



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
Y BIOTECNOLOGÍA**

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Evaluación del contenido proteico del raquis de la palma africana
(*Elaeis guineensis*) utilizando *Aspergillus niger*.

Informe Final de Integración Curricular, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniera Biotecnóloga, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

AUTOR: Lisbeth Cristina Dumas Verduga

TUTOR: Lic. MSc. Danae Fernández Rivero

Ambato – Ecuador

Marzo - 2023

APROBACIÓN DEL TUTOR

Lic. MSc. Danae Fernández Rivero.

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final de Integración Curricular ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final de Integración Curricular bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Titulación y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 10 de Febrero del 2023

Lic. MSc. Danae Fernández Rivero

C.I. 1757181209

TUTORA

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Lisbeth Cristina Dumas Verduga, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Lisbeth Cristina Dumas Verduga

C.I. 2300657083

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final de Integración Curricular, 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.

Por constancia firman:

Presidente del Tribunal

Mg. Daniel Alfonso Cabrera Valle

C.I. 1802561595

Dr. Liliana Alexandra Cerda Mejía

C.I. 1804148086

Ambato, 07 de Marzo del 2023

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este presente Informe Final de Integración Curricular 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 Informe Final de la Integración Curricular, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de éste, 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.



Lisbeth Cristina Dumas Verduga

C.I. 2300657083

AUTOR

DEDICATORIA

A mis padres y hermanas que siempre estuvieron conmigo motivándome para culminar mis estudios.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios y a la Virgen María por haberme guiado y protegido en todo este caminar.

A mi familia y amigos que me han brindado su apoyo para seguir adelante y llegar a concluir mi carrera universitaria.

A mi tutora, Lic. MSc. Danae Fernández Rivero, por la paciencia que tuvo al compartirme sus conocimientos y por haber sido mi guía en este trabajo de titulación.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	iv
DERECHOS DE AUTOR.....	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT	xiii
CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO	1
1.1. Antecedentes investigativos	1
1.1.1. Descripción de la palma africana (<i>Elaeis guineensis</i>).....	1
1.1.2. Raquis de <i>E. guineensis</i>	3
1.1.3. Microorganismos empleados en el enriquecimiento proteico de sustratos ..	4
1.1.4. <i>Aspergillus</i>	5
1.1.5. Fermentaciones	7
1.2. Objetivos.....	10
1.2.1. Objetivo general	10
1.2.2. Objetivos específicos	10
CAPÍTULO II.....	11
METODOLOGÍA	11
2.1. Materiales	11
2.1.1. Material Vegetal.....	11

2.1.2.	Material Biológico	11
2.1.3.	Material de Laboratorio.....	11
2.1.4.	Insumos y materiales de escritorio.....	12
2.1.5.	Equipos.....	13
2.1.6.	Reactivos.....	14
2.2.	Métodos	14
2.2.1.	Hipótesis.....	14
2.2.2.	Señalamiento de las variables	15
2.2.3.	Sección experimental	16
CAPÍTULO III.....		22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		22
3.1.	Análisis y discusión de resultados.....	22
3.1.1.	Caracterización macroscópica y microscópica de <i>A. niger</i>	22
3.1.2.	Caracterización fisicoquímica del sustrato	24
3.1.3.	Determinación de la concentración de proteínas	25
3.1.4.	Determinación de la concentración de biomasa	28
3.1.5.	Determinación de los parámetros cinéticos de fermentación	31
3.2.	Verificación de la hipótesis	34
CAPÍTULO IV		36
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		36
4.1.	Conclusiones.....	36
4.2.	Recomendaciones.....	37
MATERIALES DE REFERENCIA		38
	Referencias Bibliográficas.....	38
	Anexos.....	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Descripción taxonómica de <i>E. guineensis</i>	2
Tabla 2 Componentes del raquis de <i>E. guineensis</i>	3
Tabla 3 Materiales de laboratorio.....	11
Tabla 4 Insumos y materiales de escritorio.....	12
Tabla 5 Equipos de laboratorio.....	13
Tabla 6 Reactivos de laboratorio.....	14
Tabla 7 Caracterización macroscópica de <i>A. niger</i>	22
Tabla 8 Caracterización microscópica del <i>A. niger</i>	23
Tabla 9 Caracterización fisicoquímica del raquis de <i>E. guineensis</i>	24
Tabla 10 Valores óptimos de la concentración de proteínas y biomasa.....	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Caracterización microscópica de <i>A. niger</i>	6
Figura 2 Diagrama de Pareto Estandarizado para Concentración de proteínas.....	26
Figura 3 Efectos principales para la concentración de proteínas.....	27
Figura 4 Diagrama de Pareto Estandarizado para Concentración de biomasa.....	28
Figura 5 Efectos principales para la concentración de biomasa.....	29
Figura 6 Diagrama de Superficie de Respuesta Estimada.....	30
Figura 7 Curva de crecimiento de <i>A. niger</i>	32
Figura 8 Fase exponencial del crecimiento de <i>A. niger</i>	34

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1 Concentración de biomasa.....	19
Ecuación 2 Velocidad específica de crecimiento.....	20
Ecuación 3 Tiempo de duplicación.....	20

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Medio con residuos orgánicos de limón para el aislamiento de <i>A. niger</i>	44
Anexo 2 Raquis de <i>E. guineensis</i>	44
Anexo 3 Secado de sustrato raquis en el secador de bandejas.....	45
Anexo 4 Análisis de pH en el sustrato raquis.....	45
Anexo 5 Análisis de humedad en el sustrato raquis.....	46
Anexo 6 Fermentación de raquis con inóculo de <i>A. niger</i>	46
Anexo 7 Toma de muestras durante el proceso fermentativo.....	47
Anexo 8 Muestras tomadas durante el proceso fermentativo.....	47
Anexo 9 Curva patrón de albúmina de suero bovino (BSA).....	48
Anexo 10 Análisis de Varianza para Concentración de proteínas.....	48
Anexo 11 Análisis de Varianza para Concentración de biomasa.....	49
Anexo 12 Control de los factores sobre la concentración de proteínas.....	49
Anexo 13 Control de los factores sobre la concentración de biomasa.....	50

RESUMEN

El raquis de la palma africana (*Elaeis guineensis*) es considerado uno de los subproductos más difíciles de manejar en las extractoras de aceite, al ser un material sólido que causa contaminación ambiental, sin embargo, con los avances biotecnológicos se puede aprovechar este residuo para darle valor agregado. Es por ello que en el presente trabajo se realizó un incremento proteico del raquis de *E. guineensis*, para lo cual se llevó a cabo una caracterización fisicoquímica del sustrato determinando pH, porcentaje de humedad y concentración de proteínas. Además, se aisló el hongo *Aspergillus niger* a partir de residuos orgánicos de limón, el cual fue caracterizado macroscópica y microscópicamente para posteriormente utilizarlo en la fermentación en estado sólido. En la investigación fueron formulados cuatro medios mediante un diseño factorial 2 a la 2, donde se determinó que la concentración del inóculo (5000 y 50 000 conidios por gramo a la menos 1 de medio) y el tiempo de fermentación (8 y 12 días) influyen significativamente sobre el enriquecimiento proteico de *E. guineensis*, siendo el medio con una concentración de 50000 conidios por gramo a la menos 1 y 8 días de fermentación el que alcanzó valores óptimos de 15,48 mg por mL a la menos 1 en la concentración de proteínas y 1,20 g por mL a la menos 1 para la concentración de biomasa. Finalmente, se determinaron los parámetros cinéticos de *A. niger* para conocer su comportamiento, obteniendo una velocidad específica de crecimiento de 0,13 horas a la menos 1 y un tiempo de duplicación de 5,35 horas.

Palabras clave: Raquis, *Elaeis guineensis*, proteínas, fermentación en estado sólido, *Aspergillus niger*, gestión ambiental, gestión en residuos sólidos.

ABSTRACT

The rachis of the African palm (*Elaeis guineensis*) is considered one of the most difficult by products to handle in oil extractors, as it is a solid material that causes environmental pollution; however, with biotechnological advances, this residue can be used to give it value added. That is why in the present work a protein increase of the rachis of *E. guineensis* was carried out, for which a physicochemical characterization of the substrate was made, determining pH, moisture percentage and protein concentration. In addition, the *Aspergillus niger* fungus was isolated from organic lemon residues, which was characterized macroscopically and microscopically to later use it in solid state fermentation. In the investigation, four media were formulated using a 2 to 2 factorial design, where it was determined that the concentration of the inoculum (5000 and 50 000 conidia per gram at least 1 of media) and the fermentation time (8 and 12 days) significantly influence the protein enrichment of *E. guinnensis*, being the medium with a concentration of 50 000 conidia per gram at least 1 and 8 days of fermentation the one that reached optimum values of 15,48 mg per mL at least 1 in the protein concentration and 1,20 g per mL at least 1 for the biomass concentration. Finally, the kinetic parameters of *A. niger* were determined to know its behavior, obtaining a specific growth rate of 0,13 hours at least 1 and a doubling time of 5,35 hours.

Keywords: Rachis, *Elaeis guineensis*, proteins, solid state fermentation, *Aspergillus niger*, environmental management, solid waste management.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos

1.1.1. Descripción de la palma africana (*Elaeis guineensis*)

La palma africana (*Elaeis guineensis*) es una oleaginosa originaria de las costas occidentales de África, de donde se puede extraer aceite. En los últimos años ha tenido un aumento en su producción a nivel mundial, superando al aceite de soja, ya que se emplea para producir biodiesel. Además, el aceite extraído de la palma es utilizado para elaborar cosméticos, alimentos, cremas, jabones y demás productos, lo que significa que su demanda va incrementando, siendo el 27,58% de la producción de aceites vegetales y el 51% de las exportaciones de aceites y grasas, representando un incremento del 8% desde 1996 hasta 2017 (Anaya & Molina, 2018; Leyva et al., 2019).

