeras 24 h, seguida de condiciones estáticas por un total de 7 días (AE) (según ítem 2.1.3-Capítulo III). Finalizada la incubación, los cultivos se esterilizaron en autoclave para inactivar el crecimiento fúngico, y el micelio se recuperó por filtración al vacío. Los sobrenadantes se conservaron para el análisis de pH, azúcares reductores y carbohidratos totales. La producción de micelio se cuantificó como peso seco (g) por litro de medio de cultivo.

2.2.2.a. Determinación de azúcares reductores

La cuantificación de los azúcares reductores permite evaluar la disponibilidad de carbohidratos simples en el medio de cultivo, los cuales representan una fuente directa de carbono metabolizable por el hongo durante su crecimiento. Se determinaron los azúcares reductores al inicio y final de la incubación mediante el método colorimétrico basado en la medición a una longitud de onda de 540 nm del cambio de color del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), cuando este es reducido a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (Miller; 1959). Esta determinación se realizó tomando como referencia una curva patrón de glucosa con concentraciones 0, 0,2, 0,4, 0,8, 1,2,1,6, 2 g/l. Cada muestra (100 µL) se mezcló con 100 µL de reactivo DNS al 1 %, se calentó a 90 °C durante 10 min, se enfrió y se diluyó con 1 mL de agua destilada. Se realizaron las diluciones necesarias para que las mediciones entren dentro de la curva de calibración. Finalmente, se midió la absorbancia de los patrones y las muestras a 540 nm por espectrofotometría (espectrofotómetro Shanghai uv-9000S, China). El contenido de azúcares reductores determinó mediante la Ecuación 7 (Capítulo I) y se expresó como equivalentes de glucosa (g/L de medio de cultivo).

2.2.2.b. Determinación de carbohidratos totales

La determinación del contenido total de carbohidratos brinda información sobre la cantidad global de azúcares, tanto azúcares simples como formas más complejas, presentes en los extractos y medios de cultivo. Este parámetro es clave para estimar el aprovechamiento del sustrato y calcular la eficiencia de conversión fúngica de carbohidratos a biomasa.

Se determinó el contenido de azúcares totales de los extractos obtenidos y del Sabouraud glucosado comercial antes de inocular y luego de la incubación según lo descrito en el ítem 2.2.4.b del Capítulo I (Dubois et al., 1956). Todas las mediciones se realizaron utilizando diluciones apropiadas para mantenerse dentro del rango de la curva de calibración. El contenido de carbohidratos total se determinó mediante la Ecuación 7 (Capítulo I) y se expresó como equivalentes de glucosa (g/L de medio de cultivo). El consumo de carbohidratos se calculó como la diferencia entre la concentración inicial y la final. La eficiencia de conversión fúngica de carbohidratos a micelio se determinó mediante la relación de conversión sustrato-a-micelio, definida como el cociente entre la masa de micelio producida y la cantidad de sustrato consumido.

2.2.2.c. Análisis estadístico

Los datos fueron evaluados mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) y aplicando el test de Tukey para la comparación de las medias, utilizando el software Infostat versión 2020e (Grupo Infostat, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Se utilizó un nivel de significancia de $\alpha=0,05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Evaluación de la desintegración en compost de los materiales de micelio

La Figura 57 muestra el porcentaje de pérdida de peso de los materiales estudiados en función del tiempo. Tanto PM como MMP mostraron patrones de desintegración en dos

fases bien diferenciadas. Durante la primera fase (primer mes), la tasa de desintegración fue mayor alcanzándose valores de pérdida de peso cercanos al 50 % para ambos tipos de materiales. Todas las películas mostraron un comportamiento similar, alcanzando una desintegración de entre el 42 y 48 % durante el primer mes con tasas de pérdida de peso promedio de 1,8, 1,5 y 1,4 %/día para *A. niger*, *M. hiemalis* y *P. nalgiovense*, respectivamente, mientras que los MMP de *A. niger* presentaron una tasa de 1,9 %/día y una desintegración promedio del 53,9 %. Luego del primer mes en compost, se identificó una segunda fase caracterizada por una desaceleración en el ritmo de desintegración tanto para las PM como para los MMP. En las PM la tasa de desintegración disminuyó gradualmente mostrando una tasa de pérdida de peso de aproximadamente 0,6 %/día en todas las especies hasta alcanzar una desintegración de entre 70-72 % tras 77 días. Por su parte los MMP, también mostraron una desaceleración más notoria en el ritmo de desintegración ($\approx 0,1$ %/día) alcanzado una mayor estabilización y amesetamiento de la curva. Luego de 95 días los MMP alcanzaron una desintegración cercana al 60 %.

Este patrón bifásico es común en la biodegradación de biopolímeros y puede atribuirse a la composición heterogénea del micelio. La fase inicial de desintegración acelerada probablemente se deba a la degradación de componentes más fácilmente accesibles para los microorganismos del compost, como proteínas, lípidos y carbohidratos simples, así como a la porción amorfa del biopolímero. La desaceleración posterior de la curva sugiere que los componentes residuales del material corresponden a estructuras químicamente más resistentes (Leppänen et al., 2020; Bher et al., 2022). El micelio está compuesto por una matriz de quitina y glucanos altamente entrecruzada que conforma la pared celular, y estos polímeros complejos requieren una actividad enzimática más especializada y un período prolongado para su completa degradación (Bustillos et al., 2020; Amobonye et al., 2023). Por lo tanto, la segunda fase de desintegración (desaceleración) representa la biodegradación más lenta de estos componentes estructurales. Teniendo en cuenta esto, la mayor pérdida de peso experimentada por las PM pudo deberse a la ruptura celular previa. Esto podría haber facilitado la desintegración de estos haciendo que la segunda fase de desintegración fuese menos amesetada alcanzando una mayor pérdida de peso.

