



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA



CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Tema: Obtención de un medio enriquecido en proteínas a partir de residuos de papa
(*Solanum tuberosum*) por fermentación microbiana

Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autora: Denise Ivone Apunte Benalcázar

Tutora: Lcda. MSc. Danae Fernández Rivero

Ambato – Ecuador

Agosto 2019

APROBACIÓN DEL TUTOR

Lcda. MSc. Danae Fernández Rivero

CERTIFICA

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, de la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, 27 de junio de 2019.



Lcda. MSc. Danae Fernández Rivero

C.I. 175718120-9

TUTORA

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Denise Ivone Apunte Benalcázar, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Bioquímica, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Denise Ivone Apunte Benalcázar

C.I. 100397657-6

AUTORA

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman



Presidente del tribunal



MSc. Wilson Patricio Orozco Freire

C.I. 172136300-8



MSc. Paulo Santiago Baquero Icaza

C.I. 180323354-1

Ambato, 30 de julio de 2019.

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Proyecto de Investigación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Denise Ivone Apunte Benalcázar

C.I. 100397657-6

AUTORA

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación se lo dedico principalmente a Dios por ser quien me da la vida y la fuerza necesaria cada día para lograr mis sueños. A mis padres y a mi hermano, porque ellos han sabido darme palabras de aliento, brindarme un consejo cuando lo he necesitado y sobre todo me han enseñado que en la vida siempre tiene que prevalecer la humildad y el respeto hacia los demás a pesar de todos los logros que se puedan obtener, con todo el amor y apoyo incondicional ellos permitieron que logre finalizar mi carrera profesional. A mi abuelito que, aunque ya no está presente sé que siempre me ha mandado sus bendiciones, la confianza que él tenía en mí y el saber que todo lo que yo me proponga lo iba a lograr, hoy se ve reflejado. A mi abuelita porque ella ha sido mi ejemplo a seguir, me ha demostrado que a pesar de los obstáculos que se puedan presentar siempre se debe luchar por lo que uno desea. A toda mi familia quienes han sido el motor fundamental de mi vida y me han motivado a seguir adelante durante el desarrollo de todo este trabajo para poder alcanzar una de mis más anheladas metas. Dedico este trabajo de investigación también a todos los docentes quienes fueron parte de esta etapa y me ayudaron a realizarme profesionalmente.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a Dios y a mis padres porque gracias a ellos he llegado hasta este momento tan significativo en mi vida como es mi formación profesional.

Agradezco a todos los docentes de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, en especial a mi tutora de tesis, la Lcda. MSc. Danae Fernández Rivero y también al Dr. Orestes López, porque ellos ha sido el pilar fundamental en el desarrollo de mi tesis, gracias a todos los conocimientos que me han brindado y a su apoyo incondicional he logrado culminar este trabajo de investigación. Gracias por su paciencia y por cada una de sus palabras porque gracias a eso hoy en día he crecido tanto como persona y profesionalmente.

Agradezco a la Dra. Jaqueline Ortiz, decana de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología por promover la investigación para que nuestra facultad sea la mejor a nivel académico.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABLAS	X
ÍNDICE DE ECUACIONES.....	X
ÍNDICE DE ANEXOS.....	X
RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO I	4
EL PROBLEMA.....	4
1.1. Tema de investigación.....	4
1.2. Justificación.....	4
1.3. Objetivos	6
1.3.1. Objetivo general	6
1.3.2. Objetivos específicos.....	6
CAPÍTULO II.....	7
MARCO TEÓRICO.....	7
2.1. Antecedentes investigativos	7
2.1.1. Descripción de <i>Solanum tuberosum</i>	7
2.1.2. Perfil nutricional de <i>Solanum tuberosum</i>	8
2.1.3. Microorganismos utilizados para enriquecimiento proteico de sustratos	9
2.1.4. Fermentaciones utilizando hongos.....	9
2.1.5. Métodos para la estimación del crecimiento microbiano y enriquecimiento proteico... ..	10
2.2. Hipótesis.....	11
2.2.1. Hipótesis nula.....	11
2.2.2. Hipótesis alternativa	11
2.3. Señalamiento de las variables de la hipótesis	11
2.3.1. Variables dependientes	11
2.3.2. Variables independientes.....	12
CAPÍTULO III.....	13
MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1. Materiales, equipos y reactivos.....	13
3.1.1. Materiales	13
3.1.1.1. Material Vegetal	13
3.1.1.2. Material Biológico.....	13
3.1.1.3. Material de Laboratorio	13

3.1.2. Equipos.....	13
3.1.3. Reactivos	14
3.2. Métodos.....	14
3.2.1 Obtención del sustrato	14
3.2.2. Caracterización fisicoquímica del sustrato	14
3.2.2.1. Determinación del pH.....	14
3.2.2.2. Determinación del porcentaje de humedad	15
3.2.2.3. Determinación del porcentaje de almidón	15
3.2.2.4. Determinación de la concentración de proteínas.....	15
3.2.3. Caracterización macroscópica y microscópica del <i>Aspergillus niger</i>	16
3.2.4. Obtención del medio enriquecido en proteínas	16
3.2.4.1. Determinación de la concentración de biomasa y proteínas	16
3.2.5. Determinación de los parámetros cinéticos de la fermentación	17
3.2.5.1. Determinación de la velocidad específica de crecimiento	17
3.2.5.2. Determinación del tiempo de duplicación	18
3.2.5.3. Determinación del rendimiento biomasa/sustrato	18
3.2.6. Análisis estadístico	18
CAPÍTULO IV.....	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
4.1. Análisis y discusión de resultados	19
4.1.1. Caracterización fisicoquímica del sustrato	19
4.1.2. Caracterización macroscópica y microscópica del <i>Aspergillus niger</i>	20
4.1.3. Obtención del medio enriquecido en proteínas	22
4.1.4. Determinación de los parámetros cinéticos	25
4.2. Verificación de la hipótesis	29
CAPÍTULO V.....	30
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	30
5.1. Conclusiones	30
5.2. Recomendaciones.....	31
BIBLIOGRAFÍA	32
ANEXOS	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta y tubérculo de la variedad superchola	7
Figura 2. Tubérculos de la variedad de papa única.....	8
Figura 3. Tubérculos de la variedad chola.....	8
Figura 4. Reacción de Biuret.....	11
Figura 5. Diagrama de Pareto Estandarizado para la concentración de proteína	22
Figura 6. Gráfico de Efectos Principales para la concentración de proteína	22
Figura 7. Diagrama de Pareto Estandarizado para la concentración de biomasa	23
Figura 8. Gráfico de Efectos Principales para la concentración de biomasa.....	24
Figura 9. Diagrama de Superficie de Respuesta Estimada	24
Figura 10. Curva de crecimiento del <i>Aspergillus niger</i>	25
Figura 11. Fase exponencial del crecimiento del <i>Aspergillus niger</i>	27
Figura 12. Estructura de la molécula de amilosa	28
Figura 13. Estructura de la molécula de amilopectina.....	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización fisicoquímica del sustrato	19
Tabla 2. Caracterización macroscópica del <i>Aspergillus niger</i>	20
Tabla 3. Caracterización microscópica del <i>Aspergillus niger</i>	21
Tabla 4. Valores óptimos de concentración de proteínas y concentración de biomasa.....	24
Tabla 5. Parámetros cinéticos del microorganismo en el medio optimizado	26

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Velocidad específica de crecimiento.....	17
Ecuación 2. Tiempo de duplicación	18
Ecuación 3. Rendimiento biomasa/sustrato	18

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. <i>Aspergillus niger</i> (Caracterización macroscópica).....	38
Anexo 2. <i>Aspergillus niger</i> (Caracterización microscópica)	38
Anexo 3. Preparación de los medios	38
Anexo 4. Inoculación del microorganismo al medio	39
Anexo 5. Proceso de fermentación de los medios	39
Anexo 6. Curva patrón de glucosa	39

Anexo 7. Curva patrón de Albúmina de suero bovino.....	40
Anexo 8. Muestras para realizar la curva de glucosa y albúmina	40
Anexo 9. Análisis de varianza del porcentaje de almidón	40
Anexo 10. Análisis de varianza para la concentración de proteínas	41
Anexo 11. Análisis de varianza para la concentración de biomasa.....	41
Anexo 12. Valores obtenidos de la concentración de biomasa	41

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación para obtener un medio enriquecido en proteínas por fermentación microbiana, se realizó la caracterización fisicoquímica de los residuos domésticos de papa (*Solanum tuberosum*), para esto se determinó: pH, porcentaje de humedad, porcentaje de almidón y concentración de proteína en las variedades superchola, chola y única. Mediante un diseño completamente al azar se pudo comprobar que no existió diferencia significativa entre las tres variedades de papa en cuanto al porcentaje de almidón. Se caracterizó macroscópicamente y microscópicamente al *Aspergillus niger*, microorganismo aislado por estudiantes de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología a partir de sustratos orgánicos de limón, para posteriormente utilizarlo en la fermentación microbiana con los residuos domésticos caracterizados. En la investigación se formularon 4 medios, mediante un diseño Factorial 2^2 se determinó la influencia de los factores humedad (61% y 93%) y composición del medio (sin sales y con sales) sobre las variables respuestas: concentración de proteínas y concentración de biomasa, obteniendo valores óptimos de 15,91 mg/ml y de 0,79 g/ml respectivamente, en el medio formulado sin sales y con una humedad del 61%. Se determinaron los parámetros cinéticos del microorganismo en el medio optimizado obteniendo como resultados una velocidad específica de crecimiento $\mu = 0,016 h^{-1}$, un tiempo de duplicación $t_d = 43,08 h$ y un rendimiento $Y_{x/s} = 4,49 g$ de biomasa/mg de sustrato consumido.

Palabras claves: residuos domésticos, *Aspergillus niger*, fermentación microbiana, *Solanum tuberosum*, enriquecimiento proteico.

ABSTRACT

In the present work of investigation to obtain a half enriched in proteins by microbial fermentation, the physicochemical characterization of the domestic residues of potato was carried out (*Solanum tuberosum*), for this it was determined: pH, percentage of humidity, percentage of starch and concentration of protein in the superchola, chola and única varieties. By means of a completely random design it was possible to verify that there was no significant difference between the three potato varieties in terms of the percentage of starch. It was characterized macroscopically and microscopically to *Aspergillus niger*, microorganism isolated by students of the Faculty of Science and Engineering in Food and Biotechnology from organic substrates of lemon, to later use it in the microbial fermentation with the domestic waste characterized. In the research 4 media were formulated, by means of a Factorial design 2^2 the influence of the humidity factors (61% and 93%) and composition of the medium (without salts and salts) on the variable responses was determined: concentration of proteins and concentration of biomass, obtaining optimum values of 15,91 mg/ml and 0,79 g/ml respectively, in the medium formulated without salts and with a humidity of 61%. The kinetic parameters of the microorganism in the optimized medium were determined, obtaining as a result a specific growth speed $\mu = 0,016 h^{-1}$, a doubling time $t_d = 43,08 h$ and a yield $Y_{x/s} = 4,49$ g of biomass/mg of substrate consumed.