E. guineensis es un cultivo tropical considerado uno de los principales sembríos agroindustriales en el Ecuador, con gran importancia económica, dado el aumento de la demanda de aceite de palma. Por lo cual, según el INEC en el año 2020 la superficie plantada fue de 256.854 hectáreas, mientras que la superficie cosechada fue de 188.469 hectáreas. De la misma manera, la producción en ese año fue de 2.446.312 toneladas y las ventas de 1.983.890 toneladas. Es importante mencionar que el cultivo puede comenzar a dar frutos entre los dos y tres primeros años y llegar a tener una vida productiva de 50 años, siendo su mayor producción entre los 20 y 30 años (Briones et al., 2019; INEC, 2021).

La extracción de aceite de *E. guineensis* conlleva varios procesos que son: recepción de los racimos de fruta fresca; esterilización de los racimos, con la finalidad de ablandar el fruto; desfrutación, para separar el fruto de los racimos; digestión, donde se macera el fruto; prensado, para comprimir el fruto digerido; clarificación, donde se purifica el aceite separando los materiales sólidos existentes y el agua. De este procedimiento se obtienen desechos agroindustriales como el raquis, específicamente en la etapa de desfrutación, ya que genera el racimo vacío (Malacatus et al., 2017).

1.1.1.1. Taxonomía

La Tabla 1 sintetiza la taxonomía de *E. guineensis*, a partir de la base de datos para nomenclatura “Trópicos”.

Tabla 1

Descripción taxonómica de E. guineensis

Taxonomía	
Clase	Equisetopsida C. Agardh
Subclase	Magnoliidae Novák ex Takht.
Superorden	Lilianaes Takht.
Orden	Arecales Bromhead
Familia	Arecaceae Bercht. & J. Presl
Género	<i>Elaeis</i>
Especie	<i>Elaeis guineensis</i>

Fuente: Missouri Botanical Garden, (2022).

1.1.2. Raquis de *E. guineensis*

El raquis de *E. guineensis* es uno de los subproductos que se generan en la obtención del aceite de palma, considerado como un problema de manejo para la mayoría de las empresas, ya que es un desecho sólido perjudicial para el medio ambiente, debido a que no tiene ningún proceso complementario para su correcto descarte. Aunque se ha buscado alternativas para darle uso al raquis como compostaje y abono, sigue creciendo la cantidad de este desecho, por ello se ha proyectado que para los próximos 10 años se producirán más de 100 millones de toneladas, que serán desechadas si no se encuentra alguna utilidad (León & Santacruz, 2021; Pineda & Durán, 2019).

1.1.2.1. Composición del raquis de *E. guineensis*

En la Tabla 2 se presentan los componentes principales del raquis de *E. guineensis*.

Tabla 2

Componentes del raquis de E. guineensis

Componente	Cantidad (%)
Celulosa	59,7
Hemicelulosa	22,1
Lignina	18,1
Cenizas	3,8

Fuente: Jirón et al., (2022).

El raquis es un residuo lignocelulósico, que puede ser aprovechado por microorganismos como los hongos, porque poseen la capacidad de degradar la celulosa y lignina mediante enzimas que son secretadas al medio para obtener los nutrientes del subproducto. Por lo tanto, este compuesto orgánico puede emplearse en el ciclo productivo de las empresas, lo que contribuiría al mejoramiento ambiental (**Bardales et al., 2020**).

En la actualidad el raquis es considerado como uno de los residuos más prometedores, ya que, al darle un valor agregado, puede ser utilizado en procesos sencillos para generar grandes beneficios, como enriquecerlo con proteína microbiana, con la finalidad de conseguir alimento animal rico en proteínas (**Jirón et al., 2022; Pineda & Durán, 2019**).

1.1.3. Microorganismos empleados en el enriquecimiento proteico de sustratos

Los microorganismos que se usan para generar proteínas deben poseer características, tales como: pocos requerimientos nutricionales, crecimiento rápido y un sistema de fácil procesamiento. Estos requisitos los cumplen ciertos hongos como *Aspergillus niger* y levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, pero el microorganismo a utilizar depende del sustrato y del proceso al que se someterá (**Lübeck & Lübeck, 2022**).

Sin embargo, en la mayoría de procedimientos donde se realizan incrementos proteicos ha dado mejores resultados con *A. niger*, debido a que es un hongo que tiene la capacidad de crecer aeróbicamente sobre cualquier materia orgánica, es decir, que presenta excelentes propiedades para el cultivo lo que hace posible la producción a gran escala, y sus productos son considerados como GRAS (*Generally Regarded As Safe*) por la FDA, lo que permite su uso en la industria alimentaria tanto para el hombre, como para los animales (**Li et al., 2020**).

1.1.4. *Aspergillus*

Aspergillus es un género de hongos que son considerados filamentosos, debido a que en su estructura poseen cadenas celulares semejantes a filamentos, que se conocen como hifas especializadas o conidióforos y puede tener reproducción sexual (formación de ascosporas en el interior de ascas) y asexual (formación de conidios) (Atallah et al., 2022).

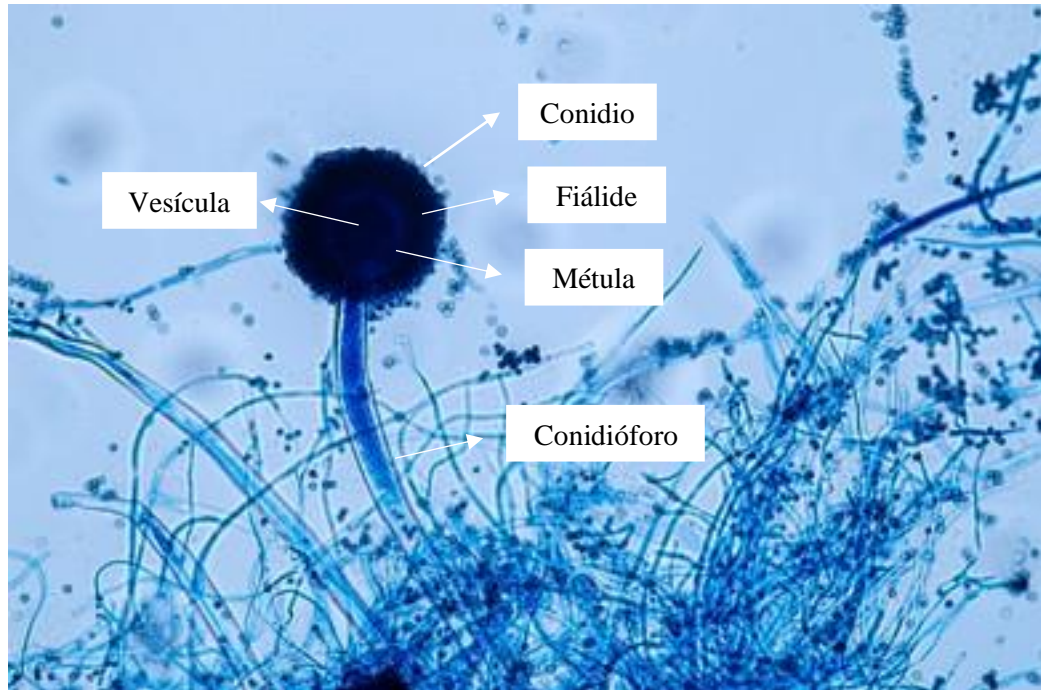
Existe una diversidad de especies de *Aspergillus* que poseen distintos caracteres morfológicos, biológicos y ecológicos, lo que se relaciona con la capacidad que tienen para utilizar una amplia variedad de sustratos orgánicos y su fácil adaptación a diferentes condiciones ambientales. Estos hongos viven en vegetales y frutas putrefactas, y en cualquier tipo de materia orgánica en descomposición, como alimentos enlatados abiertos o ricos en carbohidratos, en habitaciones de hospital y como saprófitos en el suelo (Atallah et al., 2022; Son & Park, 2021).

1.1.4.1. *Aspergillus niger*

El hongo *A. niger* es de rápido crecimiento, que en principio presenta un aspecto blanco grisáceo, pero con el paso del tiempo adquiere pigmentos amarillentos que se cubren con puntos oscuros conocidos como cabezas conidiales, conformadas por conidios, fiálides y métulas, que envuelven la vesícula presentando una forma radiada típica. Los conidióforos son largos con una pared oscura y lisa, mientras que los conidios producidos por las fiálides, son globosos de color marrón oscuro o negro con paredes rugosas (Figura 1). Generalmente se encuentra en el moho negro de las frutas y verduras como cebollas, lechugas, uvas y limón, es decir, que es un hongo típico del deterioro de los alimentos (Atallah et al., 2022).

Figura 1

Caracterización microscópica de *A. niger*



Adaptado de la imagen Creative Commons de Thongdumhyu R/shutterstock.com, (2018)

La especie *A. niger* tiene importancia biotecnológica e industrial, dado que posee la capacidad de producir metabolitos, como el ácido glucónico, ácido gálico y ácido cítrico; también se puede obtener enzimas, como proteasas, pectinasas, glucosa oxidasas y celulasas. De la misma manera, el sistema enzimático del hongo tiene la capacidad de hidrolizar y oxidar enlaces de celulosa y lignina liberando moléculas de glucosa que son utilizadas por microorganismos en la fermentación (**Bardales et al., 2020**).

Además, dispone de excelentes condiciones de adaptación para la secreción de proteínas empleando la fermentación sumergida y en estado sólido. Por lo tanto, es considerado un

organismo modelo para diversas áreas de investigación, como el análisis de la secreción de proteínas eucariotas y mecanismos moleculares para el desarrollo de la fermentación (Behera, 2020; Li et al., 2020).

1.1.5. Fermentaciones

La fermentación es un proceso bioquímico donde las materias orgánicas sufren una transformación por la acción de microorganismos, ya que se los considera como iniciadores en las fermentaciones. Además, es ampliamente utilizada para elaborar productos alimentarios y de consumo diario, ya que los procesos son rentables (Lübeck & Lübeck, 2022).