Los resultados obtenidos para las PM después de un mes fueron comparables a los reportados para películas obtenidas por casting de suspensiones acuosas de almidón de mandioca (3 % p/p) y partículas de bagazo (1,5 % p/p) plastificadas con glicerol (25 % p/p), que lograron un 50 % de desintegración después de aproximadamente 33 días en compost (Versino et al., 2019). Además, los resultados obtenidos luego de 45 días fueron comparables a los reportados para películas de celulosa bacteriana de kombucha, fermentada en yerba mate, que mostraron pérdidas de peso del 50 % y 69 % tras 40 y 61 días en compost doméstico de condiciones similares, respectivamente (Ramírez-Tapias et al., 2025). Por otro lado, los MMP de *A. niger* (AE, 25 % p/p Glicerol, 3 h) presentaron una pérdida de peso más rápida que la reportada para los materiales de micelio puro de *Trametes versicolor* y los materiales fúngicos compuestos de *Ganoderma resinaceum* después de 16 semanas de enterramiento en tierra fértil, los cuales alcanzaron pérdidas de peso máximas de 50 % y 43 %, respectivamente (Van Wylick et al., 2022).

La Figura 58 muestra la apariencia de las muestras de PM y MMP durante el transcurso del tiempo de compostaje. En las PM se observó una reducción de tamaño progresiva en las muestras, con una desintegración más marcada luego de los 30 días. Por su parte en los MMP se observó una mayor ruptura del material a partir del día 18, con una desintegración más marcada a los 30 días en concordancia con la pérdida de peso registrada. A partir los 30 días los MMP mostraron una desintegración visualmente similar correspondiéndose con la fase de meseta.

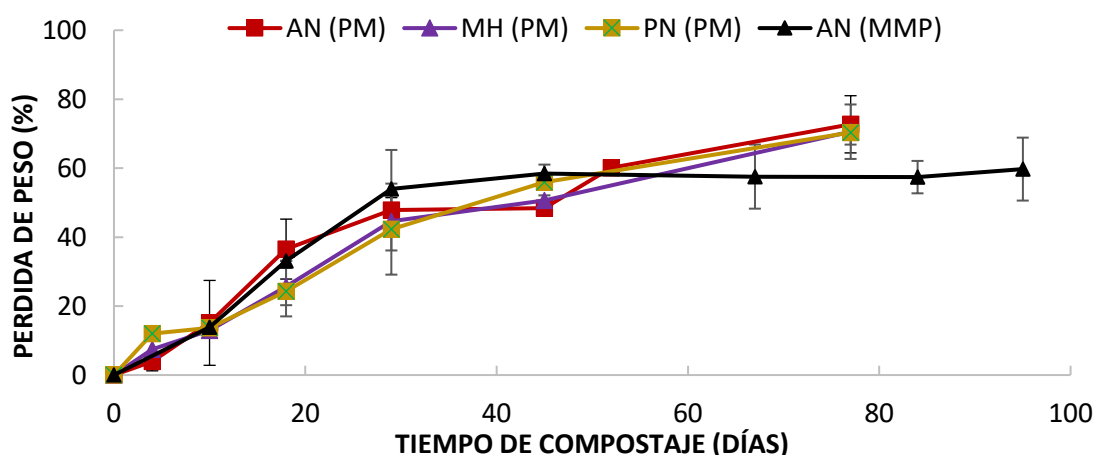


Figura 57. Pérdida de peso gravimétrica (%) de las películas (PM) de *A. niger* (AN), *M. hiemalis* (MH) y *P. nalgiovense* (PN) y de los materiales de micelio puro (MMP) de *A. niger* en función del tiempo de compostaje.



Figura 58. Aspecto visual de las películas de micelio (PM) 15US de *A. niger* (AN), *P. nalgiovense* (PN) y *M. hiemalis* (MH) y de los materiales de micelio puro (MMP) AE de *A. niger* en función del tiempo de compostaje.

3.2. Producción de micelio de *A. niger* en extractos de bagazo cervecero

La Figura 59 (A) muestra el bagazo cervecero (BC) utilizado, antes y después de ser molido y tamizado. El crecimiento de *A. niger* se evaluó en cuatro medios de cultivo: tres preparados a partir de extractos de bagazo cervecero (BC) tratados con diferentes concentraciones de α -amilasa (0 %, 2,5 % y 5 %), y un medio control comercial (caldo Sabouraud glucosado) (Figura 59, B).



Figura 59. A) Bagazo cervecero antes y después de la molienda y tamizaje. B) Medios de cultivo utilizados.

La Tabla 19 presenta las concentraciones de azúcares reductores, carbohidratos totales, producción de micelio, la tasa de conversión sustrato-a-micelio y los valores de pH obtenidos para cada medio de cultivo.