Key words: domestic waste, *Aspergillus niger*, microbial fermentation, *Solanum tuberosum*, protein enrichment.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad se generan miles de toneladas de residuos sólidos vegetales diariamente debido al incremento de la población y el consumo actual de alimentos, esto hace que dichos residuos requieran de un amplio espacio para su biodegradación natural causando grandes problemas al medio ambiente, es por este motivo que se crea un interés de convertir estos residuos en bioproductos, desarrollando así tecnologías que disminuyan los grandes volúmenes de estos residuos en los rellenos sanitarios (Torres, 2013).

La industria de alimentos busca crear nuevos productos tanto para los humanos como para los animales, pero en muchos casos esto resulta algo complejo debido a los altos costos de producción. La biotecnología es un campo que se encuentra en desarrollo y presenta varias aplicaciones, una de ellas es transformar estos residuos en productos de alto valor agregado (Arguero, 2014).

Uno de los componentes alimenticios más escasos y costosos son las proteínas, por lo tanto, los problemas de abastecimiento de proteína hacen necesaria la indagación de nuevas alternativas. Una de las alternativas de producción proteica son las proteínas de origen microbiano o proteínas unicelulares PUC o SCP (por sus siglas en inglés, single-cell protein), proteínas producidas mediante fermentación controlada. Las proteínas de origen microbiano se pueden obtener a partir de residuos agroindustriales, dentro de estos se encuentran los desechos de papa. Una forma de valorizar estos residuos es mediante enriquecimiento proteico producto de la fermentación en estado sólido (FES) (Oviedo, et al., 2016).

La gran cantidad de residuos que se generan en Ecuador, el bajo costo y el escaso aprovechamiento industrial, hace posible la utilización de estos residuos como materia prima para la elaboración de proteínas unicelulares, cuidando así al medio ambiente y evitando contaminación del mismo. La papa es el cuarto cultivo más importante a nivel mundial y el más consumido en la Región Andina del Ecuador (Gerena, 2013).

En el presente trabajo de investigación se utilizó como residuos, las cáscaras de papa, para la producción de proteína unicelular por fermentación microbiana.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1. Tema de investigación

“Obtención de un medio enriquecido en proteínas a partir de residuos de papa (*Solanum tuberosum*) por fermentación microbiana”

1.2. Justificación

Los residuos sólidos vegetales provenientes de fuentes domésticas, comerciales, industriales y de cosecha son generados a diario, por lo tanto, en la actualidad estos residuos son objeto de estudio para la producción de proteínas, aminoácidos, productos químicos y almidón. La biotecnología industrial brinda el conocimiento necesario para aprovechar al máximo estos residuos (Torres, 2013).

Debido a la demanda de alimentos ricos en proteínas, la industria alimentaria y agrícola busca productos que puedan obtenerse en cantidades suficientes y en el menor tiempo posible para la formulación de los mismos a partir de proteínas (Fontes, et al., 2015).

Según Gerena (2013), la papa (*Solanum tuberosum*) es el cuarto cultivo más importante a nivel mundial, esto es debido a las propiedades nutricionales y a su fácil crecimiento. Este tubérculo contiene un porcentaje de almidón en el rango de 8,67 a 22,72%, aproximadamente 2,1% de proteína, vitamina C, una de las vitaminas del complejo B y varios minerales, lo que ha convertido a este cultivo en uno de los más importantes para la alimentación.

Tungurahua presenta aproximadamente 2,641 hectáreas cultivadas con este tubérculo, los cantones de esta provincia que más cultivan son: Quero, Píllaro, Ambato, Pelileo Tisaleo y Mocha. La mayoría de las variedades sembradas son: ‘Superchola’, ‘Fripapa’, ‘Única’ y ‘Putza’ (El Herald, 2017).

Según el INEC (2018), los residuos sólidos son sustancias resultantes del consumo o uso de un bien tanto en actividades domésticas, industriales, comerciales, institucionales o de servicios. Cada habitante del Ecuador produce en promedio alrededor de 0,58 kilogramos de residuos sólidos y la recolección de toneladas diarias de residuos sólidos en promedio fue de 12.897,98 en el año 2016.

El 80% de la producción nacional de papa se comercializa para consumo doméstico, en los restaurantes, el mayor uso que se le da es como papa frita y en sopas. Otra forma de uso en estos locales es en puré, ensaladas y tortillas, de esta forma se desechan grandes cantidades de este tubérculo (Saragocin, 2015).

La producción de proteína unicelular se considera necesario para el aprovechamiento de desechos enriquecidos en carbohidratos, siendo el principal factor limitante en la generación de dicha proteína el alto costo de las fuentes de carbono, por lo que utilizar desechos es una alternativa beneficiosa para el proceso, tanto para el medio ambiente como para solventar el problema de poca disponibilidad de ingesta de proteína en la dieta animal (Díaz, 2009).

En los últimos años se ha comenzado a utilizar los residuos de poscosecha como sustratos para el crecimiento microbiano, en este trabajo los residuos que se utilizaron fueron las cáscaras de papa por ser un tubérculo ampliamente cultivado y consumido en la región Andina del Ecuador (Nasseri, et al., 2011).

Las proteínas de origen microbiano o también denominadas proteínas unicelulares son producidas mediante procesos de fermentación controlada ya sea por cepas puras o por mezclas de hongos, bacterias y algas unicelulares (Wang, et al., 2012). Para este estudio se utilizó el hongo *Aspergillus niger*, el cual ha sido empleado para la producción de alimentos enriquecidos en proteínas, este hongo se usa principalmente en la industria alimentaria para la producción de enzimas como: invertasa, amilasa, glucoamilasa las cuales se utilizan en la degradación del almidón. *Aspergillus niger* también es el productor de ácidos orgánicos como el ácido cítrico y glucónico por procesos de fermentación (Méndez, 2013).

Álvarez (2017), evaluó la funcionalidad de producción de ácido cítrico usando cepas de *Aspergillus niger* los cuales fueron identificados morfológicamente, obteniendo la mayor producción de ácido cítrico de 3,5 g/l en una concentración de 200 g sacarosa/l, obteniendo un rendimiento de 0,045 g ácido cítrico/g sacarosa consumida.

1.3.Objetivos

1.3.1. Objetivo general

- Obtener un medio enriquecido en proteínas a partir de residuos de papa (*Solanum tuberosum*) por fermentación microbiana.

1.3.2. Objetivos específicos

- Realizar una caracterización fisicoquímica del sustrato.
- Caracterizar macroscópica y microscópicamente al *Aspergillus niger*.
- Optimizar las condiciones del cultivo para obtener un medio enriquecido en proteínas.
- Determinar la cinética de crecimiento del *Aspergillus niger* en el medio optimizado.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes investigativos

2.1.1. Descripción de *Solanum tuberosum*

La papa (*Solanum tuberosum*) es un tubérculo comestible de origen andino. Es una planta perteneciente a la familia de las solanáceas, consta de un tallo erecto, raíces fibrosas y ramificadas, hojas compuestas y flores formadas por un pistilo y cinco estambres. El color de la flor presenta distintas intensidades según las condiciones del cultivo. La planta para obtener un buen desarrollo vegetativo necesita de temperaturas entre los 18 y 24 °C. El cultivo de la papa soporta pH ácidos alrededor de 5 a 5,6 (Agrolanzarote, 2012).

En Ecuador las variedades que más se utilizan en locales de comidas rápidas y restaurantes son: Superchola (79%), Única (10%), Gabriela (10%), Cecilia (9%), Chola (14%) y en menor porcentaje Friepapa (1%). La planta de la variedad superchola, presenta tallos verdes y manchas púrpuras, las hojas son diseccionadas, posee una floración moderada con flores de color púrpura como se observa en la Figura 1, los tubérculos son de forma ovalada, yemas superficiales, color rosado y pulpa amarilla (INIAP, 2016).



Figura 1. Planta y tubérculo de la variedad superchola

Fuente: (INIAP, 2016).

La variedad de papa Única es idónea para consumo en sopas y caldos, y para fritura tipo bastón. Los tubérculos son redondos, la piel es crema con presencia de color morado en los ojos (Figura 2), los mismos que son superficiales y la pulpa es amarilla clara (Ñústez, 2010).



Figura 2. Tubérculos de la variedad de papa única

Fuente: (Ñústez, 2010).

La variedad chola es una papa para consumo en sopas y puré por su consistencia harinosa. Como se observa en la Figura 3, los tubérculos son de forma oval elíptica, ligeramente aplanados en su cara superior e inferior, de piel rosada y amarilla alrededor de los ojos y la pulpa amarilla (Velásquez, 2009).



Figura 3. Tubérculos de la variedad chola

Fuente: (Velásquez, 2009).

2.1.2. Perfil nutricional de *Solanum tuberosum*

La papa posee en su composición un contenido de materia seca del 19,17-28,13%; una humedad de 72,45-80,83%; azúcares totales entre 15,06-24,16%; azúcares reductores de 0,72-6,39% y almidón de 8,67-22,72% (Zárate et. al., 2014), mientras que la concentración de proteínas es aproximadamente 2,1%, las proteínas se ubican en el córtex y la médula del tubérculo, por ello se han implementado tecnologías de alto impacto y de bajo costo como la fermentación para obtener productos con enriquecimiento proteico, esto se refiere a la utilización de microorganismos para conseguir las propiedades deseables de los alimentos (Carreño, 2014).

También contiene antioxidantes alimentarios, los cuales pueden ayudar a prevenir enfermedades relacionadas con el envejecimiento, y tiene fibra, por lo que su consumo es beneficioso para la salud (Moreno, et al., 2015).

2.1.3. Microorganismos utilizados para enriquecimiento proteico de sustratos

Los microorganismos útiles para la producción de proteínas celulares deben tener un crecimiento rápido, pocas necesidades nutricionales y un sistema de fácil procesamiento; por lo tanto, las levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y los hongos como *Aspergillus niger* son los microorganismos más empleados para este fin. Chalon, et al. (2013), menciona que el microorganismo que se vaya a elegir para la producción de proteínas celulares, depende del sustrato, el proceso y la calidad deseada de la biomasa.

2.1.4. Fermentaciones utilizando hongos

La fermentación es un proceso de transformación de una sustancia que generalmente es un carbohidrato en otra, que puede ser biomasa o metabolitos obtenidos mediante el metabolismo de un microorganismo (Pérez, 2013). La fermentación líquida y en estado sólido son procesos que han sido modificados para maximizar la productividad y permitir el aprovechamiento de fuentes no convencionales de carbohidratos (Vimala, 2012).