Es así como, para mantener los costos de producción accesibles, se busca llevar a cabo la fermentación con material vegetal lignocelulósico, donde se pueden usar varios huéspedes microbianos, como los hongos filamentosos. Para el cultivo y la producción de hongos puede emplearse la fermentación sumergida (FS) y en estado sólido (FES), que son las más conocidas (Li et al., 2020).

1.1.5.1. Fermentaciones en estado líquido

En las fermentaciones estado líquido (FEL) o fermentaciones sumergidas (FS), generalmente el sustrato se incuba en fermentadores cilíndricos agitados o en recipientes de acero inoxidable. En esta fermentación, los hongos pueden asimilar fuentes de nitrógeno inorgánico y sintetizar aminoácidos, lo que les permite desarrollar proteínas empleando materias orgánicas que no posean proteínas con una fuente de nitrógeno, por

ello, la producción se realiza en medio líquido con agua libre y nutrientes (**Lübeck & Lübeck, 2022**).

La fermentación sumergida comúnmente se realiza en forma discontinua (lotes), semicontinua (lotes alimentados), y de manera continua. En la fermentación por lotes, se inocula la cepa fúngica en el medio al inicio del proceso; en lotes alimentados, los nutrientes se van agregando durante la fermentación, con la finalidad de que aumente la densidad celular y la producción del hongo; la fermentación continua es similar a lotes alimentados, ya que se añaden los nutrientes mientras el proceso está en marcha, pero los productos se van recuperando de forma constante durante el procedimiento, por lo que es necesario que exista una producción ininterrumpida (**Saelee, 2022**).

Es importante mencionar que en estos procesos se pueden modificar parámetros operativos, tales como pH, temperatura, transferencia de masa, oxígeno y la alimentación continua de nutrientes para las cepas fúngicas, lo que ayuda a obtener altos rendimientos de productos (**Lübeck & Lübeck, 2022**).

1.1.5.2. Fermentaciones en estado sólido

En las fermentaciones en estado sólido (FES) se coloca el sustrato sólido provisto de oxígeno en bandejas o tanques con temperatura y humedad controladas para el crecimiento adecuado de los microorganismos. Además, esta fermentación ha sido ampliamente empleada para alimentos con altos niveles de micoproteínas, debido a que imita el hábitat de crecimiento natural de los hongos filamentosos al secretar enzimas (**Cerda et al., 2019**).

Se considera que existen cuatro biorreactores principales para la FES, los cuales son: lechos empacados, biorreactores agitados, tambores giratorios y bandejas. La selección de ellos depende del producto que se desee obtener, ya sea una proteína secretada o un producto alimenticio, debido a que en este último el sustrato fermentado representaría el producto final (**Lübeck & Lübeck, 2022**).

Aunque los dos tipos de fermentaciones son eficientes, se ha demostrado mayores rendimientos en la FES, ya que los microorganismos inoculados mejoran su digestibilidad y la calidad nutricional de los productos o subproductos agrícolas, para posteriormente convertirlos en alimento animal. Por lo tanto, se considera un proceso biotecnológico porque permite a los microorganismos crecer sobre un sustrato, tomando en cuenta condiciones de pH, temperatura, humedad y aireación, pues, de esta manera se produce un aumento de la biomasa microbiana, conllevando a un incremento del contenido proteico del material empleado (**Srivastava et al., 2019**).

Se ha evidenciado el éxito del enriquecimiento proteico de la FES utilizando *A. niger* con distintos sustratos, como es el caso de **Adu et al., (2018)**, que usó desechos agroindustriales de camote y sandía, para aumentar sus niveles proteicos, de lo cual se obtuvo excelentes resultados, logrando sustratos ricos en proteínas para brindarles valor agregado.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

- Enriquecer proteicamente el raquis de *Elaeis guineensis* utilizando *Aspergillus niger*.

1.2.2. Objetivos específicos

- Aislar e identificar una cepa de *Aspergillus niger* a partir de residuos orgánicos en medio Agar Papa Dextrosa (PDA).
- Evaluar los factores de concentración del inóculo y tiempo de fermentación de *Aspergillus niger* en el raquis de *Elaeis guineensis*.
- Analizar la cinética de crecimiento de *Aspergillus niger* en el medio donde se obtuvo el mayor incremento proteico.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Materiales

2.1.1. Material Vegetal

- Raquis de la palma africana (*Elaeis guineensis*)

2.1.2. Material Biológico

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

2.1.3. Material de Laboratorio

Tabla 3

Materiales de laboratorio

Materiales	Cantidad
Caja de cubreobjetos	1
Espátula	2
Asa bacteriológica	2
Cajas Petri	20

Materiales	Cantidad
Matraces Erlenmeyer (100 ml)	6
Recipiente de vidrio (100 ml)	1
Recipiente de vidrio (1000 ml)	1
Balones de aforo fondo plano (100 ml)	1
Balones de aforo fondo plano (1000 ml)	1
Vasos de precipitación (250 ml)	3
Tubos de ensayo bacteriológicos	15
Gradilla	2
Puntas para micropipeta	100
Mechero de bunsen	4
Asa digralsky	2
Agitador magnético	2
Cámara de Neubauer	1
Tubos Eppendorf (2 ml)	1 paquete
Tubos Falcon (2 ml)	1 paquete

2.1.4. Insumos y materiales de escritorio

Tabla 4

Insumos y materiales de escritorio

Insumos y materiales	Cantidad
Papel aluminio	1 rollo
Mascarillas	Caja x 100 unidades
Papel film	1 rollo
Alcohol antiséptico	1 galón

Insumos y materiales	Cantidad
Gel antibacterial	1 frasco
Jabón líquido	1 frasco
Guantes de nitrilo	2 cajas x 50 pares
Computadora	1
Esferos	5 unidades

2.1.5. Equipos

Tabla 5

Equipos de laboratorio

Equipos	Cantidad
Autoclave (Trident EA – 632)	1
Cámara de flujo laminar (NOVATECH)	1
Balanza analítica (Ohaus N13M1U)	1
Secadero de bandejas (OLYMPUS)	1
Plancha de calentamiento (Corning PC-420D)	1
Incubadora (Mettler)	1
Pipeta automática (Rongtai)	1
Centrífuga (LW Scientific)	1
Espectrofotómetro (Fisher Scientific ACCUS CAN GO)	1
Estufa (Mettler)	1
Incubador agitador orbital (New Brunswick Scientific)	1
Microscopio óptico (OLYMPUS CX21)	1
Balanza de humedad (Mettler Toledo HX204)	1
Potenciómetro (Mettler Toledo ACCUM ET AB200)	1
Molino manual (Corona)	1

2.1.6. Reactivos

Tabla 6

Reactivos de laboratorio

Reactivo	Cantidad
Agar Papa Dextrosa (PDA) (TM Media)	9,75 g
Azul de algodón de lactofenol (LCB) (La Casa del Químico)	10 µl
Cloruro de sodio (NaCl) (Novachem)	100 ml
Sulfato de cobre pentahidratado (CuSO ₄ .5H ₂ O) (Mastercop)	1,5 g
Tartrato de sodio y potasio (KNaC ₄ H ₄ O ₆ .4H ₂ O) (Merck)	6 g
Hidróxido de sodio (NaOH) (Novachem)	300 ml
Agua destilada (Fabribat Cia. Ltda)	1 botellón

2.2. Métodos

2.2.1. Hipótesis

2.2.1.1. Hipótesis nula

Los factores de concentración del inóculo y tiempo de fermentación no influyen significativamente sobre el enriquecimiento proteico del raquis de palma africana (*Elaeis guineensis*) durante el proceso fermentativo de *Aspergillus niger*.

2.2.1.2. Hipótesis alternativa

Los factores de concentración del inóculo y tiempo de fermentación influyen significativamente sobre el enriquecimiento proteico del raquis de palma africana (*Elaeis guineensis*) durante el proceso fermentativo de *Aspergillus niger*.

2.2.2. Señalamiento de las variables

2.2.2.1. Variables dependientes

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

2.2.2.2. Variables independientes

- Concentración del inóculo (5000 y 50 000 conidios/g de medio)
- Tiempo de fermentación (8 y 12 días)

2.2.3. Sección experimental

2.2.3.1. Aislamiento e identificación de *A. niger*

Se tomaron 10 g de sustratos orgánicos de limón que se depositaron en 90 mL de agua destilada (Anexo 1). La mezcla obtenida se agitó por 20 minutos, de la cual se realizaron diluciones de 1:10, 1:100 y 1:1000. Seguidamente, se tomaron alícuotas de 100 µL de cada dilución y se colocaron en cajas Petri con el medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA), lo fue incubado por cinco días a 28°C. Pasado el tiempo mencionado, se seleccionaron las colonias desarrolladas para repetir la siembra, de lo cual se obtuvo el aislamiento y purificación de *A. niger* (Pu et al., 2018; Villalba et al., 2018).

Para la identificación se realizó una caracterización macroscópica, donde se evaluó: forma, tipo de colonia y color en el anverso y reverso. De la misma manera, en la caracterización microscópica, se analizó: esporulación, micelio, conidióforo, presencia o ausencia de esporas y forma de esporas, donde se realizó una tinción empleando azul de algodón de lactofenol (LCB) para diferenciar bajo el microscopio el hongo aislado (Villalba et al., 2018).

2.2.3.2. Obtención del sustrato

Se recolectó raquis prensado de *E. guineensis* de la extractora de aceite “San Daniel”, el cual fue transportado dentro de saquillos (Anexo 2), hacia los laboratorios de la Unidad Operativa de la Dirección de Investigación y Desarrollo (UODIDE) de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

El raquis fue sometido a un proceso de secado empleando el secador de bandejas a 72°C por 24 horas (Anexo 3), con la finalidad de eliminar el agua presente en el residuo. De esta manera, el material seco se trituró con un molino manual, donde se consiguió el sustrato en polvo que fue utilizado para el crecimiento microbiano (**León & Santacruz, 2021**).