Medio	Micelio (g/L)	AR ₀ (g/L)	AR _f (g/L)	C ₀ (g/L)	C _f (g/L)	C _c (g/L)	Relación sustrato-a- micelio	pH ₀	pH _f
0%E	7,3 ± 0,3 ^{bc}	13,9 ± 0,2 ^c	3,8 ± 0,2 ^a	34,1 ± 2,5 ^a	3,5 ± 0,2 ^a	30,7 ± 2,6	0,24 ± 0,02	5,3 ± 0,1 ^a	2,6 ± 0,1 ^a
2,5%E	9,3 ± 0,5 ^b	20,7 ± 3,6 ^b	2,3 ± 0,3 ^b	32,1 ± 2,1 ^a	3,8 ± 0,4 ^a	28,3 ± 2,1	0,33 ± 0,03	5,8 ± 0,1 ^b	3,7 ± 0,1 ^b
5%E	13,4 ± 2,8 ^a	27,0 ± 2,7 ^a	1,8 ± 0,1 ^c	29,0 ± 3,5 ^a	3,8 ± 0,3 ^a	25,2 ± 3,5	0,53 ± 0,13	5,8 ± 0,1 ^b	4,8 ± 0,1 ^c
Control	4,97 ± 0,2 ^c	20,2 ± 0,3 ^b	1,1 ± 0,1 ^d	20,9 ± 1,1 ^b	1,5 ± 0,1 ^b	19,40 ± 1,1	0,26 ± 0,02	5,8 ± 0,1 ^b	4,8 ± 0,1 ^c

*Diferentes letras en una misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$)

Tabla 19. Resultados de producción de micelio, azúcares reductores (AR), carbohidratos totales (C), consumo de carbohidratos (Cc), relación de conversión de sustrato a micelio y valores de pH del medio de cultivo al inicio (0) y final (f) del período de cultivo de *A. niger* en extractos de bagazo cervicero (BC) y caldo Sabouraud (Control). 0%E: extracto BC con 0 % de enzima; 2,5%E: extracto BC con 2,5 % de enzima; 5%E: extracto BC con 5 % de enzima. Media ± DS.

Todos los extractos enzimáticos de BC mostraron una producción de micelio significativamente mayor que el control comercial. El mayor rendimiento se observó en el medio tratado con 5 % de enzima ($13,4 \pm 2,8$ g/L), alcanzando casi el triple de micelio que el control ($4,97 \pm 0,2$ g/L). Estos valores son consistentes con los reportados en la literatura para *A. niger* cultivado en residuos agroindustriales. Leal et al. (2011) registraron rendimientos de micelio de 8,75 g/L y 15,21 g/L después de 8 días en suero suplementado con nitrógeno (entero e hidrolizado, respectivamente) a 180 rpm, 30 °C y pH 4,1. De manera similar, Hang et al. (1975) obtuvieron 13 g/L tras 7 días de cultivo en extracto de BC bajo condiciones comparables. En contraste, los rendimientos obtenidos en este estudio fueron considerablemente superiores a los reportados por Aregbesola y Omafuvbe (2014), quienes cultivaron *A. niger* en medios de BC con o sin suplementación de glucosa o nitrógeno, bajo fermentación sumergida (120 rpm, 28 °C, 8 días), alcanzando un rendimiento máximo de micelio de solo 1,64 g/L en el medio suplementado con glucosa.

En todos los medios se registró una disminución del pH, reflejando la acidificación típica asociada a la producción de ácidos orgánicos. El descenso fue más pronunciado en el medio con 0 % de enzima (pH final = $2,6 \pm 0,1$), mientras que los medios con 5 % enzima y el control presentaron valores finales similares ($4,8 \pm 0,1$).

Los extractos enzimáticos mostraron concentraciones iniciales significativamente más altas de azúcares reductores que el extracto acuoso, lo cual es consistente con la acción hidrolítica esperada de la α -amilasa sobre los enlaces α -glucosídicos en los polisacáridos presentes en el BC, liberando más azúcares disponibles para el crecimiento fúngico.

El consumo de carbohidratos se calculó como la diferencia en carbohidratos totales entre el inicio y el final del periodo de cultivo (Tabla 19). Todos los medios basados en BC presentaron concentraciones iniciales más altas de carbohidratos totales que el control. Entre todos los tratamientos, la condición con 5 % de enzima alcanzó la mayor conversión sustrato-a-micelio ($0,53 \pm 0,13$ g/g). En contraste, la menor se obtuvo en el extracto sin enzima ($0,24 \pm 0,02$ g/g), a pesar de presentar un consumo de carbohidratos comparable ($30,7 \pm 2,6$ g/L). Esto sugiere que una parte del carbono metabolizado pudo haberse redirigido hacia otros procesos celulares, como el mantenimiento celular o la

producción de metabolitos secundarios, como ácidos orgánicos. Esto se correspondió con un mayor descenso de pH al final de la incubación.

En términos generales, todos los medios de cultivo desarrollaron micelios blancos flotantes que llegaron a cubrir la interfase aire-líquido del recipiente (Figura 60). A partir del sexto día de incubación, los micelios comenzaron a mostrar signos de esporulación, evidenciados por la aparición de esporas negras en su superficie (Figura 61). Los controles (medio Sabouraud glucosado comercial) también presentaron este comportamiento, a diferencia de lo observado en ensayos previos realizados en Erlenmeyer y frascos con mayor volumen de medio bajo condiciones similares de incubación, en los cuales se obtuvieron micelios predominantemente vegetativos (Capítulo III).