La fermentación sólida es un sistema donde la humedad y el tamaño de partícula en el sustrato tienen un papel importante, así como la temperatura óptima en la cual se desarrolla el microorganismo, además es un proceso de bajo costo. La fermentación líquida requiere de un cultivo de células microbianas esparcidas de manera homogénea en un tanque agitado y se caracteriza por la facilidad de obtención de la biomasa representada en el micelio (Pandey, 2003).

En la fermentación, los micro hongos son los microorganismos de elección, debido a que de forma natural crecen sobre materiales sólidos, poseen sistemas enzimáticos completos que les permiten utilizar varias fuentes de carbono y además presentan alta capacidad de adherencia y penetración en las partículas del sustrato, por lo que la estructura micelar de los hongos filamentosos les confiere en este sentido ventaja frente a otros microorganismos (Nout, 2016).

Aguilar, et al. (2014), realizó un enriquecimiento proteico de residuales agroindustriales mediante fermentación sólida con el hongo filamentoso *Aspergillus niger* y demostró la factibilidad de la fermentación para el aprovechamiento de los residuales sólidos del proceso de extracción de aceite de higuera.

Se han desarrollado tecnologías de enriquecimiento proteico de la caña de azúcar por medio de la fermentación en estado sólido, con las que se obtiene un concentrado rico en proteínas a base de levaduras (Espinoza y Montiel, 2016).

2.1.5. Métodos para la estimación del crecimiento microbiano y enriquecimiento proteico

Uno de los métodos para medir el crecimiento de las poblaciones de células microbianas es el peso seco, éste se determina usando muestras de volúmenes y concentración celular conocidos, los cuales se concentran y se secan en una estufa hasta peso constante, la cantidad de biomasa total presente en ese cultivo se calcula como la diferencia entre el peso del tubo con la muestra seca y el peso inicial del tubo, dividida entre el volumen de la muestra (Sánchez, 2012).

Martos, et al. (2014), realizó un cultivo por lote de *Wickerhamomyces anomalus* en un biorreactor para la producción de una poligalacturonasa. Durante el proceso fermentativo determinó biomasa por medidas de peso seco, obteniendo una biomasa total de $4,013 \pm 0,26$ g/l.

Los métodos de cuantificación de proteínas totales incluyen métodos tradicionales como: Espectrofotometría UV, Método de Lowry, Método de Biuret y Método de Bradford. Para determinar la cantidad de proteínas en las muestras se utilizó el método de Biuret, este método se basa en la formación de un compuesto azul violeta por la reacción del ion cúprico con la proteína en medio alcalino. Una condición indispensable para la positividad de la reacción es que el compuesto analizado posea al menos dos enlaces peptídicos en su estructura. El color formado responde a la ley de Lambert-Beer, es decir, que a mayor concentración de proteínas, más coloreada se torna la solución y por lo tanto, la absorbancia será mayor (Labome, 2012).

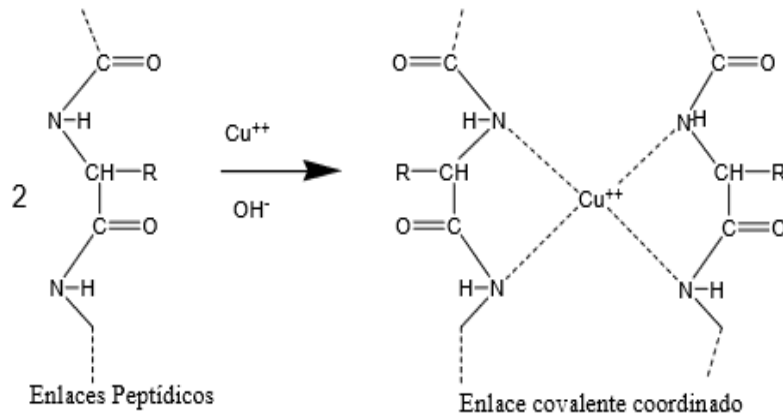


Figura 4. Reacción de Biuret

Fuente: (Puerto, 2013).

Panchano (2018), optimizó las condiciones de cultivo para la producción de enzimas glicosidasas tipo inulinasa de *Lactobacillus casei* utilizando residuos agroindustriales, obteniendo una producción de proteínas totales de 12,08 mg/ml que se produjeron pasadas las 70 h de crecimiento de la bacteria, para la cuantificación de proteínas utilizó el método de Biuret.

2.2. Hipótesis

2.2.1. Hipótesis nula

No se obtendrá un medio enriquecido en proteínas a partir de residuos de papa (*Solanum tuberosum*) por fermentación microbiana.

2.2.2. Hipótesis alternativa

Se obtendrá un medio enriquecido en proteínas a partir de residuos de papa (*Solanum tuberosum*) por fermentación microbiana.

2.3. Señalamiento de las variables de la hipótesis

2.3.1. Variables dependientes

- Concentración de proteína (mg/ml)
- Concentración de biomasa (g/ml)

2.3.2. Variables independientes

- Humedad (60 y 90%)
- Composición del medio (con sales y sin sales)
- Tiempo de fermentación (12 días)

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales, equipos y reactivos

3.1.1. Materiales

3.1.1.1. Material Vegetal

- Residuos domésticos de tres variedades de papa (superchola, chola y única)

3.1.1.2. Material Biológico

- Hongo *Aspergillus niger* aislado en el laboratorio de Microbiología

3.1.1.3. Material de Laboratorio

- Material de vidrio (GLASSCO)
- Toallas de papel
- Magnetos (Elicrom)
- Papel Aluminio

3.1.2. Equipos

- Secadero de bandejas (GANDER MTN)
- Balanza de Humedad (Citizen MB 200)
- Molino de cuchillas (INOX-EQUIP)
- pHmetro (Thermo Scientific)
- Estufa (MEMMERT NUT-004X)
- Autoclave (MLS-3020U-PE)
- Cámara de flujo laminar (Thermo Scientific™)
- Agitador incubador orbital (Ivymen sistema Shaker)
- Espectrofotómetro UV-VIS (HACH DR 5000, Germany)
- Centrífuga (PLC SERIES-03)
- Pipeta automática (Thermo Scientific, Dinamarca)
- Balanza analítica (Adventurer Pro)
- Software de análisis de datos estadístico y gráfico, Statgraphics XVI.I 64x.

3.1.3. Reactivos

- Reactivo 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Elicrom)
- Hidróxido de sodio (NaOH) (Elicrom)
- Ácido Clorhídrico (HCl) (Elicrom)
- Ácido acético (CH₃COOH) (Elicrom)
- Acetato de sodio (C₂H₃NaO₂) (Elicrom)
- Tartrato de sodio y potasio (KNaC₄H₄O₆·4H₂O) (Elicrom)
- Reactivo de Biuret (Elicrom)
- Agua destilada (Casa del químico)
- Enzima α-amilasa (Elicrom)
- Enzima glucoamilasa (Elicrom)
- Fosfato de amonio dihidrogenado (NH₄H₂PO₄) (Elicrom)
- Sulfato de magnesio (MgSO₄ · 7H₂O) (Elicrom)
- Sulfato ferroso (FeSO₄ · 7H₂O) (Elicrom)
- Papa-Dextrosa-Agar (PDA) (Sigma-aldrich)

3.2. Métodos

3.2.1 Obtención del sustrato

Se recolectaron tres tipos de cáscaras de papas: superchola, chola y única, estos residuos domésticos fueron llevados hasta los Laboratorios de la Unidad Operativa de la Dirección de Investigación y Desarrollo (UODIDE) pertenecientes a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, de la Universidad Técnica de Ambato. Las cáscaras se lavaron y se pesaron en la Balanza analítica (Adventurer Pro), luego se sometieron a un proceso de secado utilizando el Secadero de bandejas (Garden MNT) a 71.1 °C durante 18 horas para eliminar el contenido de agua presente en los residuos. El material seco fue molido utilizando un Molino de cuchillas (INOX-EQUIP) para obtener las harinas las cuales fueron utilizadas como sustrato para el crecimiento del microorganismo (Valverde y Lezama, 2017).

3.2.2. Caracterización fisicoquímica del sustrato

3.2.2.1. Determinación del pH

Se pesaron 5 g de harina y se disolvieron en agua destilada, se filtró y se determinó el pH por triplicado utilizando el pHmetro (Thermo Scientific) previamente calibrado.

El potencial de hidrógeno (pH) es una medida que indica el grado de acidez o basicidad de una solución en una escala que varía entre 0 y 14, el valor de pH representa el menos logaritmo en base diez de la concentración (actividad) de iones hidrógeno [H⁺] (Bravo, 2013).

3.2.2.2. Determinación del porcentaje de humedad

Se pesó por triplicado 3 g de las harinas, se colocaron las muestras sobre el plato de la Balanza de Humedad (Citizen MB 200) exponiéndolas a los rayos infrarrojos por un determinado tiempo, el secado por infrarrojos supone la irradiación de calor hacia el interior de la muestra para evaporar el agua, por lo tanto, la diferencia entre el peso inicial y el final corresponde al agua que fue eliminada (UNSTA, 2015).

3.2.2.3. Determinación del porcentaje de almidón

Se pesó por triplicado 50 mg de las harinas y se colocó en tubos de centrífuga, los cuales se sometieron a una hidrólisis enzimática utilizando la enzima α -amilasa termoestable (Termamyl). Se calentó la suspensión a 90 °C por 30 min en baño de agua hirviente. Simultáneamente se corrió un blanco con todos los componentes menos la harina. Se dejó enfriar la solución, se añadió 2 ml del tampón acetato y se reguló el pH de la mezcla, luego se añadió 100 μ l de glucoamilasa comercial y se incubó a 50 °C. Nuevamente se enfrió la solución y se centrifugó a 4500 rpm en la Centrífuga (PLC SERIES-03) para obtener el sobrenadante. Posterior a esto se determinó el contenido de azúcares reductores con DNS, se tomó una alícuota de 0,150 ml de sobrenadante y se mezcló con 0,150 ml de solución de DNS, se dejó hervir por 5 min, luego se enfrió y se añadió 1,5 ml de agua destilada. Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm utilizando el Espectrofotómetro UV-VIS (HACH DR 5000, Germany) (Peña, 2009). Se determinó el porcentaje de almidón a partir de una curva patrón de glucosa con una concentración en el rango de 0,4 hasta 2 mg/ml previamente realizada (Anexo 6).

3.2.2.4. Determinación de la concentración de proteínas

Se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Biuret, en la celda espectrofotométrica se colocó 0,1 ml de las muestras y se añadió 0,9 ml del reactivo de Biuret. Se mezcló y se dejó a temperatura ambiente durante 20 min. Después de este tiempo fue determinado el valor correspondiente a la intensidad de color mediante

la lectura de absorbancia a la longitud de onda de 540 nm en el Espectrofotómetro UV-VIS (HACH DR 5000, Germany) (Galván, 2014). Se determinó la concentración de proteínas a partir de una curva patrón de Albúmina se suero bovino con una concentración en el rango de 0 hasta 16 mg/ml previamente realizada (Anexo 7).