2.2.3.3. Caracterización fisicoquímica del sustrato

2.2.3.3.1. Determinación del pH

Se pesaron 5 gramos del sustrato en polvo en la balanza analítica, lo cual fue disuelto en agua destilada y filtrado. De esta manera, se determinó el pH por triplicado para evitar errores sistemáticos, empleando el potenciómetro previamente calibrado (Anexo 4) (**Caicedo, 2020**).

2.2.3.3.2. Determinación del porcentaje de humedad

Se utilizaron 3 gramos del sustrato en polvo, que fueron ubicados en el plato de la balanza de humedad con exposición a rayos infrarrojos, con la finalidad de que la irradiación de calor evapore el agua contenida en el interior de la muestra (Anexo 5). Es así como, el agua eliminada fue la diferencia entre el peso inicial y final (**Caicedo, 2020**).

2.2.3.4. Proceso fermentativo

El proceso fermentativo se realizó inoculando *A. niger* en el sustrato. Luego se colocó el medio en el incubador agitador orbital a 30°C por 12 días con una velocidad de agitación de 130 rpm. Se tomaron muestras pasando dos días para estimar la concentración de proteínas y biomasa, específicamente a los 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 días (Anexo 6, 7 y 8). Después se elaboró una curva de crecimiento con el logaritmo de concentración de biomasa y el tiempo (**Berenize et al., 2020**). Es importante mencionar que los factores a evaluar fueron: concentración del inóculo (5000 y 50000 conidios/g de medio) y tiempo de fermentación (8 y 12 días), mientras que la variable respuesta fue: concentración de proteínas y biomasa.

2.2.3.4.1. Determinación de la concentración de proteínas

Se utilizó el método de Biuret para determinar la concentración de proteínas, para lo cual se pesó 2 g de la muestra de fermentación y se distribuyó en un mortero para añadir 8 mL de NaCl al 1%, con la finalidad de disolver la muestra. Después se centrifugó lo macerado a 4000 rpm durante 5 minutos y se recolectó el sobrenadante. Seguidamente se tomó 0,1 mL del sobrenadante para colocarlo en la celda espectrofotométrica con 0,9 mL del reactivo Biuret, que fue preparado utilizando sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), tartrato de sodio y potasio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e hidróxido de sodio (NaOH) al 10%. Esta mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente por 20 minutos. Al pasar el tiempo, se estableció el valor de la intensidad de color con la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm. La concentración de proteínas se determinó utilizando una curva patrón de albúmina de suero bovino (Anexo 9) (**Berenize et al., 2020**).

2.2.3.4.2. Determinación de la concentración de biomasa

Se determinó la concentración de biomasa mediante el método gravimétrico de peso seco, donde se pesó el tubo de centrifuga vacío, seguidamente se colocó 5 mL de la muestra del fermentado y se centrifugó a 4000 rpm por 10 minutos. El pellet obtenido se lavó y colocó en la estufa a 60°C durante 24 horas. Después se pesó el tubo con la muestra seca para calcular la diferencia de ambos pesos, tomando en cuenta el volumen de muestra empleada (Berenize et al., 2020).

$$[B] = \frac{PMS - PV}{V}$$

Ecuación 1. Concentración de biomasa.

$$[B] = \text{Concentración de biomasa} \left(\frac{g}{ml} \right)$$

$PMS =$ Peso del tubo con la muestra seca (g)

$PV =$ Peso del tubo vacío (g)

$V =$ Volumen de la muestra tomada (ml)

2.2.3.5. Cinética de crecimiento del *A. niger*

Se analizó la cinética de crecimiento del *A. niger* en el medio que poseía una concentración de 50 000 conidios/g con 8 días de fermentación, en el que se obtuvo la mayor concentración de proteínas y biomasa.

2.2.3.5.1. Determinación de los parámetros cinéticos de fermentación

2.2.3.5.1.1. Determinación de la velocidad específica de crecimiento

Empleando el medio con 50 000 conidios/g y 8 días de fermentación, se determinó el valor de la velocidad específica de crecimiento (μ) con la pendiente de la curva logarítmica de la biomasa contra el tiempo en la región de crecimiento exponencial (Castañeda, 2019).

$$m = \mu$$

Ecuación 2. Velocidad específica de crecimiento.

$m =$ Pendiente

$\mu =$ Velocidad específica de crecimiento

2.2.3.5.1.2. Determinación del tiempo de duplicación

Se determinó el tiempo de duplicación o de generación utilizando la siguiente expresión (Castañeda, 2019).

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

Ecuación 3. Tiempo de duplicación.

$t_d =$ Tiempo de duplicación

2.2.3.6. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se empleó el software Statgraphics Centurion versión XVIII, donde se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un diseño experimental 2^2 , con lo cual se determinó si existen diferencias significativas entre la concentración del inóculo (5000 y 50000 conidios/g de medio) y el tiempo de fermentación (8 y 12 días) sobre el proceso fermentativo de *A. niger* en el sustrato de raquis. Además, se optimizó la variable de concentración de proteínas y biomasa para encontrar dónde existe mayor crecimiento del microorganismo (**Berenize et al., 2020; Velásquez & Uribe, 2019**).

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

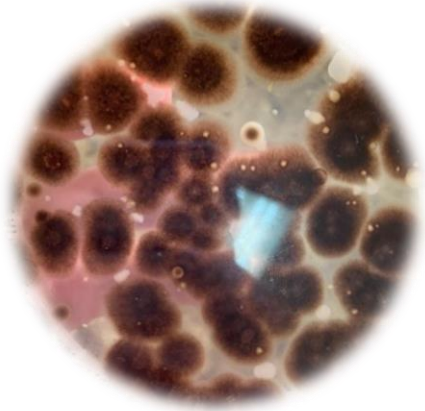
3.1. Análisis y discusión de resultados

3.1.1. Caracterización macroscópica y microscópica de *A. niger*

Como se observa en la Tabla 7 y 8 se realizó una caracterización macroscópica y microscópica de *A. niger*.

Tabla 7

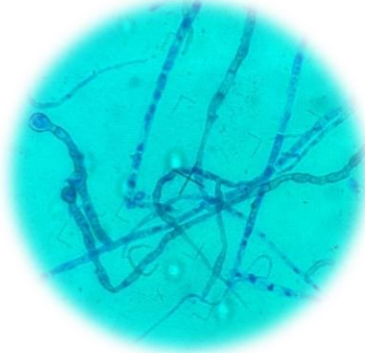
Caracterización macroscópica de A. niger

Caracterización	<i>Aspergillus niger</i>	Imagen
Forma	Filamentoso	
Tipo de colonia	Algodonoso	
Borde	Irregular	
Textura	Polvoriento	
Color en el anverso	Marrón	
Color en el reverso	Amarillo	

Nota: Imagen de autoría

Tabla 8

Caracterización microscópica del A. niger

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

Nota: Imagen de autoría

A. niger es un hongo filamentoso de rápido crecimiento que tiene la capacidad de desarrollarse en una gran variedad de sustratos naturales y artificiales, principalmente en el suelo y materiales orgánicos. Este hongo es considerado de gran importancia biotecnológica e industrial, porque puede producir enzimas, ácidos orgánicos, proteínas y otros productos de su metabolismo (Cairns et al., 2021).

Díaz et al., (2021) empleó medio Agar Papa Dextrosa (PDA) para aislar cepas de *Aspergillus*, de las cuales seleccionó las colonias que mostraban la morfología esperada de *A. niger*, es decir, las cepas que poseían un color marrón o negro en el anverso y en su vista posterior un color blanco a amarillo, además de su colonia algodonosa con textura polvorienta, lo cual coincide con la información obtenida que se observa en la Tabla 7.

De la misma manera, **Cortês et al., (2022)** describe que *A. niger* bajo el microscopio presenta un conidióforo largo con pared lisa, micelio tabicado, fiálides cubriendo la vesícula, presencia de esporas globulares, y conidios que pueden estar de manera globosas, subglobosas, lisas o elípticas, similar a la información registrada en la Tabla 8. Por lo tanto, se considera que *A. niger* es un hongo que puede ser identificado de manera sencilla macroscópica y microscópicamente por las características propias que posee.

3.1.2. Caracterización fisicoquímica del sustrato

En la Tabla 9 se presentan los valores obtenidos de la caracterización fisicoquímica del raquis de *E. guineensis*.

Tabla 9

Caracterización fisicoquímica del raquis de E. guineensis

Caracterización	Valores
pH	8,42 ± 0,06
Humedad (%)	8,24 ± 0,06
Concentración de proteínas (mg/ml)	2,94 ± 0,21

Jiménez et al., (2020) realizó un enriquecimiento proteico de Pasto de Taiwán y Sorgo negro forrajero, donde hubo un descenso del pH de 6,16 a 4,93 en el Pasto de Taiwán, y de 6,09 a 4,81 en el Sorgo negro forrajero, por lo que manifiesta que al iniciar la fermentación el pH debe tener valores alcalinos, debido a que al pasar los días tiende a disminuir encontrándose en valores ácidos, lo que generalmente sucede porque el calor generado provoca que el nitrógeno amoniacal se volatilice durante la síntesis proteica.

Este estudio confirma que los valores de pH alcalinos obtenidos en la Tabla 9 son ideales para que pueda darse la fermentación.

De la misma manera, la humedad del sustrato plasmada en la tabla 9 fue de $8,24 \pm 0,06$, que coincide con el valor de humedad de $7,13 \pm 0,10$ que **Valle et al., (2019)** obtuvo al realizar una caracterización fisicoquímica del raquis de *E. guineensis*. Demostrando que un bajo contenido de humedad es idóneo para una fermentación exitosa, ya que favorece la estabilidad de las propiedades funcionales, organolépticas y fisicoquímicas.

La concentración de proteínas registrada en la Tabla 9 es relativamente baja, lo cual demuestra que el raquis de *E. guineensis* es un sustrato que puede ser considerado como prometedor para ser sometido a un incremento proteico, debido a que al poseer una cantidad elevada de celulosa (59,7%) es ideal para que el microorganismo crezca y por tanto pueda darse un aumento en la concentración de proteínas (**Jirón et al., 2022**).