Figura 60. Cultivos de *A. niger* en extracto de BC (5 %) bajo condiciones AE tras 5 días de incubación.

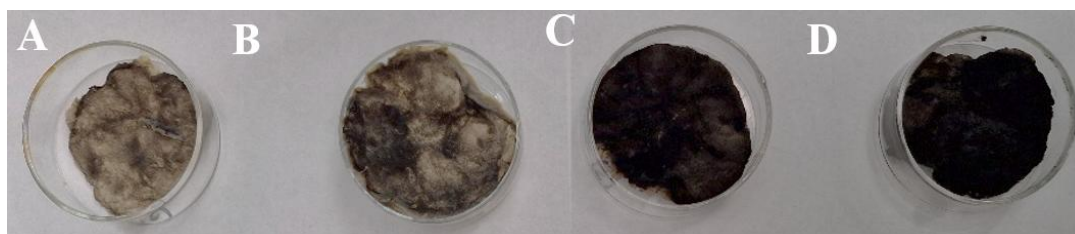


Figura 61. Micelios de *A. niger* obtenidos con diferentes medios de cultivo en condiciones AE: (A): caldo Sabouraud glucosado (Control), (B): extracto BC con 0 % de enzima; (C): extracto BC con 2,5 % de enzima; (D): extracto BC con 5 % de enzima.

Las diferencias observadas entre cultivos en Erlenmeyer (250 mL de medio) y en frascos (40 mL de medio), pese a mostrar una producción de biomasa equivalente, ponen de manifiesto la marcada influencia de los factores físicos del sistema, tales como la geometría del recipiente, el volumen de medio y la disponibilidad de oxígeno disuelto, en el desarrollo de *A. niger*. Estudios previos han demostrado que variaciones en la geometría del recipiente y en la distribución del medio líquido generan cambios significativos en la producción de biomasa y metabolitos, debido a la distinta

disponibilidad de oxígeno, el diámetro de la entrada de aire y la superficie de contacto (Lopez de Leone et al., 2019). Asimismo, se ha reportado que en algunas especies de *Aspergillus* existe una relación estrecha entre la regulación del estrés osmótico y el desarrollo fúngico, pudiendo este tipo de estrés afectar tanto la viabilidad de los conidios como la capacidad de germinación de las esporas (Xue et al., 2004).

En este trabajo, las diferencias entre ambos sistemas de cultivo podrían explicarse por la relación entre el volumen de medio y el área de superficie expuesta al aire. En los frascos con menor volumen, el micelio alcanzó rápidamente la interfase aire-líquido y las paredes, donde la disponibilidad de nutrientes es limitada y pueden generarse condiciones de estrés que favorecen la diferenciación conidial. Por el contrario, en los cultivos en Erlenmeyer, el mayor volumen de medio permitió que mayor parte del micelio permaneciera sumergido, promoviendo así un crecimiento vegetativo.

Por otro lado, la diferencia entre ambos resultados también podría radicar en la eficiencia de la transferencia de oxígeno desde el aire al medio de cultivo. En los Erlenmeyer, la geometría y el mayor volumen de medio podrían haber favorecido una mayor concentración de oxígeno disuelto tras la agitación inicial, lo que propició un desarrollo vegetativo caracterizado por micelio blanco y ausencia de esporulación. En cambio, los frascos con 40 mL de medio, a pesar de recibir la misma agitación inicial, presentaron una menor relación superficie/volumen y una transferencia de oxígeno menos eficiente. Estas condiciones probablemente indujeron una respuesta de estrés, activando la esporulación como mecanismo adaptativo frente a la limitación de nutrientes o de oxígeno (Lopez de Leone et al., 2019). La formación de esporas negras constituye, por lo tanto, un indicador de la transición metabólica desde el crecimiento vegetativo hacia estrategias de supervivencia y reproducción.

En este contexto, el presente trabajo aporta evidencia experimental de cómo pequeñas variaciones en el volumen y en la geometría del recipiente de cultivo pueden inducir cambios sustanciales en el desarrollo morfológico de *A. niger*, aún en condiciones equivalentes de inoculación y nutrientes. Estos resultados resaltan la importancia de considerar no solo la composición del medio, sino también la geometría y dinámica del sistema de cultivo, al momento de diseñar condiciones para la obtención de micelio fúngico.

Los resultados obtenidos demuestran que los extractos de BC, tratados o no con α -amilasa, permitieron una buena producción de micelio y una utilización eficiente de carbohidratos, lo que valida su potencial como medio de cultivo de bajo costo. En general, los resultados respaldan la integración de la producción de micelios de *A. niger* con la valorización de residuos agroindustriales como una alternativa viable para el desarrollo de materiales sostenibles y compostables, que podrían tener aplicaciones como sustitutos del cuero, textiles o envases.