3.2.3. Caracterización macroscópica y microscópica del *Aspergillus niger*

Se realizó una caracterización macroscópica y microscópica del *Aspergillus niger*, microorganismo aislado por estudiantes de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología en el Laboratorio de Microbiología a partir de muestras de sustratos orgánicos de limón.

En la caracterización macroscópica de este hongo se analizaron los siguientes aspectos: relleno, borde, textura, brillo, exudado, gotícula, pigmento difusible, color en el reverso y color en el anverso. En la caracterización microscópica fue analizado: micelio, esporulación, presencia o ausencia de esporas, forma de esporas y conidióforo (Gil, 2017).

3.2.4. Obtención del medio enriquecido en proteínas

Para la obtención del medio enriquecido en proteínas se realizaron 4 formulaciones en volúmenes de 60 y 360 ml, cada una con tres réplicas, donde se analizaron como factores de estudio: la humedad (60 y 90%) y la composición del medio (con sales y sin sales). Las sales que se utilizaron al preparar los medios fueron: Fosfato de amonio dihidrogenado ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y Sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), en un porcentaje del 15% (Reyes, et al., 2013).

En cada una de las formulaciones se inoculó el microorganismo previamente caracterizado macroscópica y microscópicamente, y mantenido a la temperatura de 30 °C en el Agitador incubador orbital (Ivymen sistema Shaker) con una velocidad de agitación de 130 rpm durante 8 días (López, 2017). Se determinó la influencia de los factores de estudio sobre las variables respuestas: concentración de proteínas y concentración de biomasa (peso seco).

3.2.4.1. Determinación de la concentración de biomasa y proteínas

La concentración de biomasa fue estimada mediante peso seco, este es un método gravimétrico, para el cual se pesaron los tubos de centrifuga vacíos, se tomaron las muestras del fermentado y se centrifugaron en la centrifuga (PLC SERIES-03)

a 4000 rpm. El pellet obtenido del proceso de centrifugado fue lavado y colocado en la estufa (MEMMERT NUT-004X) a la temperatura de 55,5 °C durante 24 horas, al término de este tiempo se pesó el tubo y se calculó la diferencia entre ambos pesos, considerando el volumen de muestra utilizada.

Para determinar la concentración de proteínas se realizó el método de Biuret como se indica en el apartado 3.2.2.4., previamente a las muestras de fermentación se les realizó un proceso de ruptura celular, utilizando arena estéril.

3.2.5. Determinación de los parámetros cinéticos de la fermentación

Los parámetros cinéticos de crecimiento microbiano son las herramientas básicas para escalar los procesos biotecnológicos evaluados en el laboratorio, debido a que permiten predecir el desarrollo de la fermentación y evaluar los rendimientos, así como las productividades en los procesos (Zapata et al., 2005).

Con el medio optimizado se realizó un proceso fermentativo inoculando *Aspergillus niger* en un volumen de 300 ml, se colocó el medio a 30 °C en el Agitador incubador orbital (Ivymen sistema Shaker) con una velocidad de agitación de 130 rpm durante 12 días. Se tomaron muestras cada dos días para estimar la concentración de biomasa y la concentración de sustrato, luego se realizó una curva de crecimiento con el logaritmo de la concentración de biomasa y el tiempo.

3.2.5.1. Determinación de la velocidad específica de crecimiento

El valor de la velocidad específica de crecimiento (u) se determinó a partir de la pendiente de la curva logarítmica de la biomasa contra el tiempo en la región de crecimiento exponencial (Arana et al., 2016). Por lo tanto, la velocidad de crecimiento de biomasa puede representarse como:

$$m = u$$

Ecuación 1. Velocidad específica de crecimiento

Donde:

m = Pendiente

u = Velocidad específica de crecimiento

3.2.5.2. Determinación del tiempo de duplicación

Se determinó el tiempo que tarda en duplicarse la población o tiempo de generación (t_d), con la siguiente ecuación:

$$t_d = \frac{\ln 2}{u}$$

Ecuación 2. Tiempo de duplicación

3.2.5.3. Determinación del rendimiento biomasa/sustrato

Se determinó el rendimiento biomasa/sustrato ($Y_{x/s}$), ésta es la biomasa producida (Δx), por cantidad de sustrato consumido (Δs) (Arana et al., 2016). Para su cálculo se utilizó la siguiente expresión:

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta x}{\Delta s}$$

Ecuación 3. Rendimiento biomasa/sustrato

Para determinar la concentración de sustrato consumido inicial y final se realizó el método de DNS como se indica en el apartado 3.2.2.3.

3.2.6. Análisis estadístico

Utilizando el software Statgraphics Centurion versión XVI.I se realizó un análisis de varianza para determinar si existen diferencias significativas entre las medias de los porcentajes de almidón que se obtuvieron en cada variedad de papa. Se realizó además un análisis de varianza para determinar si existen diferencias significativas entre los factores (Humedad y Composición del medio) y sus interacciones en el proceso fermentativo. Las variables respuestas concentración de proteínas y biomasa fueron optimizadas para conocer donde el microorganismo crece en mayor medida.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis y discusión de resultados

4.1.1. Caracterización fisicoquímica del sustrato

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos de la caracterización que se le realizó a las tres variedades de papa.

Tabla 1. Caracterización fisicoquímica del sustrato

Variedades de papa	pH	Porcentaje de Humedad (%)	Porcentaje de almidón (%)	Concentración de proteína (mg/ml)
Única	5,78 ± 0,125	6,21 ± 0,280	14,95 ± 0,322	4,72 ± 0,325
Chola	5,77 ± 0,125	5,75 ± 0,280	15,35 ± 0,322	5,47 ± 0,325
Super Chola	6,04 ± 0,125	5,54 ± 0,280	15,74 ± 0,322	4,86 ± 0,325

Como se puede observar en la Tabla 1, se registraron valores de pH ácidos, humedades bajas, alto porcentaje de almidón y concentraciones de proteínas relativamente bajas, esto es debido a que los niveles de proteína son insuficientes en la papa nativa para el requerimiento diario.

Sandoval (2012), menciona que su investigación está orientada a la sustitución parcial de la harina de trigo por harina de papa; el objetivo principal fue determinar las propiedades fisicoquímicas de la fibra dietética obtenida a partir de los residuos de la papa. Realizando el análisis fisicoquímico de la cáscara de papa obtuvo una humedad de $12,03 \pm 0,19$ % y un pH de $4,84 \pm 0,12$. Al comparar los datos bibliográficos con los que se obtuvo en este trabajo se pudo analizar que en cuanto a humedad si hay una diferencia entre los resultados y esto pudo deberse a la cinética de secado la cual demostró que el bajo contenido de humedad favorece la estabilidad de las propiedades fisicoquímicas, funcionales y organolépticas, mientras que los valores de pH son similares a los que se obtuvieron en este estudio, es decir presentan pH ácido.

El almidón es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, se encuentra en las semillas de cereales, tubérculos, raíces, semillas de leguminosas, frutas, troncos y hojas. El porcentaje de almidón varía según el estado de madurez de la fuente, constituye la mayor fracción de hidratos de carbono, el tamaño y forma de estos gránulos son característicos de cada especie botánica (Songor y Tenesaca, 2019).

Loyola (2010), realizó el análisis químico de tubérculos de papas producidos en forma convencional y orgánica. Uno de los componentes que determinó fue el porcentaje de almidón, teniendo como resultado para el cultivo convencional 14,46% de almidón y para el cultivo orgánico 13,58% valores cercanos a los registrados en la Tabla 1. Por lo tanto, la harina de papa puede representar una alternativa en la elaboración de nuevos productos alimenticios gracias a su valor nutricional y organoléptico.

Con los valores obtenidos de porcentaje de almidón se realizó un diseño completamente al azar en el cual el análisis de varianza presentó un Valor-P mayor a 0,05 (Anexo 9), lo que indicó que no existió una diferencia estadísticamente significativa para un nivel del 95% de confianza, por lo tanto, se pudo haber utilizado cualquiera de las tres variedades de papa, sin embargo, en este trabajo de investigación fue seleccionada la variedad superchola por ser una de las variedades más consumidas y desechada una gran cantidad de cáscara.

4.1.2. Caracterización macroscópica y microscópica del *Aspergillus niger*

Se realizó una caracterización macroscópica y microscópica del *Aspergillus niger* como se muestra en la Tabla 2 y 3.

Tabla 2. Caracterización macroscópica del *Aspergillus niger*

Caracterización	<i>Aspergillus niger</i>
Relieve	Medio
Borde	Irregular
Textura	Polvorienta
Brillo	Mate
Exudado	Ausencia
Gotícula	Ausencia
Pigmento Difusible	Ausencia

Color en el reverso	Marrón
Color en el anverso	Amarillo

Tabla 3. Caracterización microscópica del *Aspergillus niger*

Caracterización	<i>Aspergillus niger</i>
Micelio	Tabicado
Esporulación	Unicelular
Esporas	Presencia
Forma de spora	Globular
Conidióforo	Presencia

Aspergillus niger es un hongo que se encuentra alrededor del mundo, su crecimiento está asociado a materiales orgánicos y al suelo, este microorganismo es usado para la biodegradación de desechos industriales y para la elaboración de sustancias y enzimas necesarias en la fabricación de productos comestibles y no comestibles.

Álvarez (2017), preparó medio PDA para el aislamiento de colonias de *Aspergillus spp*, de las colonias obtenidas seleccionó las que presentaban morfología esperada para *Aspergillus niger*: vista frontal de color negro o marrón, vista posterior de color amarillo, información similar a la registrada en la Tabla 2.

De acuerdo con lo reportado en bibliografía, el *Aspergillus niger* es un hongo micelial formado por hifas tabicadas, tal como se reporta en la Tabla 3. Las colonias de este hongo crecen rápidamente y por su aspecto polvoriento como se indica en la Tabla 2 son fáciles de reconocer. Presentan conidióforos (Tabla 3) que son de pared lisa o pigmentada y miden de 1,5 a 3 mm de largo y de 15 a 20 mm de diámetro. Al microscopio se puede observar abundantes conidios con aspecto variable: entre ellos globosas, subglobosas, elípticas, lisas, verrugosas o con estrías longitudinales, todas de color negro o marrón (Gil, 2017).

4.1.3. Obtención del medio enriquecido en proteínas

De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis de varianza para la concentración de proteínas (Anexo 10) el Valor-P para el factor humedad y composición del medio fue menor que 0.05 para un nivel de confianza del 95%, de modo que estos factores influyeron significativamente sobre la concentración de proteína.