3.1.3. Determinación de la concentración de proteínas

En el análisis de varianza (ANOVA) para la concentración de proteínas se puede observar que los factores: concentración del inóculo (A) y tiempo de fermentación (B) presentaron un Valor-P menor a 0,05 para un nivel de confianza del 95% (Anexo 10). Según **Thierer (2020)** estos resultados demuestran que ambos factores influyeron significativamente sobre la concentración de proteínas, al tener una significancia diferente de cero.

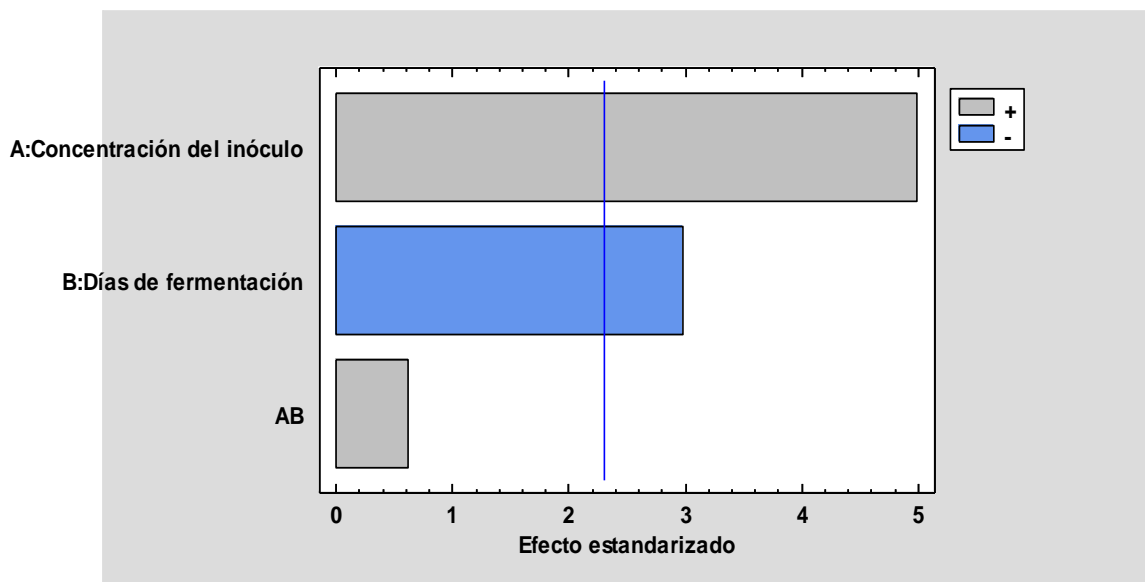
El Diagrama de Pareto refleja la magnitud absoluta del efecto estandarizado de los factores que influyen significativamente, es decir, cuánto afecta cada factor en los ensayos realizados. Es así, que se utiliza como una prueba estadística, dado que, si el valor crítico

de la distribución t de Student con ν grados de libertad que hacen referencia al error del análisis, es menor al valor absoluto del efecto estandarizado, se rechaza la hipótesis nula. Es importante mencionar que en el eje x se grafica el efecto estandarizado en valor absoluto y el valor crítico se simboliza con una línea azul en el diagrama (Alkiayat, 2021; Harvey & Sotardi, 2018).

Para la concentración de proteínas en el Diagrama de Pareto (Figura 2) se puede evidenciar que el factor de concentración del inóculo incide positivamente sobre los días de fermentación, además, ambos factores exceden la línea del valor crítico de la distribución t de Student, por lo tanto, son estadísticamente distintos de cero. De esta manera, se puede contrastar lo descrito en el análisis de varianza al verificar que los factores poseen una influencia significativa sobre la fermentación.

Figura 2

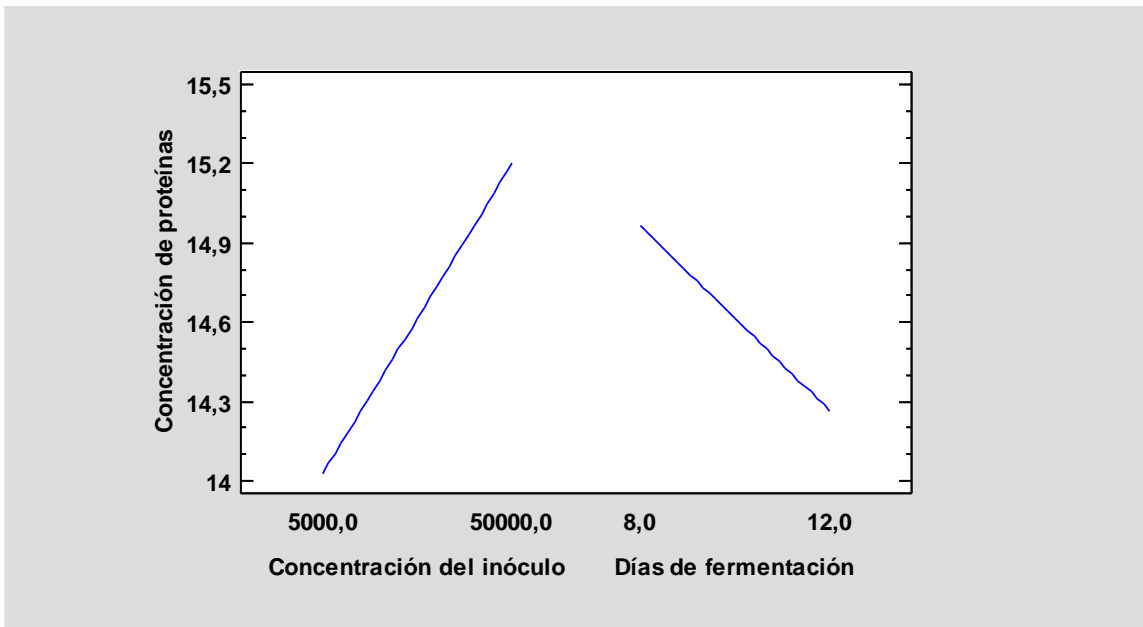
Diagrama de Pareto Estandarizado para Concentración de proteínas



Con respecto a el Gráfico de Efectos Principales (Figura 3) se puede analizar que mientras aumentan los días de fermentación de 8 a 12, hay una disminución en la concentración del inóculo. También, se puede observar que con una concentración de 50000 conidios/g de medio con 8 días de fermentación se da una mayor concentración de proteínas, es decir que existe un incremento de la división celular, lo que sucede cuando el microorganismo está en la fase exponencial. De forma que se puede concluir que, a mayor división celular, mayor síntesis de proteína en el medio (Bertrand, 2019).

Figura 3

Efectos principales para la concentración de proteínas



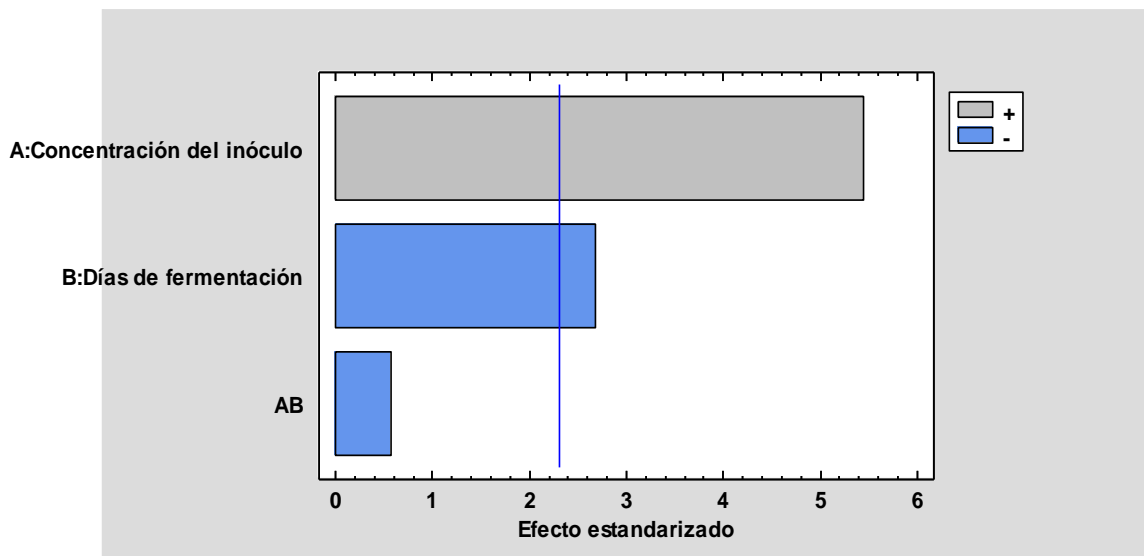
3.1.4. Determinación de la concentración de biomasa

Los resultados conseguidos en el análisis de varianza (ANOVA) para la concentración de biomasa demuestran que en los factores de concentración del inóculo y tiempo de fermentación el Valor-P obtenido es menor a 0,05, es decir, que son diferentes de cero para un nivel de confianza del 95%, lo que da a conocer que ambos factores influyeron significativamente sobre la concentración de proteínas (Anexo 11).

En el Diagrama de Pareto (Figura 4) se puede observar que el factor de concentración del inóculo incide positivamente sobre el tiempo de fermentación, además, como ambos factores superan la línea de valor crítica en la distribución t de Student, se considera que poseen una influencia significativa sobre la concentración de biomasa, confirmando lo adquirido en el análisis de varianza.