4. REFERENCIAS

- Amobonye A., Lalung j., Kumar Awasthi M., Pillai S. (2023) Fungal mycelium as leather alternative: A sustainable biogenic material for the fashion industry, *Sustainable Materials and Technologies*, Volume 38, e00724, ISSN 2214-9937, <https://doi.org/10.1016/j.susmat.2023.e00724>.
- Aregbesola, O. A., y Omafuvbe, B. O. (2014) Production of *Aspergillus niger* biomass from aqueous extract of brewer's spent grain. *Ife Journal of Science*, 16(3), 527–532. "https://www.researchgate.net/publication/352150203.
- Bher A., Mayekar P.C., Auras R.A., Schvezov C.E. (2022) Biodegradation of Biodegradable Polymers in mesophilic Aerobic Environments. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 12165. <https://doi.org/10.3390/ijms232012165>.
- Bustillos J., Loganathan A., Agrawal R., Gonzalez B.A, Perez M.G., Ramaswamy S., Boesl B., Agarwal A. (2020) Uncovering the mechanical, thermal, and chemical characteristics of biodegradable mushroom leather with intrinsic antifungal and antibacterial properties. *ACS Appl Bio Mater* 3:3145–3156. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c00164>.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28, 3, 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>.
- Hang, Y. D., Splittstoesser, D. F., y Woodams, E. E. (1975) Utilization of brewery spent grain liquor by *Aspergillus niger*. *Applied microbiology*, 30(5), 879–880.

- Leal D., Pico Y., Castro J., Guerra J., y Castro G. (2011) III. Producción de ácido cítrico a partir de suero lácteo entero e hidrolizado con *Aspergillus niger*, por vía fermentativa. Revista Alimentos Hoy. Vol 19, No 19. ISSN 2027-291X.
- Leppänen I., Vikman M., Harlin A. (2020) Enzymatic Degradation and Pilot-Scale Composting of Cellulose-Based Films with Different Chemical Structures. J Polym Environ 28:458–470. <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01621-w>.
- Lopez De Leon L., Caceres I., Bornot J., Choque E., Raynal J., Taillandier P., Mathieu F. (2019) Influence of culture conditions on production of NGPs by *Aspergillus tubingensis*. J Microbiol Biotechnol 29:1412–1423. <https://doi.org/10.4014/jmb.1905.05015>.
- Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Anal. Chem. 1959, 31, 426–428.
- Pitt, J. I. y Hocking, A. D. (2009) Fungi and food spoilage. Springer Dordrecht Heidelberg. ISBN 978-0-387-92206-5. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>.
- Ramírez Tapias, Y.A., Peltzer, M.A, Salvay, A.G. (2025) Compostaje doméstico y desintegración de películas de celulosa de kombucha fermentada en yerba mate. XVI SIMPOSIO ARGENTINO DE POLÍMEROS (SAP 2025)
- Silbert Voldman, V.; Campitelli, P.; Suárez, M. F.; Garrido, G. (2018) Manual de buenas prácticas para producir compost hogareño. Instituto Nacional de Tecnología Industrial ISBN 978-950-532-383-8.
- Van Wylick A., Elsacker E., Yap L.L., Peeters E., de Laet L. (2022) Mycelium Composites and their Biodegradability: An Exploration on the Disintegration of Mycelium-Based Materials in Soil. Construction Technologies and Architecture 2022. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/cta.1.652>.
- Versino, F. Urriza M. and García M.A. (2019) Eco-compatible cassava starch films for fertilizer controlled-release, International Journal of Biological Macromolecules, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.037>.
- Xue, T., Nguyen C.K., Romans A., May G.S. (2004) A mitogen activated protein kinase that senses nitrogen regulates conidial germination and growth in *Aspergillus fumigatus*. J. Eukaryotic Cell 3: 557-560.

CONCLUSIONES



En el presente trabajo se estudió el uso de micelio de hongos filamentosos para la obtención de materiales, evaluando tanto su capacidad para obtener películas (PM) a partir de dispersiones filmogénicas como para conformar materiales de micelio puro (MMP).

Las especies evaluadas demostraron capacidad de crecimiento tanto en cultivo sumergido como en medio sólido, aunque con rendimientos y morfologías diferentes. Si bien la producción de biomasa fúngica fue mayor en medio sólido, la dificultad para su recuperación motivó que, en este estudio, se optara por emplear el cultivo sumergido como fuente de biomasa. Para la obtención de dispersiones filmogénicas se seleccionaron las cepas de *A. niger*, *P. nalgiovense*, y *M. hiemalis* cultivadas en medio líquido bajo agitación. La composición de la biomasa mostró una marcada dependencia de la cepa fúngica, lo que se reflejó en las características de las dispersiones obtenidas. Todas las cepas seleccionadas permitieron obtener dispersiones filmogénicas homogéneas, demostrando que los tratamientos de ruptura celular favorecen la liberación de los componentes responsables de la formación de películas.

Todas las dispersiones fueron capaces de formar películas homogéneas, excepto las de *P. nalgiovense* provenientes de dispersiones tratadas con 15 min de ultrasonido (US), que presentaron sutiles zonas de heterogeneidad. Los diferentes tratamientos de ruptura celular no impactaron considerablemente en el color ni en la opacidad de las películas de cada hongo. Las películas obtenidas a partir de *M. hiemalis* se destacaron por la mayor luminosidad, tendencia al amarillo y opacidad, mientras que las de *A. niger* y *P. nalgiovense* mostraron tonalidades marrones y mayor transparencia. Los espectros de FTIR mostraron mayor similitud entre PN y AN que con MH, correlacionándose con su composición.

Los resultados del ensayo de tracción uniaxial obtenidos en las películas fueron comparables con los reportados en bibliografía para películas biobasadas plastificadas. En términos generales, las películas obtenidas a partir de *A. niger* presentaron la mayor resistencia (TS) y rigidez (YM), seguidas por las de *P. nalgiovense*, que mostraron un comportamiento intermedio con una mayor elongación, mientras que las de *M. hiemalis* fueron más frágiles y menos resistentes. Estos resultados se correlacionaron con los análisis realizados mediante AFM.