El Diagrama de Pareto muestra que la influencia de ambos factores fue negativa sobre la concentración de proteínas (Figura 5). El Gráfico de Efectos Principales (Figura 6) indica que a medida que aumenta la humedad del medio de 61 a 93% existió una disminución de la concentración de proteínas, similar a lo ocurrido en cuanto a la composición del medio obteniéndose que al adicionar suplementos al medio disminuyó, pero en menor proporción.

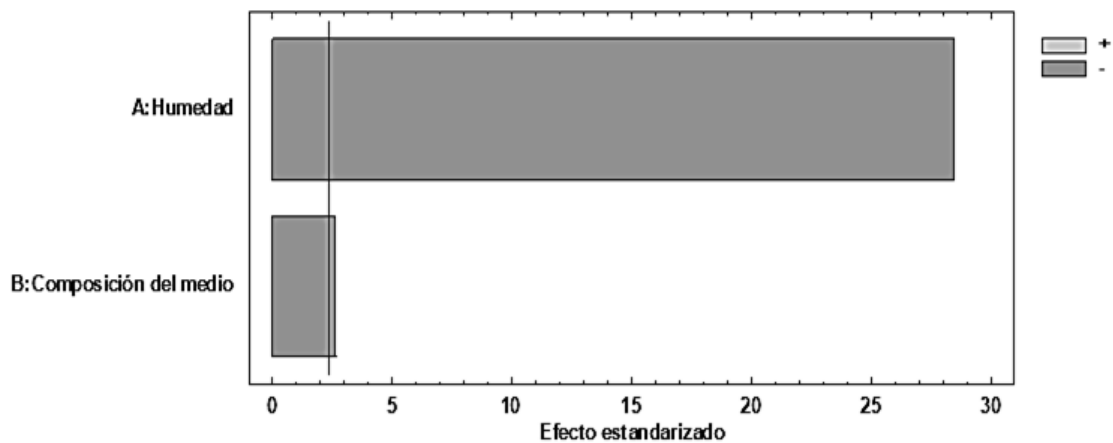


Figura 5. Diagrama de Pareto Estandarizado para la concentración de proteína

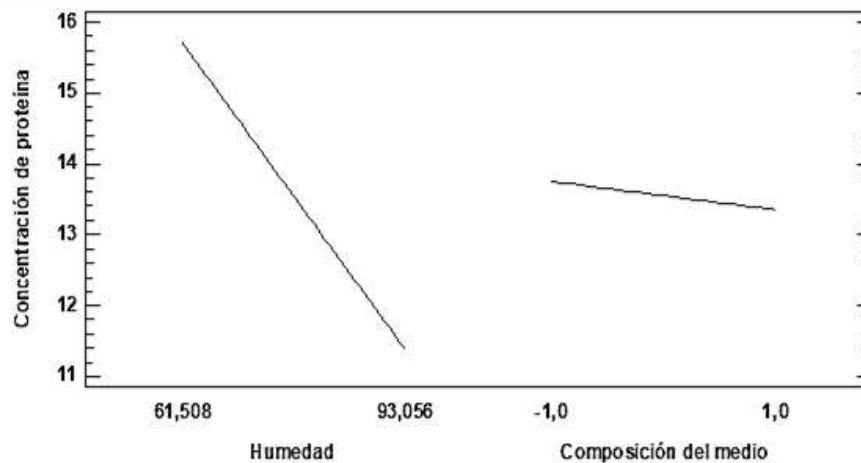


Figura 6. Gráfico de Efectos Principales para la concentración de proteína

En el análisis de varianza para la concentración de biomasa (Anexo 11) el Valor-P para el factor humedad fue menor que 0.05 para un nivel de confianza del 95%, de modo que este factor influyó significativamente sobre la concentración de biomasa. El factor composición del medio no influyó sobre esta variable respuesta.

El Diagrama de Pareto muestra que la influencia del factor humedad fue negativa sobre la concentración de biomasa (Figura 7). En el Gráfico de Efectos Principales (Figura 8) se observa que a medida que aumenta la humedad del medio de 61 a 93% existió una disminución de la concentración de biomasa, similar al comportamiento obtenido al analizar la variable concentración de proteínas. Esta correspondencia se debe a que la proteína que es aportada al medio es proveniente del crecimiento celular.

De acuerdo con estudios realizados, el incremento del crecimiento del *Aspergillus niger* se produce con una humedad del 50 al 60%. Teniendo en cuenta, que su fase esporulativa es un estado de resistencia que se desencadena frente a condiciones adversas, es por lo que con humedades bajas aumenta el crecimiento del hongo, la germinación de las esporas y, por lo tanto, la colonización de nuevos sustratos, no se requiere de niveles tan altos de humedad (Pozzo et al, 2008).

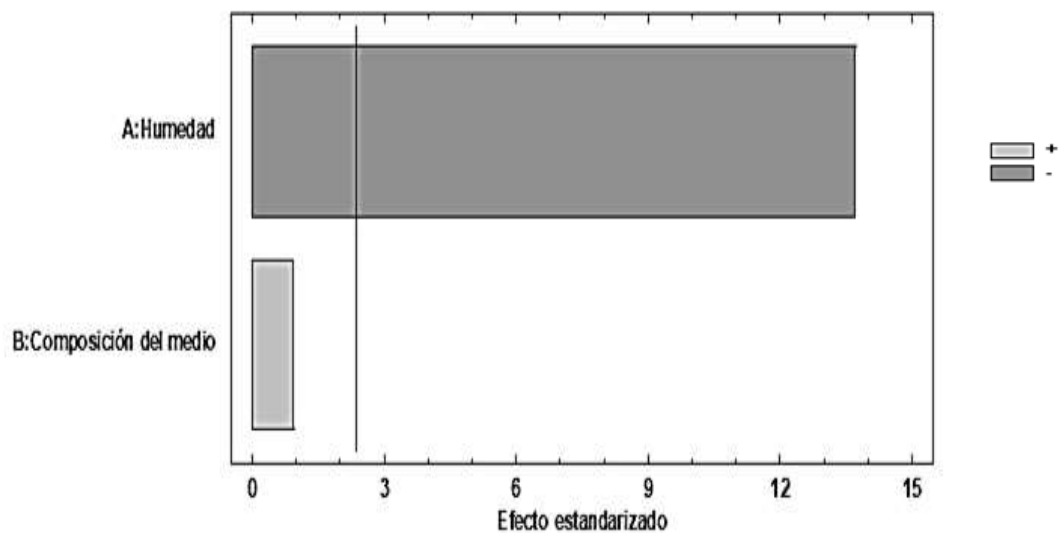


Figura 7. Diagrama de Pareto Estandarizado para la concentración de biomasa

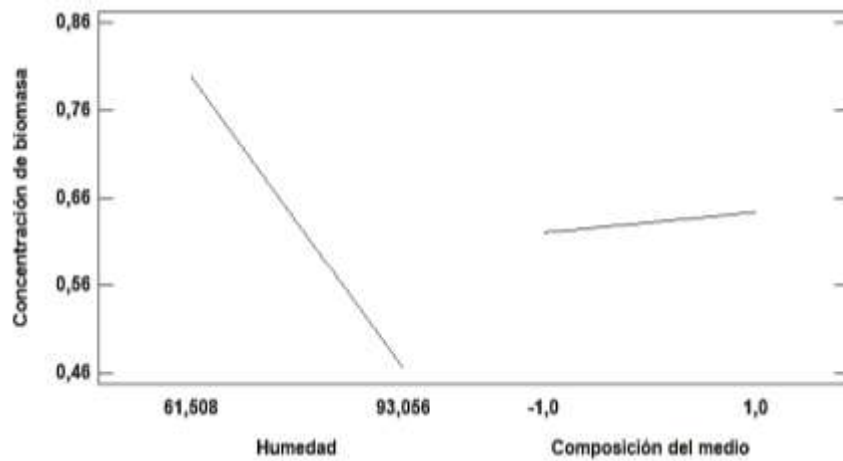


Figura 8. Gráfico de Efectos Principales para la concentración de biomasa

En la Figura 9 se muestra el Diagrama de Superficie de Respuesta Estimada para la concentración de proteínas y concentración de biomasa, donde se observa que con una humedad del 61% y con el medio sin sales (-1) se maximizaron ambas variables respuestas, obteniéndose un valor óptimo de concentración de proteínas de 15,91 mg/ml y una concentración de biomasa de 0,79 g/ml como se muestra en la Tabla 4.

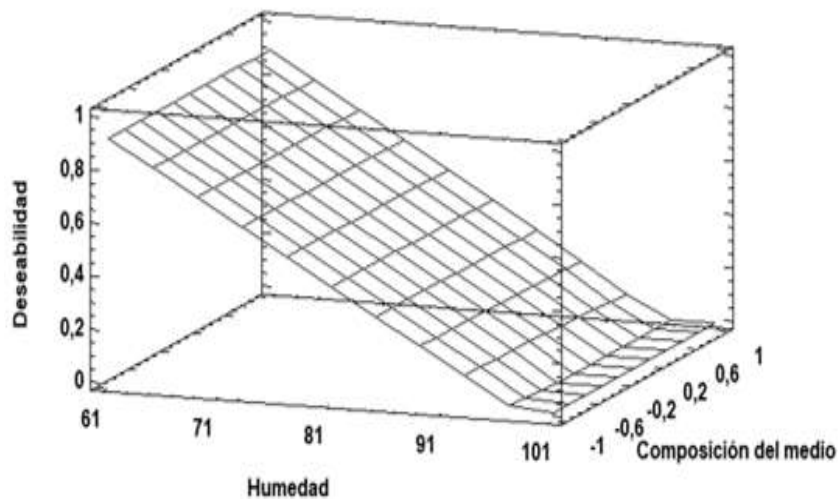


Figura 9. Diagrama de Superficie de Respuesta Estimada

Tabla 4. Valores óptimos de concentración de proteínas y concentración de biomasa

<i>Respuesta</i>	<i>Óptimo</i>
Concentración de proteína (mg/ml)	15,9099
Concentración de biomasa (g/ml)	0,78766

Torres (2013), evaluó la potencialidad de dos residuos orgánicos vegetales: naranja y papa, como sustratos productores de proteína Unicelular (SCP), para el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. El análisis que realizó afirmó que el sustrato de papa es el mejor sustrato para la producción de proteína celular porque puede producir en promedio 9,8 mg/ml de proteína. Por lo tanto, comparando los valores de proteína reportados bibliográficamente con los resultados obtenidos en la investigación, se observó un aumento significativo en los niveles de proteína a 15,91 mg/ml ya que el valor inicial de la harina de papa en cuanto a la concentración de proteína era tan solo 4,86 mg/ml.