Figura 4

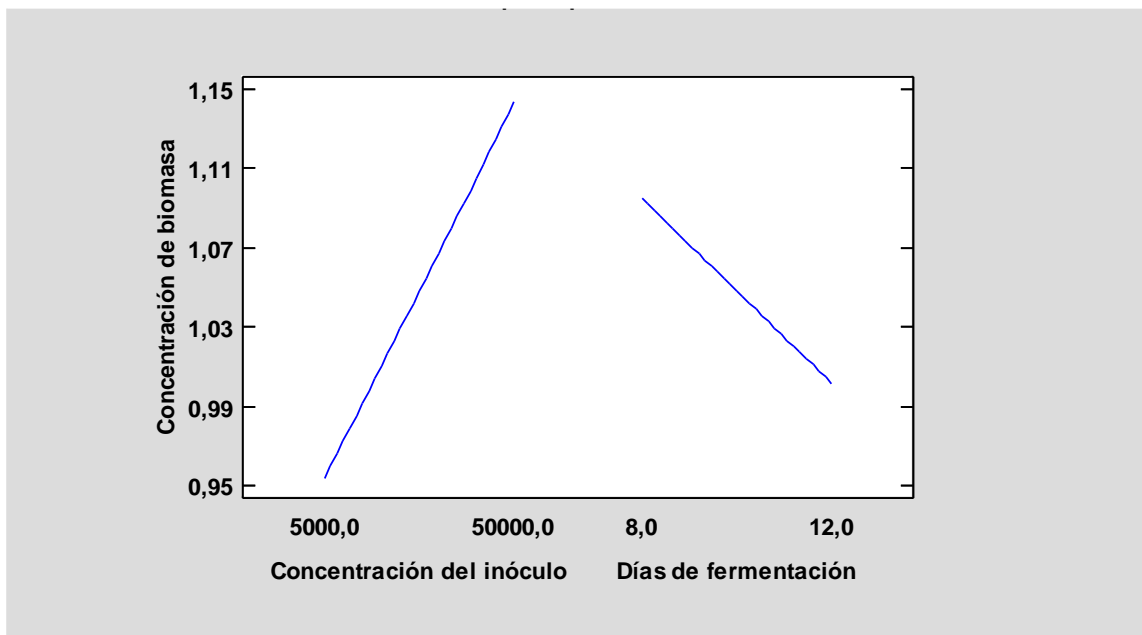
Diagrama de Pareto Estandarizado para Concentración de biomasa



En el Gráfico de Efectos Principales (Figura 5) se muestra que existe disminución en la concentración de biomasa cuando se incrementan los días de fermentación de 8 a 12. También se evidencia una mayor concentración de biomasa con 50 000 conidios/g a los 8 días, similar a lo observado en la concentración de proteínas, en consecuencia, que este último es el mejor medio en el proceso de fermentación.

Figura 5

Efectos principales para la concentración de biomasa



En la Figura 6 se presenta el Diagrama de Superficie de Respuesta Estimada para la concentración de proteínas y biomasa, donde se puede visualizar que con una concentración del inóculo de 50 000 conidios/g y un tiempo de fermentación de 8 días se maximizaron las variables respuesta, resultando valores óptimos de 15,48 mg/mL para la concentración de proteínas y 1,20 g/mL para la concentración de biomasa como se puede observar en la Tabla 10.

Figura 6

Diagrama de Superficie de Respuesta Estimada

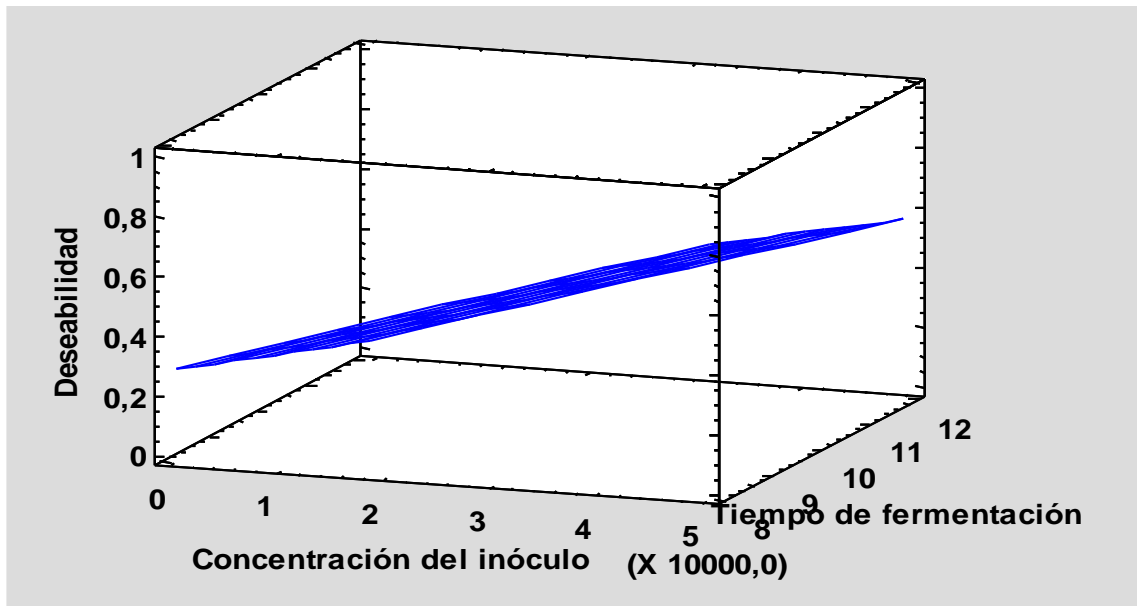


Tabla 10

Valores óptimos de concentración de proteínas y biomasa

Respuesta	Óptimo
Concentración de proteínas (mg/mL)	15,48
Concentración de biomasa (g/mL)	1,20

Yafetto, (2018) realizó un enriquecimiento proteico de pulpa de yuca mediante fermentación en estado sólido utilizando cuatro cepas de *A. niger*. En el estudio se produjo un incremento de proteínas en 8 días, dado que se obtuvo valores de 15,40 mg/mL con la

primera cepa, 21,54 mg/mL con la segunda cepa, 10,80 mg/mL con la tercera cepa y 3,85 mg/mL con la última cepa. De esta manera, comparando lo reportado bibliográficamente con los resultados obtenidos se evidencia que existe un incremento significativo en la concentración de proteínas, porque aumentó de 2,94 mg/mL a 15,48 mg/mL en 8 días de fermentación sobre el sustrato de raquis de *E. guineensis*.

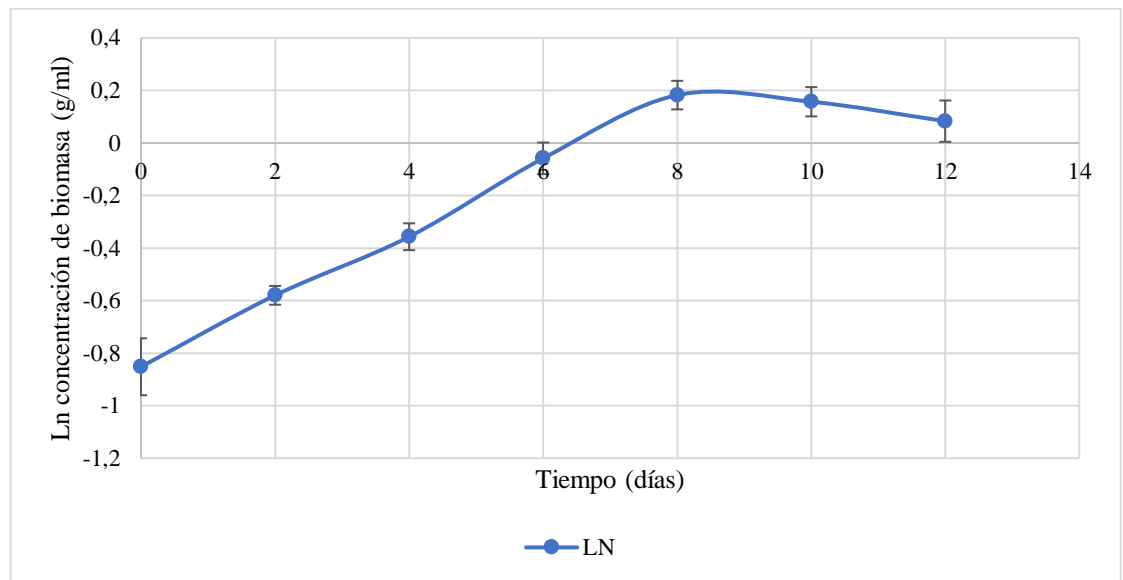
3.1.5. Determinación de los parámetros cinéticos de fermentación

La concentración total de biomasa hace referencia a la concentración de microorganismos vivos o muertos existentes en las muestras tomadas. Generalmente se mide por el método gravimétrico de peso seco, ya que es un procedimiento sencillo que puede aplicarse a muestras líquidas, semisólidas y sólidas. Es así como la forma de expresar los valores de biomasa es en términos de peso seco por unidad de volumen (**Germec et al., 2020; Paolini, 2018**).

De esta manera, empleando el método de peso seco se determinó la concentración de biomasa en el proceso fermentativo, lo que se obtuvo al tomar muestras cada 2 días en el transcurso de los 12 días que tuvo lugar la fermentación. En el Anexo 13 se pueden observar los valores obtenidos, de los cuales fue necesario establecer el logaritmo natural (Ln) para graficar la curva de crecimiento de *A. niger* como se presenta en la Figura 7, donde se pueden presenciar 3 fases del crecimiento microbiano. Es importante mencionar que se tomaron en cuenta los datos del medio que obtuvo la mayor concentración de proteínas, es decir, el que tenía una concentración de 50 000 conidios/g de medio con 8 días de fermentación.

Figura 7

Curva de crecimiento de A. niger



El cultivo inicia con la fase exponencial desde el día 0 al 8 del proceso fermentativo, al tener cambios significativos en los valores, debido a que oscilan de 0,43 a 1,20 g/mL en los días mencionados, lo que significa que en esta fase la población microbiana se está duplicando de manera constante y se considera que la velocidad de crecimiento es máxima. A partir del día 8 al 10 se presenta la fase estacionaria, porque no se observan cambios grandes en los valores de la concentración de biomasa, es decir que la tasa de crecimiento disminuye por el agotamiento de nutrientes, por lo que pueden existir microorganismos vivos y muertos (**Hamill et al., 2020; Viteri et al., 2017**).