Los análisis TGA de las películas obtenidas con distintos tratamientos de ruptura, así como de la biomasa sin tratar (control), mostraron perfiles de degradación múltiple con diferentes zonas de degradación. Las películas de *A. niger* y *M. hiemalis* obtenidas con 15 minutos de US y un tratamiento de homogeneización (UT) intermedio con mostraron una temperatura de degradación inicial (T_0) promedio más alta, indicando una mayor estabilidad térmica. Los valores de permeabilidad al vapor de agua obtenidos para las películas de *A. niger* y *P. nalgiovense* fueron similares entre sí, mientras que las películas derivadas de *M. hiemalis* presentaron valores más elevados, aunque no directamente comparables debido a su mayor espesor. En conjunto, las películas de micelio (PM) mostraron propiedades fuertemente dependientes de la cepa fúngica, sin grandes diferencias entre los tratamientos de ruptura, siendo el de 15 min de US el más adecuado por su menor demanda de recursos y tiempo. Las PM desarrolladas podrían tener aplicaciones en las industrias alimentaria, cosmética y medicinal.

Fue factible obtener MMP de *M. ruber*, *A. niger* y *P. nalgiovense* con características dependientes de la cepa fúngica y de las condiciones de cultivo utilizadas. La condición de cultivo AE resultó la más adecuada para la obtención de MMP a partir de *A. niger* y *P. nalgiovense*. En el caso de *M. ruber*, las condiciones E y AE generaron micelios con características similares; por este motivo se seleccionó la condición E, que presentaba la ventaja de no requerir agitación, reduciendo así el equipamiento necesario para el proceso. La plastificación por inmersión en glicerol no solo protegió los MMP frente a la contaminación, sino que también redujo su deshidratación, permitiendo conservar la maleabilidad por mayor tiempo. Un protocolo de plastificación con glicerol de 3 h resultó adecuado para lograr dicho efecto. En general, el agregado de glicerol redujo la resistencia a la tracción (TS) y el módulo de Young (YM) en todos los casos, pero aumentó de forma significativa la elongación a la rotura (EB), logrando materiales más dúctiles y menos frágiles. Los MMP de *A. niger* presentaron la mayor elongación. No se observaron diferencias significativas entre ambas concentraciones de glicerol evaluadas (25 y 50 % p/p). Se obtuvieron MMP de color blanco-beige para *A. niger* y *P. nalgiovense* y rojizos para *M. ruber*. Este último produjo pigmentos característicos que otorgaron propiedades cromáticas distintivas a los MMP, aunque sin efectos antioxidantes o

antimicrobianos significativos. Los MMP desarrollados podrían tener usos en la industria textil como sustitutos de materiales como el cuero.

Tanto las PM como los MMP conservaron sus características iniciales durante períodos prolongados, sin signos de contaminación microbiana, probablemente debido a su baja actividad de agua.

Se vincularon dos ejes fundamentales para la sostenibilidad de los materiales desarrollados: la desintegración en compost doméstico y la valorización del subproducto bagazo cervecero como sustrato de cultivo. Los ensayos de desintegración confirmaron que tanto las PM como los MMP presentaron un comportamiento biodegradable en condiciones de compostaje doméstico, alcanzando pérdidas considerables de masa en los tiempos estudiados. Además, se demostró la factibilidad de emplear extractos de bagazo cervecero como sustrato viable y de bajo costo para la producción de micelio de *A. niger* en cultivo sumergido, obteniéndose rendimientos superiores a los del medio Sabouraud glucosado comercial. La hidrólisis enzimática con α -amilasa incrementó la disponibilidad de carbohidratos y mejoró la eficiencia de conversión sustrato-a-micelio.

Los estudios realizados proporcionan información relevante sobre el impacto de las condiciones de cultivo y de la cepa fúngica en las propiedades de los materiales obtenidos. Se demostró que los hongos filamentosos *A. niger*, *M. hiemalis*, *P. nalgiovense* y *M. ruber* constituyen fuentes versátiles e innovadoras de biomasa para la formación de materiales biodegradables y compostables.

En síntesis, los resultados alcanzados en esta tesis confirman la factibilidad de desarrollar materiales fúngicos sostenibles como alternativa a los plásticos convencionales. Sin embargo, persisten desafíos vinculados con la optimización de propiedades mecánicas, y la exploración de posibles aplicaciones, las cuales deberán abordarse en investigaciones futuras.

PERSPECTIVAS FUTURAS



A partir de los resultados obtenidos, se identifican diversas líneas de trabajo que podrían orientar el avance del campo de los materiales fúngicos.

En primer lugar, resulta necesario profundizar en la optimización de las propiedades mecánicas de los materiales desarrollados. En el caso de las películas, estrategias como la incorporación de refuerzos naturales, por ejemplo, la nanocelulosa (vegetal o bacteriana) y/o la mezcla con otros biopolímeros (almidón, dextrano de kéfir de agua) podrían mejorar su desempeño en aplicaciones específicas (Lago, 2020; Rajeswari et al., 2021). Por su parte, las propiedades mecánicas de los MMP podrían adaptarse a través de la evaluación de distintos sustratos y tiempos de cultivo, así como la incorporación de fibras naturales (Manan et al., 2021). Asimismo, se podría estudiar la posibilidad de mejorar la resistencia a la tracción del material mediante la aplicación de tratamientos superficiales, como recubrimientos con ácido poliláctico (PLA), tal como es el caso de los productos de micelio desarrollados por Mycoworks (Elsacker 2023; Crawford et al., 2024).