4.1.4. Determinación de los parámetros cinéticos

Con el método de peso seco se determinó cada dos días la concentración de biomasa obtenida en el proceso de fermentación y de cada uno de estos valores se determinó el logaritmo neperiano (Ln) como se observa en el Anexo 12.

En la Figura 10 se presenta la curva de crecimiento del *Aspergillus niger* en la cual se observan 3 fases del crecimiento microbiano.

Méndez (2013), realizó la producción de ácido glucónico aplicando cinética de crecimiento microbiano a partir de *Aspergillus niger*, utilizó como medio de cultivo dulce de atado. En su investigación hizo la transformación de biomasa a logaritmo natural para determinar la curva y las fases de crecimiento del hongo.

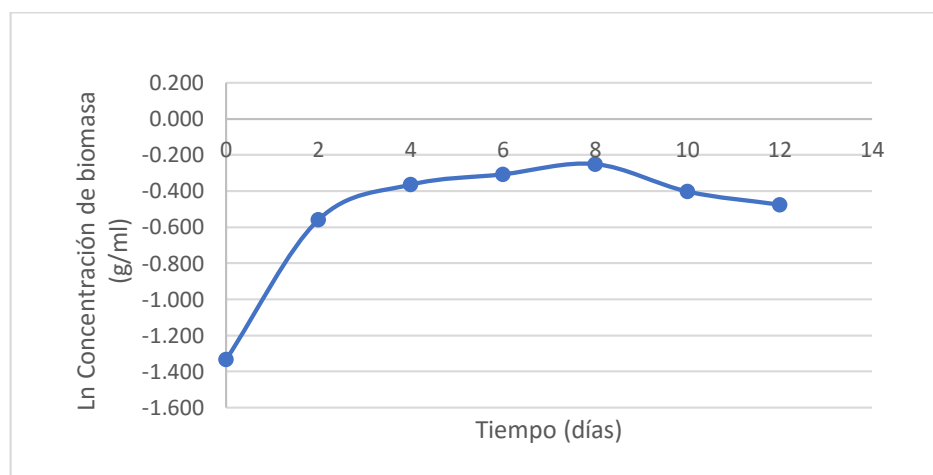


Figura 10. Curva de crecimiento del *Aspergillus niger*

El cultivo entra en la fase de crecimiento exponencial desde 0 hasta 2 días, en esta fase la síntesis de todos los constituyentes celulares se incrementa a una rapidez constante, de tal manera que la población de células se duplica y la velocidad de crecimiento es máxima (Méndez, 2013). A partir de los 2 hasta los 8 días se observó la fase estacionaria, en esta fase el crecimiento puede estar ocurriendo, pero está equilibrado por la rapidez de muerte o lisis celular, la velocidad específica de crecimiento es cero, esto no quiere decir que las funciones biosintéticas hayan finalizado, sino que la energía proporcionada por el sustrato se destina hacia el mantenimiento celular (Ferrer, et al., 2019).

A los 10 días comenzó un descenso de la concentración de biomasa, es decir el cultivo entró en la fase de muerte en donde el número de células que mueren aumenta. La pendiente de esta fase puede ser más o menos pronunciada de acuerdo al tipo de microorganismo, pueden presentarse pendientes menos bruscas como se observa en la Figura 10, cuando el microorganismo presenta alguna forma de resistencia en este caso las esporas (Benintende y Sánchez, 2012).

Méndez (2013), observó que *Aspergillus niger* alcanzó el máximo valor de crecimiento a las 48 horas y el decrecimiento de la biomasa a las 192 horas. Al comparar estos resultados bibliográficos con los obtenidos en esta investigación se pudo observar que el tiempo en el que se dio la fase crecimiento exponencial es el mismo, mientras que la fase de muerte es diferente. Las poblaciones microbianas pocas veces conservan un crecimiento exponencial prolongado, esto es debido a que casi siempre el crecimiento se encuentra limitado por el agotamiento de nutrientes o por la acumulación de productos del mismo metabolismo microbiano y como consecuencia, el crecimiento disminuye, hasta detenerse en un determinado tiempo (Benintende y Sánchez, 2012).

En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos de los parámetros cinéticos.

Tabla 5. Parámetros cinéticos del microorganismo en el medio optimizado

Parámetros cinéticos	Medio Optimizado
μ (horas ⁻¹)	0,016
t_d (horas)	43,08
$Y_{x/s}$ (g de biomasa/mg de sustrato consumido)	4,49

El valor de la velocidad específica de crecimiento (u) se determinó a partir de la pendiente de la curva logarítmica de la biomasa contra el tiempo (ecuación 1) en la región de crecimiento exponencial como que se observa en la Figura 11, obteniendo así un valor de $u = 0,016 h^{-1}$. El tiempo de duplicación de la población se determinó a partir de la ecuación 2, teniendo como resultado un $t_d = 43,08 h$.

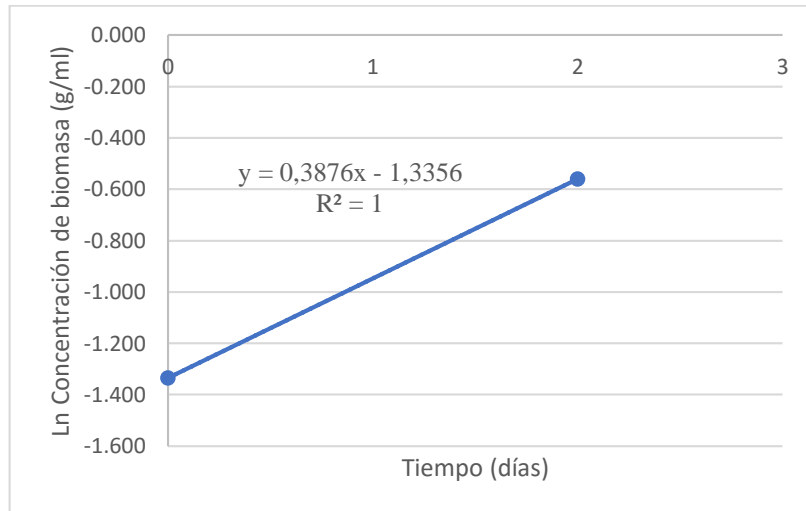


Figura 11. Fase exponencial del crecimiento del *Aspergillus niger*

Según Castro, et al. (2011), la velocidad específica para hongos como *Aspergillus niger* se encuentra desde $0,0101 h^{-1}$ hasta $0,1213 h^{-1}$, por lo tanto el valor obtenido de velocidad específica de crecimiento en el presente trabajo se encuentra dentro del rango reportado bibliográficamente.

Con los datos iniciales y finales tanto de la concentración de sustrato (Δs) como de la concentración de biomasa (Δx) se calculó el rendimiento. Aplicando la ecuación 3 se obtuvo un rendimiento de $Y_{x/s} = 0,511$ g de biomasa/mg de glucosa consumida, es decir que por cada mg de glucosa consumida el microorganismo produce 0,511 g de biomasa.

Cueva (2017), realizó la producción de α -amilasas a partir de la fermentación de *Aspergillus niger* para su empleo en procesos de panificación utilizando como sustrato almidón de trigo, optimizó las condiciones de cultivo y obtuvo la mayor producción de biomasa a una velocidad específica de crecimiento $u = 0,011 h^{-1}$, un tiempo de duplicación $t_d = 61,23 h$ y un $Y_{x/s} = 9,79$ g de biomasa/g sustrato. Por lo tanto los valores de u y t_d son similares a los reportados en esta investigación.

Además, se pudo observar que a medida que el tiempo de duplicación es menor la velocidad específica de crecimiento es mayor.

El sustrato que se utilizó en el desarrollo de todos los experimentos fueron las cáscaras de la variedad superchola. Como se menciona en el apartado 3.2.2.3 se pesó 50 mg de la harina la cual contenía un 15,74% de almidón, esta es una macromolécula que consiste de dos polisacáridos: amilosa y amilopectina. La amilosa es un polímero lineal de unidades de glucosa unidas por enlaces α (1-4) (Figura 12). Mientras que la amilopectina es un polímero ramificado de unidades de glucosa unidas en un 94-96% por enlaces α (1-4) y en un 4-6% con uniones α (1-6) (Figura 13). Dichas ramificaciones se localizan aproximadamente cada 15-25 unidades de glucosa (Hernández, et al; 2008).

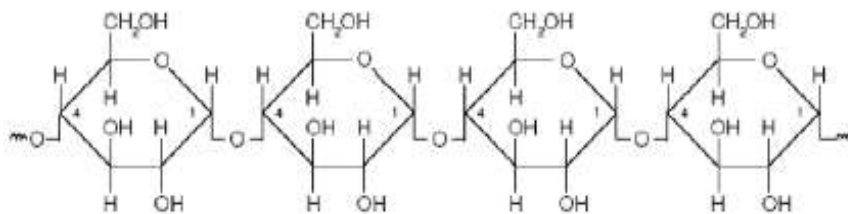


Figura 12. Estructura de la molécula de amilosa

Fuente: (Meneses, et al; 2007)

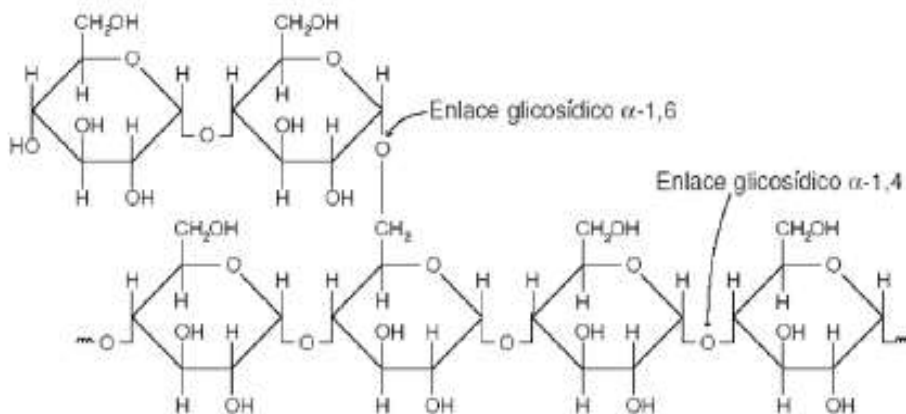


Figura 13. Estructura de la molécula de amilopectina

Fuente: (Meneses, et al; 2007)

Por lo tanto al representar el rendimiento obtenido en esta investigación, en g de biomasa/mg de sustrato consumido, se obtuvo un valor de $Y_{x/s} = 4,49$. Cueva (2013), obtuvo un rendimiento mucho mayor en comparación al que se obtuvo en el experimento, esto es debido a la elevada cantidad de vitaminas y nutrientes del sustrato empleado.

4.2. Verificación de la hipótesis

$H_0 \neq 0$ Se rechaza la hipótesis nula.