La última fase observada, es conocida como la fase de muerte, que tiene lugar desde el día 10 hasta el día 12 de la fermentación donde los valores empiezan a disminuir al existir

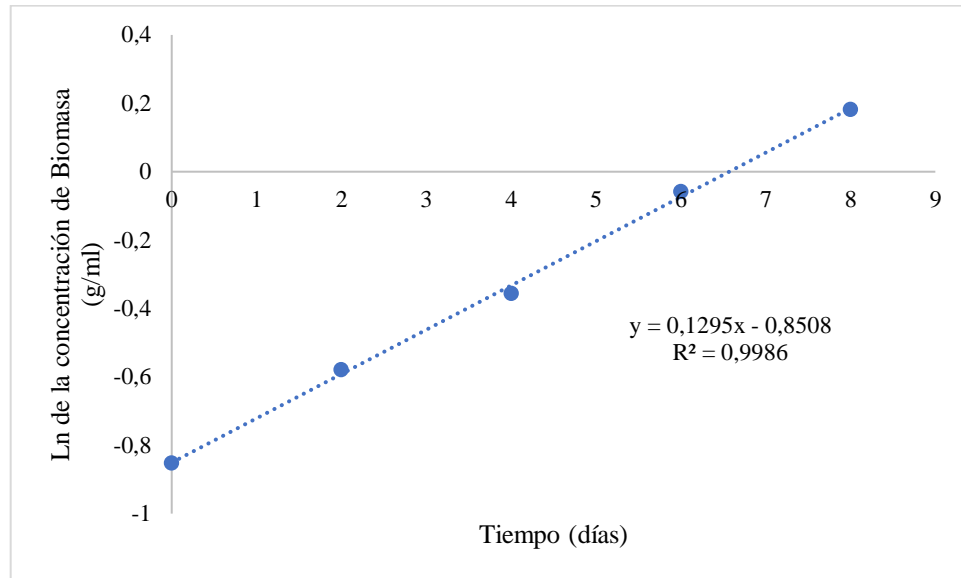
mayor cantidad de microorganismos muertos, lo que sucede porque se ha generado una disminución notable del sustrato disponible y se da un agotamiento total de los nutrientes para el metabolismo de *A. niger* (Kondratenko et al., 2019).

Es importante mencionar que la fase de latencia (Lag), es considerada la fase en la que los microorganismos se adaptan al medio para empezar su crecimiento, sin embargo, no se visualiza en la gráfica, pero esto se debe a que el intervalo de tiempo es amplio y por lo general las rutas metabólicas sufren modificaciones en los microorganismos durante las primeras horas de ser inoculados. Pese a esto, tomando en cuenta los valores plasmados en el Anexo 13, se podría afirmar que durante los 2 primeros días el hongo necesitó de un tiempo para adaptarse al medio y empezar su duplicación celular (Hamill et al., 2020).

La velocidad específica de crecimiento (μ) es considerada como el aumento en la masa celular o el número de células por unidad de tiempo, se determinó con la pendiente de la curva logarítmica de la concentración de biomasa contra el tiempo (ecuación 2) tomando en cuenta la región del crecimiento exponencial como se presenta en la Figura 8, teniendo un resultado de $\mu = 0,13 \text{ h}^{-1}$. Por otro lado, el tiempo de duplicación es el tiempo que requiere una población microbiana para duplicarse, lo que se calculó con ayuda de la ecuación 3, obtenido un valor de $t_d = 5,35 \text{ h}$ (Castillo et al., 2022; Ramírez & Espinoza, 2018).

Figura 8

Fase exponencial del crecimiento de A. niger



Coello et al., (2017) menciona que la velocidad de crecimiento para hongos filamentosos como el *A. niger* está entre $0,0101 \text{ h}^{-1}$ y $0,1213 \text{ h}^{-1}$, sin embargo, el valor obtenido fue de $0,1295 \text{ h}^{-1}$, pero al ser un valor similar se considera que está dentro del rango permitido según lo reportado bibliográficamente. Para el tiempo de duplicación no existe un rango específico, ya que este tiempo varía dependiendo de las condiciones ambientales que tenga el microorganismo.

3.2. Verificación de la hipótesis

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

Ha = 0 Se acepta la hipótesis alternativa, con lo cual se concluye que los factores de concentración del inóculo y tiempo de fermentación si influyen significativamente sobre el enriquecimiento proteico del raquis de palma africana (*Elaeis guineensis*) durante el proceso fermentativo de *Aspergillus niger*.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

Se evidenció un enriquecimiento proteico en el raquis de *E. guineensis*, al aumentar la concentración de proteínas de 2,94 a 15,48 mg/mL en 8 días de fermentación, dado que los factores de concentración del inóculo y tiempo de fermentación influyeron significativamente sobre el proceso fermentativo de *A. niger* mediante un análisis estadístico con diseño factorial 2^2 con un nivel de confianza $p < 0,05$.

Se aisló *A. niger* a partir de residuos orgánicos de limón y se identificó la cepa caracterizando macroscópica y microscópicamente el hongo, presentando un color marrón en su vista frontal y un color amarillento en su vista posterior, siendo una colonia algodonosa con textura polvorienta, micelio tabicado, esporas globulares, y presencia de conidióforo.

Se evaluó la concentración del inóculo con 5000 y 50 000 conidios/g de medio y un tiempo de fermentación de 8 y 12 días, obteniendo el mayor incremento de proteínas y biomasa en el medio que contenía 50 000 conidios/g y 8 días de fermentación, con valores de 15,48 mg/mL y 1,20 g/mL, respectivamente.

Se analizó la cinética de crecimiento del *A. niger* en el medio de 50 000 conidios/g con 8 días de fermentación, donde el hongo tuvo un crecimiento exponencial desde el día 0 hasta

el día 8, adquiriendo la ecuación de la recta al emplear este rango de tiempo, y de esta manera se obtuvo una velocidad específica de crecimiento $\mu = 0,13 \text{ h}^{-1}$ y un tiempo de duplicación de $t_d = 5,35 \text{ h}$.

4.2. Recomendaciones

Efectuar una caracterización genotípica de *Aspergillus niger*.

Acondicionar las cepas del hongo en un lugar estéril a temperatura ambiente durante 24 horas antes de iniciar la fermentación para que el hongo pueda adaptarse conforme al sustrato.

Realizar pruebas de viabilidad de esporas utilizando la cámara de Neubauer, con la finalidad de asegurar que el hongo se encuentre óptimo mientras se lleva a cabo el proceso fermentativo.

Estimar la influencia de la velocidad de agitación sobre el aumento de proteínas y biomasa en el proceso fermentativo.

Evaluar otros modelos cinéticos en el crecimiento de *A. niger* con el sustrato de raquis de *E. guineensis*.

MATERIALES DE REFERENCIA

Referencias Bibliográficas

- Adu, S., Yafetto, L., Ofosuhene, A., Offei, T., Adu, S., & Ntibe, T. (2018). Biotechnological potential of agro-industrial wastes for protein enrichment by solid-state fermentation using *Aspergillus niger*. *Studies in Fungi*, 3(1), 176–186. <https://doi.org/10.5943/sif/3/1/18>
- Alkiayat, M. (2021). A Practical Guide to Creating a Pareto Chart as a Quality Improvement Tool. *Global Journal on Quality and Safety in Healthcare*, 4(2), 83–84. <https://doi.org/10.36401/jqsh-21-x1>
- Anaya, R., & Molina, D. C. (2018). Evaluación económica y financiera de las alternativas de uso de los residuos de la materia prima de una planta industrial de extracción de palma de aceite. *Dictamen Libre*, 22, 77–89. <https://doi.org/10.18041/2619-4244/dl.22.5029>
- Atallah, O. O., Mazrou, Y. S., Atia, M. M., Nehela, Y., Abdelrhim, A. S., & Nader, M. M. (2022). Polyphasic Characterization of Four *Aspergillus* Species as Potential Biocontrol Agents for White Mold Disease of Bean. *Journal of Fungi*, 8(6), 1–19. <https://doi.org/10.3390/jof8060626>
- Bardales, C. B., Cabos, J. D., León, C. A., & Jara, E. L. (2020). Enriquecimiento proteico de los principales residuos lignocelulósicos agroindustriales de la Región La Libertad con la asociación mixta de *Trichoderma reesei*, *Chaetomium cellulolyticum* y *Candida utilis* para alimentación animal. *Arnaldoa*, 27(1), 99–114. <https://doi.org/10.22497/arnaldoa.271.27104>
- Behera, B. C. (2020). Citric acid from *Aspergillus niger*: a comprehensive overview. *Critical Reviews in Microbiology*, 46(6), 727–749. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1828815>

- Berenize, L., Fernández, D., & López, O. D. (2020). Protein enrichment of *Solanum tuberosum* by solid-state fermentation using *Aspergillus niger*. *Revista Bionatura*, 5(3), 1189–1194. <https://doi.org/10.21931/RB/2020.05.03.4>
- Bertrand, R. L. (2019). Lag Phase Is a Dynamic, Organized, Adaptive, and Evolvable Period That Prepares Bacteria for Cell Division. *Journal of Bacteriology*, 201(7), 1–21. <https://journals.asm.org/journal/jb>
- Briones, W. R., Guanín, E. M., Morales, F. L., & Bajaña, F. J. (2019). Gestión de los procesos administrativos en extractoras de palma africana. *Ciencias Holguín*, 25(2), 1–9. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?>
- Caicedo, D. (2020). Evaluación fisicoquímica y microbiológica de la extracción de harina de oca por el método de tacho abierto. *Alimentos, Ciencia e Ingeniería*, 28(1), 28–29.
- Cairns, T. C., Barthel, L., & Meyer, V. (2021). Something old, something new: Challenges and developments in *Aspergillus niger* biotechnology. *Essays in Biochemistry*, 65(2), 213–224. <https://doi.org/10.1042/EBC20200139>
- Castañeda, M. (2019). *Estequiometría y cinética del crecimiento microbiano*. Universidad Tecnológica Nacional de Argentina.
- Castillo, D., Castellanos, R., Valera, A., & Lozano, J. (2022). Modelo matemático y velocidad específica de crecimiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en un cultivo líquido en condiciones de laboratorio. *Revista Ciencias Biológicas y Ambientales*, 1(1), 54–61.
- Cerda, A., Artola, A., Barrena, R., Font, X., Gea, T., & Sánchez, A. (2019). Innovative Production of Bioproducts From Organic Waste Through Solid-State Fermentation. In *Frontiers in Sustainable Food Systems* (Vol. 3, Issue 63, pp. 1–6). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00063>
- Coello, C. D., Avellaneda, J. H., Barrera, A. E., Peña, M. M., Yépez, P. F., & Racines, E. R. (2017). Evaluación del crecimiento y producción de biomasa de dos cepas del

género *Pleurotus* spp., cultivadas en un medio agar con diferentes sustratos. *Ciencia y Tecnología UTEQ*, 10(2), 33–39.