Por otro lado, la evaluación de la desintegración deberá ampliarse a protocolos estandarizados internacionales, considerando tanto compostaje industrial como doméstico, y evaluando además la calidad del compost generado.

Otra línea de trabajo relevante es la exploración de nuevos sustratos agroindustriales para la obtención de biomasa fúngica, como el suero de leche o los residuos de la industria vitivinícola, con el objetivo de reducir costos de producción y promover procesos más sostenibles.

Además, para aprovechar su mayor producción de biomasa, sería conveniente evaluar estrategias de separación y recuperación de micelio en cultivos sólidos, como aquellas reportadas por Crawford et al. (2024) quienes emplearon un medio de cultivo de tipo pasta a base de harina de trigo integral, que permitió prescindir de técnicas de cosecha laboriosas facilitando la recolección del material de micelio. Las muestras se separaron del sustrato utilizando una espátula y se enjuagaron cuidadosamente con agua para eliminar el exceso de pasta.

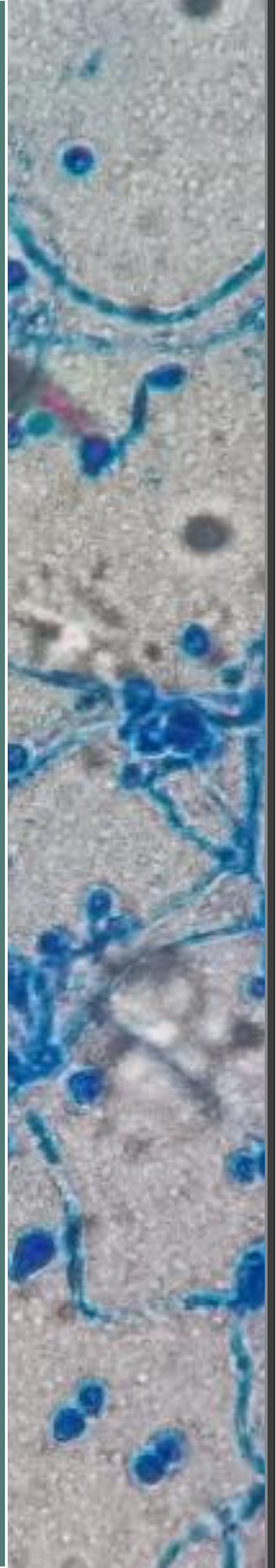
Durante la producción de los MMP de *Monascus ruber* se observó la presencia de pigmentos rojos remanentes en los medios de cultivo. Considerando la creciente

demanda de colorantes naturales en reemplazo de los sintéticos, estos compuestos podrían representar un subproducto valioso. En este sentido, futuras investigaciones podrían centrarse en la recuperación, caracterización y aplicación de estos pigmentos, contribuyendo así a la valorización integral del proceso.

Referencias:

- Crawford, A., Miller, S. R., Branco, S., Fletcher, J., y Stefanov, D. (2024) Growing mycelium leather: A paste substrate approach with post-treatments. *Research Directions: Biotechnology Design*, 2, e6. <https://doi.org/10.1017/btd.2024.6>.
- Elsacker E., Vandeloock S., Peeters E. (2023) Recent technological innovations in mycelium materials as leather substitutes: a patent review, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 11, 1204861, <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1204861>.
- Lago, A. (2020) Materiales biodegradables multicomponentes, elaborados a base de la biomasa de kéfir de agua y levadura, con el agregado de té de Kombucha: formulación y caracterización (Trabajo Final de Carrera de Ingeniería en Alimentos), Universidad Nacional de Quilmes.
- Manan, S., Ullah, M. W., Ul-Islam, M., Atta, O. M., y Yang, G. (2021) Synthesis and applications of fungal mycelium-based advanced functional materials. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, 6(1), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.jobab.2021.01.001>.
- Rajeswari, A., Christy, J., y Pius, A. (2021) Chapter 5 -*Biopolymer blends and composites: Processing* (pp. 105-147). En *Biopolymers and their industrial applications*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819240-5.00005-5>.

ANEXOS



ANEXO I: MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

CONCENTRADO CZAPEK (Pitt y Hocking, 2009)

NaNO ₃	30 g
KCl	5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
Agua, destilada	100 mL

El concentrado de Czapek se mantendrá indefinidamente sin esterilización. El precipitado de Fe(OH)₃ que se forma con el tiempo se puede re suspender agitando antes de su uso.

AGAR CZAPEK EXTRACTO DE LEVADURA (CYA) (Pitt y Hocking, 2009)

K ₂ HPO ₄	1 g
Concentrado Czapek	10 mL
Solución de Metales Traza	1 mL
Extracto de Levadura	5 g
Sacarosa	30 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min. El pH final es 6,7.