$H_a = 0$ Se acepta la hipótesis alternativa y se concluye que si se podrá obtener un medio enriquecido en proteínas a partir de residuos de papa (*Solanum tuberosum*) por fermentación microbiana.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Se realizó la caracterización fisicoquímica de los residuos domésticos de papa (*Solanum tuberosum*), obteniéndose valores de pH que oscilan en el rango de 5,78 a 6,04; una concentración de proteínas de 4,72 hasta 5,47 mg/ml; el porcentaje de humedad desde 5,54 hasta 6,21% y el porcentaje de almidón de 14,95 a 15,74% observándose mediante un diseño completamente al azar que no existió diferencia significativa en las tres variedades: superchola, chola y única.

Se caracterizó macroscópica y microscópicamente al *Aspergillus niger*, hongo aislado a partir de sustratos orgánicos de limón, este hongo presentó vista frontal de color marrón y vista posterior de color amarillo, micelio tabicado, esporas de forma globular, aspecto polvoriento y presencia de conidióforos.

Se obtuvo un medio enriquecido en proteínas a partir de residuos de papa utilizando el *Aspergillus niger*, con valores de concentración de proteínas de 15,91 mg/ml y de concentración de biomasa de 0,79 g/ml, en el medio formulado con una humedad del 61% y sin incluir sales.

Se determinaron los parámetros cinéticos del microorganismo en el medio optimizado, obteniendo una velocidad específica de crecimiento $u = 0,016 h^{-1}$, un tiempo de duplicación $t_d = 43,08 h$ y un rendimiento $Y_{x/s} = 4,49 g$ de biomasa/mg de sustrato consumido.

5.2. Recomendaciones

Realizar una caracterización genotípica del *Aspergillus niger*.

Para lograr obtener un buen crecimiento microbiano se recomienda que las cepas conservadas en el laboratorio sean transferidas a nuevos medios de cultivo cada 3 meses.

Realizar una fermentación microbiana donde se evalué la influencia de la velocidad de agitación sobre el crecimiento de la biomasa.

Realizar la cuantificación de la concentración de proteínas por el Método de Bradford.

Realizar un escalado del proceso fermentativo a nivel piloto e industrial para verificar el crecimiento de la biomasa y el enriquecimiento proteico.

Administrar el producto enriquecido en proteínas a animales de rápido crecimiento.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, B; Camacho, M y Serrat, M. (2014). Enriquecimiento proteico de residuales agroindustriales mediante fermentación sólida con el hongo filamentoso *Aspergillus niger*. *Rev Cub Quim* vol.26 no.1 Santiago de Cuba ene.-abr.
- Agrolanzarote. (2012). Fichas Técnicas de Cultivos. Recuperado de: http://www.agrolanzarote.com/sites/default/files/Agrolanzarote/02Productos/documentos/agrolanzarote._ficha_papas.pdf
- Álvarez, J. (2017). Evaluación de la funcionalidad de producción de ácido cítrico usando cepas de *Aspergillus niger* identificadas molecularmente. Recuperado de: <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/6627/1/131134.pdf>
- Arana, I; Orruño, M y Barcina, I. (2016). Cálculo de los parámetros que definen el crecimiento bacteriano. Recuperado de: https://ocw.ehu.es/file.php/48/Tema_4._calculo_de_los_parametros_que_definen_el_crecimiento_bacteriano.pdf
- Arguero, A. (2014). Estudio de la producción de enzima amilasa mediante *Aspergillus niger* por fermentación sólida, con el uso de residuos agroindustriales. Recuperado de: <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/7349/1/CD-5494.pdf>
- Benintende, S y Sánchez, C. (2012). Crecimiento Bacteriano. Cátedra Microbiología Agrícola. Recuperado de: http://www.fca.uner.edu.ar/files/academica/deptos/catedras/microbiologia/unidad_3_crecimiento_bacteriano
- Bravo, J. (2013). Obtención de harina precocida de camote (*ipomoea batatas* L.) para su uso tecnológico en la industria alimentaria. Recuperado de: http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/5041/1/53886_1.pdf
- Carreño, N. (2014). Fermentación de la papa (*Solanum tuberosum*), como alternativa tecnológica para la alimentación animal. Recuperado de: <https://repository.unad.edu.co/bitstream/10596/2545/1/2014-06.pdf>
- Castro, A; Fernández, D; Guimaraes, D y Reis, L. (2011). Multiresponse Optimization of Inoculum Conditions for the Production of Amylases and Proteases by *Aspergillus awamori* in Solid-State Fermentation of Babassu Cake. Rio de Janeiro, Brazil: Enzyme Research: Volume II, pp 2-5.

- Chalon, M., Terán, V., Arena, M., Oliszewki, R., González, S. (2013). Microbiological culture broth designed from food waste. *Journal of Environmental Management*, 115, Pag 1-4
- Cueva, Y. (2017). Producción de α Amilasas mediante fermentación submersa de *Aspergillus niger* para su empleo en procesos de panificación. Recuperado de: <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/8044/1/UDLA-EC-TIB-2017-34.pdf>
- Díaz, D. (2009). Desarrollo de un inóculo con diferentes sustratos mediante fermentación sólida sumergida. Recuperado de: <http://www.lebas.com.mx/files/desarrollo-de-un-inoculo-con-diferentes-sustratos-mediante-fermentacion.pdf>
- El Heraldo. (2017). Tungurahua tiene alta producción de papa. Recuperado de: <http://elheraldo.com.ec/heraldo/index.php?fecha=2017-05-09&seccion=Titulares¬icia=81181>
- Espinoza, J y Montiel, A. (2016). Fermentación en estado sólido de *Saccharum officinarum* con diferentes niveles de inclusión de follaje fresco de *Moringa oleífera* Managua. Recuperado de: <http://repositorio.una.edu.ni/3353/1/tnq52e77.pdf>
- Ferrer, J. [et. al.]. (2019). Estudio cinético de la producción de biomasa y compuestos fenólicos por *Pleurotus ostreatus* en fase sumergida. *Rev Cub Quim.* vol.31, n.1, pp.16-30. ISSN 2224-5421.
- Fontes, P; Gomide, L; Costa, N; Peternelli, L; Fontes, E y Ramos, E. (2015). Chemical composition and protein quality of mortadella formulated with carbon monoxide-treated porcine blood, *LWT - Food Science and Technology*, Volume 64, Issue 2, December, Pag 926-931. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.004>.
- Galván, A. (2014). Métodos para la cuantificación de proteínas. Recuperado de: http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/acym/27_METODOS_PARA_LA_CUANTIFICACION_DE_PROTEINAS.pdf
- Gerena, F. (2013). Obtención de jarabes azucarados a partir de la hidrólisis química de residuos de cáscaras de naranja (*citrus sinensis* 1 var valencia) y papa (*Solanum tuberosum*) variedad diacol capiro (r-12) para ser empleados como edulcorantes en la industria de alimentos. Recuperado de: <http://repository.unad.edu.co/bitstream/10596/1528/1/46455179pdf.pdf>
- Gil, M. (2017). *Aspergillus niger*: características, taxonomía, morfología y patologías. Recuperado de: <https://www.lifeder.com/aspergillus-niger/>

- Hernández, M; Torruco, G; Guerrero, L y Betancur A. (2008). Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México. Recuperado de: <http://www.scielo.br/pdf/cta/v28n3/a31v28n3.pdf>
- Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. [INIAP]. (2016). Catálogo de variedades de papa del Ecuador. Recuperado de: <http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/2748/1/iniapscpm427.pdf>
- Instituto Nacional de Estadística y Censos. [INEC]. (2018). Estadística de información Ambiental. Recuperado de: <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/segun-la-ultima-estadistica-de-informacion-ambiental-cada-ecuatoriano-produce-058-kilogramos-de-residuos-solidos-al-dia/>
- Labome. (2012). Cuantificación de proteínas. Recuperado de: <http://www.labome.es/method/Protein-Quantitation.html>
- López, K. (2017). Evaluación comparativa en la biodegradación de aceites vegetales generados en el proceso de frituras mediante el hongo *Aspergillus niger* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Recuperado de: <http://dspace.espoeh.edu.ec/bitstream/123456789/7852/1/236T0286.pdf>
- Loyola, N. (2010). Evaluación del contenido de almidón en papas (*solanum tuberosum*, spa. *tuberosum* cv. *desirée*), producidas en forma orgánica y convencional en la provincia de Curicó. Recuperado de: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/idesia/v28n2/art05.pdf>
- Martos, M; Butiuk, A y Rojas, N. (2014). Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v16n2/v16n2a08.pdf>
- Méndez, J. (2013). Producción de ácido glucónico aplicando cinética de crecimiento microbiano a partir de *aspergillus niger* y como medio de cultivo, dulce de atado. Recuperado de: <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/3258/1/16103225.pdf>
- Meneses, J; Corrales, C y Valencia M. (2007). Síntesis y caracterización de un polímero biodegradable a partir del almidón de yuca. *Rev.EIA.Esc.Ing.Antioq* no.8 Envigado July/Dec. 2007
- Moreno, G; Andrade, C; Oña, G y Hernández T. (2015). Efecto de la cocción sobre la composición química y capacidad antioxidante de papas nativas (*Solanum tuberosum*) del Ecuador. Recuperado de: <http://www.agrocalidad.gob.ec/revistaecuadorestabilidad/index.php/revista/article/download/18/34>

- Nasseri, A; Rasoul, S; Morowvat, M y Ghasemi, Y. (2011). Single Cell Protein: Production and Process. American Journal of Food Technology. <https://doi.org/10.3923/ajft.2011.103.116>.
- Nout M.J.R. (2016). Food Technologies: Fermentation. In: Enciclopedia of Food Safety. Pag 168–177.
- Ñústez, I. (2010). Inventario de tecnologías e información para el cultivo de papa en Ecuador. Recuperado de: <https://cipotato.org/papaenecuador/2017/10/12/23-ica-unica/>
- Oviedo, J; Zapata, D; García, L; y Echeverría D. (2016). Evaluación del enriquecimiento proteico de residuos de papa y yuca con (*Paecilomyces variotti*). Revista Ingeniería y Región. Pag 73-84.
- Panchano, R. (2018). Optimización de las condiciones de cultivo para la producción de enzimas glicosidasas tipo inulinasa de *Lactobacillus casei* utilizando residuos agroindustriales. Recuperado de: <http://dspace.udla.edu.ec/jspui/bitstream/33000/10214/1/UDLA-EC-TIB-2018-32.pdf>
- Pandey, A. (2003). Solid Fermentation State. Biochemical Engineering Journal, 13: Pag 81-84.
- Pérez, G. (2013). Escalado del tamaño de pellet obtenido en la fermentación sumergida de sacarosa con *Aspergillus niger*, desde un reactor de 2 L hasta uno de 14 L. Recuperado de: <http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/7051>
- Peña, A. (2009). Hidrólisis de almidón de yuca mediante la utilización de preparaciones solubles e insolubilizadas de alfa-amilasa (*Aspergillus niger*). Recuperado de: <http://blade1.uniquindio.edu.co/uniquindio/eventos/siquia20130415/siquia2009pos4.pdf>
- Plantas Morenal. (2011). Papa-*Solanum tuberosum*. Recuperado de: <http://plantasmorenal.blogspot.com/2011/05/papa-solanum-tuberosum.html>
- Puerto, M. (2013). Determinación de proteínas. Recuperado de: <http://www.fagro.edu.uy/~nutrical/ensenanza/AVI%20WEB/cursoema/detdePC.pdf>
- Reyes, I; González, M y López, F. (2013). Un análisis del metabolismo de *Aspergillus niger* creciendo sobre un sustrato sólido. Revista Mexicana de Ingeniería Química, vol. 12, núm. 1, pp. 41-56
- Sánchez, J. (2012). Laboratorio de biotecnología de productos agroindustriales. Recuperado de: <https://es.slideshare.net/yuricomartinez/lab02-peso-hmedo-peso-seco-turbidimetra>

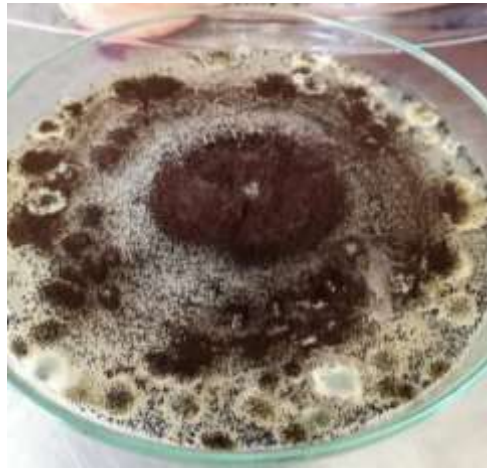
- Sandoval, E. (2012). Influencia de la sustitución parcial de la harina de trigo por harina de quinoa y papa en las propiedades termomecánicas y de panificación de masas. *Revista Actualidad y Divulgación científica*, vol. 15, núm. 1.
- Saragocin, C. (2015). “Estudio de factibilidad económica para la instalación de una planta procesadora de papa (*Solanum tuberosum*) mínimamente procesada para el Consorcio de Productores de papa CONPAPA – Tungurahua”. Recuperado de: <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/9357/1/AL%20555.pdf>
- Songor, M y Tenesca, A. (2019). Extracción y uso de almidón de papa china (*Colocasia Esculenta*) en la elaboración de productos cárnicos emulsionados. Recuperado de: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/32116/2/Trabajo%20de%20Titulaci%C3%B3n.pdf>
- Torres, G. (2013). Cuantificación del contenido de proteína celular (scp) en la biomasa de la levadura *saccharomyces cerevisiae* producida a partir de residuos de cáscaras de naranja (*citrus sinensis* l var valencia) y papa (*solanum tuberosum*) variedad diacol capiro (r-12) para uso en la alimentación animal. Recuperado de: https://stadium.unad.edu.co/preview/UNAD.php?url=/bitstream/10596/1070/2/TorresVargasGoldaMeyer_2013.pdf
- UNSTA. (2015). Catedra de bromatología y técnicas alimentarias. Análisis de harinas. Recuperado de: <http://www.unsta.edu.ar/wp-content/uploads/2015/07/Harina-2015.pdf>
- Valverde, I y Lezama, J. (2017). Influencia de la hidrólisis química en las características fisicoquímicas y funcionales de los residuos industriales de papa, camote y yuca. Recuperado de: <http://repositorio.uns.edu.pe/bitstream/handle/UNS/3053/47038.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Velásquez, P. (2009). Inventario de tecnologías e información para el cultivo de papa en Ecuador. Recuperado de: <https://cipotato.org/papaenecuador/2017/10/12/35-chola/>
- Vimala, R. (2012). Solid State and Submerged Fermentation for the Production of Bioactive Substances: A Comparative Study. *International Journal of Science and Nature*. Retrieved from <https://www.revistavirtualpro.com/biblioteca/fermentacion-en-estado-solido-y-liquida-sumergida-para-la-produccion-de-sustancias-bioactivas-una-estudio-comparativo>
- Wang, C., Li, Y., (2012). Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnology Advances*, 30(6):1447-1457. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.003>

Zapata, J; Hoyos, M y Quinchía, A. (2005). Parámetros cinéticos de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de un campo magnético variable de baja intensidad y alta frecuencia. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v12n1/v12n1a05.pdf>

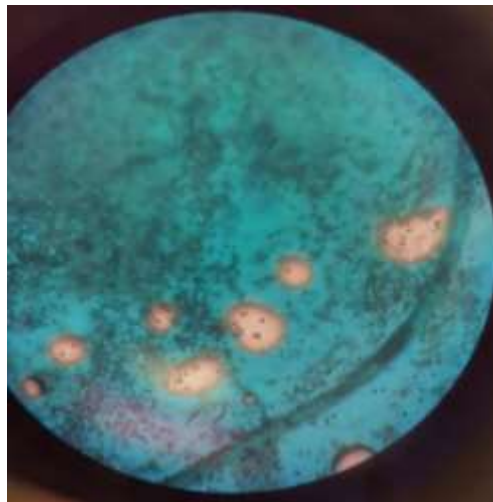
Zarate, L. M. [et. al.] (2014). Extracción y caracterización de almidón nativo de clones promisorios de papa criolla (*Solanum tuberosum*, grupo phureja). Recuperado de: https://www.papaslatinas.org/vol18-1/001_ALM_Zarate_Polanco.pdf

ANEXOS

Anexo 1. *Aspergillus niger* (Caracterización macroscópica)



Anexo 2. *Aspergillus niger* (Caracterización microscópica)



Anexo 3. Preparación de los medios



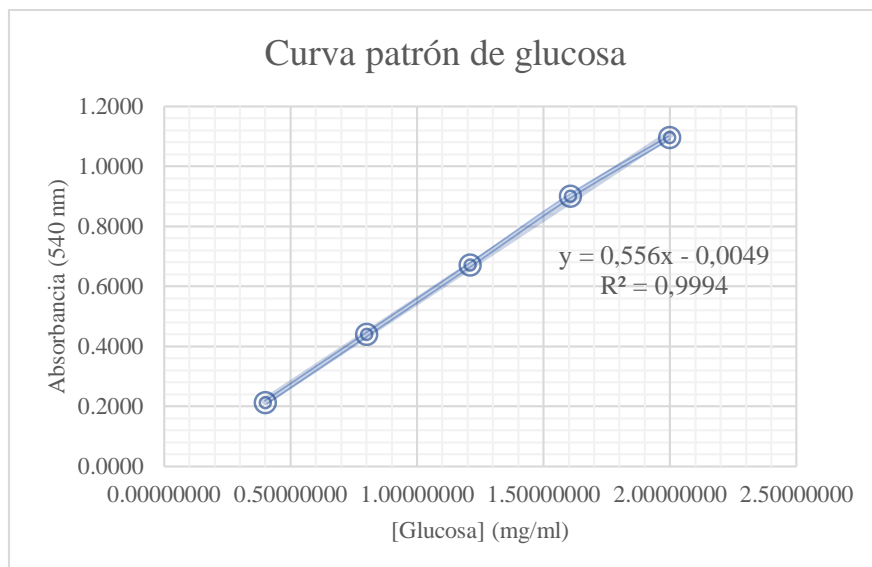
Anexo 4. Inoculación del microorganismo al medio



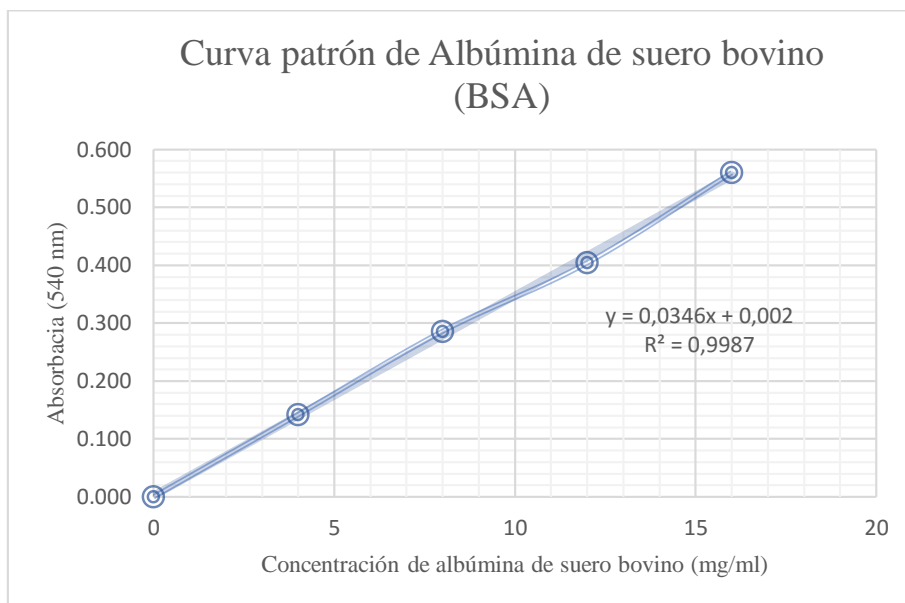
Anexo 5. Proceso de fermentación de los medios



Anexo 6. Curva patrón de glucosa



Anexo 7. Curva patrón de Albúmina de suero bovino



Anexo 8. Muestras para realizar la curva de glucosa y albúmina



Anexo 9. Análisis de varianza del porcentaje de almidón

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>GI</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	1,00555	2	0,502775	0,28	0,7681
Intra grupos	9,03587	5	1,80717		
Total	10,0414	7			

Anexo 10. Análisis de varianza para la concentración de proteínas

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Humedad	56,4089	1	56,4089	807,60	0,0000
B:Composición del medio	0,48513	1	0,48513	6,95	0,0336
bloques	0,0440835	2	0,0220418	0,32	0,7392
Error total	0,488933	7	0,0698475		
Total (corr.)	57,4271	11			

Anexo 11. Análisis de varianza para la concentración de biomasa

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Humedad	0,334334	1	0,334334	190,10	0,0000
bloques	0,00140867	2	0,000704333	0,40	0,6827
Error total	0,0140702	8	0,00175877		
Total (corr.)	0,349813	11			

Anexo 12. Valores obtenidos de la concentración de biomasa

Tiempo (días)	Concentración de biomasa (g/ml)	Ln Concentración de biomasa (g/ml)
0	0,263	-1,336
2	0,571	-0,560
4	0,694	-0,365
6	0,735	-0,308
8	0,801	-0,222
10	0,668	-0,403
12	0,621	-0,476