AGAR NITRATO 25% GLICEROL (GN25) (Pitt y Hocking, 2009)

K ₂ HPO ₄	0,75 g
Concentrado Czapek	7,5 mL
Extracto de levadura	3,7 g
Glicerol, grado analítico	250 g
Agar	12 g
Agua, destilada	750 mL

El glicerol para G25N debe ser de alta calidad, con un bajo contenido de agua (1 %). Si se usa un grado más bajo, se debe tener en cuenta el agua adicional. Esterilizado en autoclave a 121 °C durante 15 min. El pH final es 7,0.

AGAR EXTRACTO DE MALTA (MEA) (Pitt y Hocking, 2009)

Extracto de Malta	20 g
Peptona	1 g
Glucosa	20 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 mL

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min. El pH final es 5,6.

AGAR DICLORAN CLORANFENICOL EXTRACTO DE MALTA (DCMA) (Pitt y Hocking, 2009)

Extracto de malta	10 g
Dicloran (0,2 % p/v e PeqN n etanol, 1 ml)	2m g
Cloranfenicol 0,1g	0,1 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

Esterilizado en autoclave a 121 °C durante 15 min. El pH final es 5,5-5,6.

CALDO SABOURAUD GLUCOSADO MODIFICADO (CSGM)

Dextrosa	20 g
Hidrolizado de caseína	5 g
Peptona de carne	5g
Agua destilada	1000 mL

Para la preparación del medio Agar Sabouraud glucosado agregar agar al 2 % p/p (ASDM)

SABOURAUD GLUCOSADO CALDO (Britania[®])

Tripteína	5 g
Peptona de carne	5 g
Glucosa	20 g
Agua destilada	1000 mL

Esterilizado en autoclave a 121 C durante 15 min. El pH final es: 5.6 ± 0.2

Para la preparación del medio Agar Sabouraud glucosado agregar agar al 2 % p/p.

AGAR PAPA DEXTROSA (PDA) (OXOID)

Dextrosa	20 g
Extracto de papa	4 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

Esterilizado en autoclave a 121 C durante 15 min. El pH final es 5,6.

Para la preparación del medio Agar papa dextrosa agregar agar al 2 % p/p.

AGAR NUTRITIVO

Caldo nutritivo	8 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

COLORANTE AZUL DE LACTOFENOL (AZUL DE ALGODÓN)

Ácido láctico	250 g
Azul de anilina o azul de metilo	1 g
Glicerina	500 g
Fenol	250 g
Agua destilada	250 mL

Se disuelve el fenol en el agua previamente entibiada. Se adiciona el ácido láctico y la glicerina, y se mezcla muy bien. Por último, se disuelve el azul de anilina. Se mezcla nuevamente y está listo para su uso.

❖ **Referencias**

- Pitt, J. I. y Hocking, A. D. (2009) Fungi and food spoilage. Springer Dordrecht Heidelberg. ISBN 978-0-387-92206-5. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>

ANEXO II: RECuento EN CÁMARA DE NEUBAUER

La cámara de Neubauer es un instrumento utilizado en microbiología para realizar el recuento de esporas y células en un medio líquido. Consiste en una placa gruesa de cristal con forma de portaobjetos, de unos 30 x 70 mm y unos 4 mm de grosor. Las más comunes son las de doble cámara donde existen 2 zonas de conteo, una superior y otra inferior al eje longitudinal de la cámara (Figura 62, a). En la parte central de cada cámara se encuentra grabada una retícula cuadrada de 3 mm de lado subdividida en 9 cuadrados de 1mm de lado cada uno. El cuadrado central se divide en 25 cuadrados medianos de 0,2 mm de lado, y cada uno de estos se subdivide a su vez en 16 cuadrados pequeños (Figura 62, A y B).

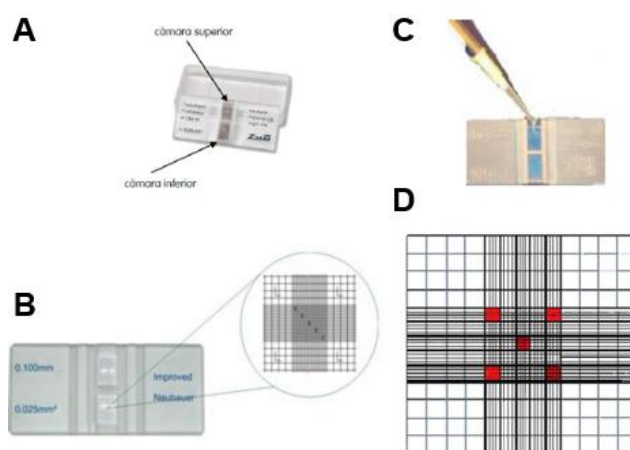


Figura 62. A) Cámara de Neubauer comercial; B) Detalle de la rejilla de una cámara de Neubauer; C) Introducción de la muestra en la cámara de Neubauer; D) Área donde se realiza el recuento: los conidios se cuentan en los espacios indicados en rojo.

Para el recuento de conidios/ml de la suspensión de uso se procedió de la siguiente manera:

Se llenó la cámara con la suspensión de conidios y se observó con un microscopio Nikon modelo Eclipse E200 utilizando el objetivo de 40X. Se contó el número de conidios en 5 cuadrículas representativas de las 25 totales (Figura 62 D) y se los sumó. Se reemplazó este resultado (X) en la siguiente fórmula para obtener la concentración final de conidios/ml:

$$\text{Concentración final de conidios/ml: } \frac{X \times 25 \times 10^4}{5} \quad (\text{Ecuación 14})$$