Cortês, M., Holland, G., Schütze, T., Laue, M., Moeller, R., & Meyer, V. (2022). Colony growth and biofilm formation of *Aspergillus niger* under simulated microgravity. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1–20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.975763>

Díaz, G. V., Coniglio, R. O., Chungara, C. I., Zapata, P. D., Villalba, L. L., & Fonseca, M. I. (2021). *Aspergillus niger* LBM 134 isolated from rotten wood and its potential cellulolytic ability. *Mycology*, 12(3), 160–173. <https://doi.org/10.1080/21501203.2020.1823509>

Germec, M., Gürler, H. N., Ozcan, A., Erkan, S. B., Karahalil, E., & Turhan, I. (2020). Medium optimization and kinetic modeling for the production of *Aspergillus niger* inulinase. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43(2), 217–232. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02219-1>

Hamill, P. G., Stevenson, A., McMullan, P. E., Williams, J. P., Lewis, A. D. R., Sudharsan, S., Stevenson, K. E., Farnsworth, K. D., Khroustalyova, G., Takemoto, J. Y., Quinn, J. P., Rapoport, A., & Hallsworth, J. E. (2020). Microbial lag phase can be indicative of, or independent from, cellular stress. *Scientific Reports*, 10(1), 1–20. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62552-4>

Harvey, H. B., & Sotardi, S. T. (2018). The Pareto Principle. *Journal of the American College of Radiology*, 15(6), 931. <https://doi.org/10.1016/j.jacr.2018.02.026>

INEC. (2021). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua 2020*. https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2020/Presentacion%20ESPAC%202020.pdf

Jiménez, D., Sobalvarro, J. L., & Elizondo, J. A. (2020). Enriquecimiento proteico de dos especies forrajeras y cáscara de piña por medio de fermentación en estado sólido.

- Jirón, E. G., Rodríguez, K., & Bernal, C. (2022). Obtención de nanocelulosa a partir de raquis de palma africana y bagazo de caña. *Tecnología En Marcha*, 35(2), 167–181. <https://doi.org/10.18845/tm.v35i2.5609>
- Kondratenko, V. v., Levshenko, M. T., Petrov, A. N., Pozdnyakova, T. A., & Trishkaneva, M. v. (2019). Comparative evaluation of approaches to modelling kinetics of microbial thermal death as in the case of *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Foods and Raw Materials*, 7(2), 348–363. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2019-2-348-363>
- León, A., & Santacruz, S. (2021). Elaboration of briquettes from by-products of african palm (*Elaeis guineensis J*) and rice (*Oryza sativa L*). *Revista Politecnica*, 48(2), 65–70. <https://doi.org/10.33333/rp.vol48n2.06>
- Leyva, S. E., Rodríguez, Y., Mendoza, T., & Cadena, J. (2019). Manejo del raquis generado en las extractoras de palma aceitera para la elaboración de compost. *Ecociencia*, 6(4), 1–17.
- Li, C., Zhou, J., Du, G., Chen, J., Takahashi, S., & Liu, S. (2020). Developing *Aspergillus niger* as a cell factory for food enzyme production. In *Biotechnology Advances* (Vol. 44). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107630>
- Lübeck, M., & Lübeck, P. S. (2022). Fungal Cell Factories for Efficient and Sustainable Production of Proteins and Peptides. *Microorganisms*, 10(4), 1–24. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040753>
- Malacatus, P. N., Guerrero, B. v., & Llerena, G. M. (2017). Generation of effluents in the process of extraction of crude palm oil in Ecuador. *Dominio de Las Ciencias*, 3(4), 459–469. <https://doi.org/10.23857/dom.cien.pocaip.2017.3.4.oct.459-469>
- Missouri Botanical Garden. (2022). *Tropicos.org - NameSearch*. <https://www.tropicos.org/name/Search?name=elaeis%20guineensis>

- Paolini, J. E. (2018). Actividad microbiológica y biomasa microbiana en suelos cafetaleros de los Andes venezolanos. *Revista Terra Latinoamericana*, 36(1), 13. <https://doi.org/10.28940/terra.v36i1.257>
- Pineda, D. M., & Durán, J. E. (2019). Evaluation of oil palm empty fruit bunch wastes as adsorbent for the removal of reactive dyes from aqueous solutions. *Ingeniería Investigación y Tecnología*, 20(1), 1–9. <https://doi.org/10.22201/fi.25940732e.2019.20n1.008>
- Ramírez, D., & Espinoza, A. (2018). Comparación de características poblacionales de *Lemna minuta* (Araceae: Lemnoideae) en tres medios de cultivo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(1), 84–96.
- Saelee, N. (2022). Lactic Acid Production from Old Oil Palm Trunk Sap in the Open Batch, Open Repeated Batch, Fed-Batch, and Repeated Fed-Batch Fermentation by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 10863. *Fermentation*, 8(430), 1–11. <https://doi.org/10.3390/fermentation8090430>
- Son, Y. E., & Park, H. S. (2021). Genetic Manipulation and Transformation Methods for *Aspergillus* spp. *Mycobiology*, 49(2), 95–104. <https://doi.org/10.1080/12298093.2020.1838115>
- Srivastava, N., Srivastava, M., Ramteke, P. W., & Mishra, P. K. (2019). Solid-state fermentation strategy for microbial metabolites production: An overview. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Secondary Metabolites Biochemistry and Applications* (pp. 345–354). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63504-4.00023-2>
- Thierer, J. (2020). In search of the significant p. Its influence on the credibility of publications. In *Revista Argentina de Cardiología* (Vol. 88, Issue 2, pp. 173–178). Sociedad Argentina de Cardiología. <https://doi.org/10.7775/rac.88.i2.17555>
- Thongdumhyu R/shutterstock.com. (2018). *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryze* (moho) bajo microscopio para Microbiología en Lab. Shutterstock.

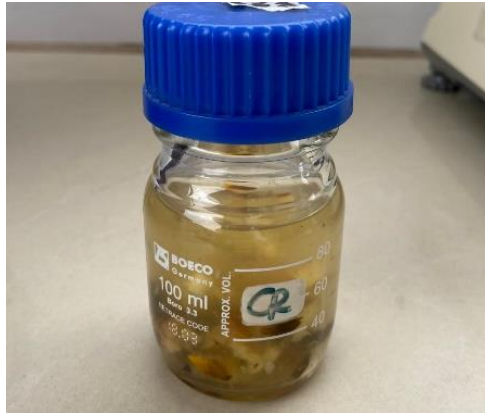
<https://www.shutterstock.com/es/image-photo/aspergillus-niger-oryze-mold-under-microscope-2143168791>

- Valle, L. V., Kreiker, J., Raggiotti, B., & Cadena, F. (2019). Aprovechamiento de desechos lignocelulósicos derivados de la producción industrial de aceite de palma en el desarrollo de materiales compuestos. *AJEA*, 4. <https://doi.org/10.33414/ajea.4.393.2019>
- Velásquez, C. O., & Uribe, J. A. (2019). Efecto de la temperatura y velocidad del aire sobre la humedad final de tomillo (*Thymus vulgaris*). *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 17(1), 34–44. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.18684/bsaa.v17n1.1202>
- Villalba, A. G., Cruz, M. E., & Azuara, G. v. (2018). *Aspergillus niger* Tiegh., aislado en Sonora, México: Evaluación de tolerancia a metales. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 24(2), 131–146. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2017.03.023>
- Viteri, Á., Blanco, M., Carbó, R., & Ginovart, M. (2017). Modelización del crecimiento de una población microbiana en medio líquido y su implicación en el estudio de la morfología celular a través del análisis digital de imágenes. *Modelling in Science Education and Learning*, 10(2), 153. <https://doi.org/10.4995/msel.2017.6655>
- Yafetto, L. (2018). Protein enrichment of cassava pulp by solid-state fermentation using *Aspergillus niger*. *Studies in Fungi*, 3(1), 7–18. <https://doi.org/10.5943/sif/3/1/2>

Anexos

Anexo 1

Medio con residuos orgánicos de limón para el aislamiento de A. niger



Anexo 2

Raquis de E. guineensis



Anexo 3

Secado de sustrato raquis en el secador de bandejas



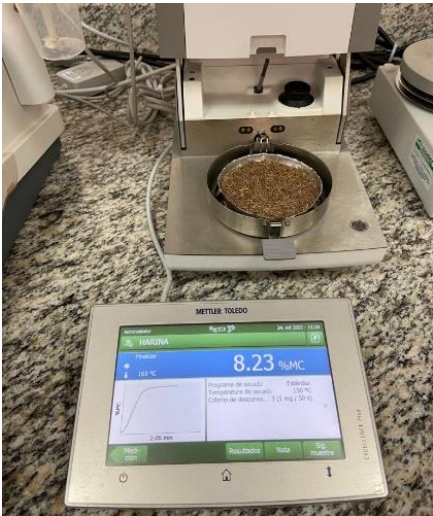
Anexo 4

Análisis de pH en el sustrato raquis



Anexo 5

Análisis de humedad en el sustrato raquis



Anexo 6

Fermentación de raquis con inóculo de A. niger



Anexo 7

Toma de muestras durante el proceso fermentativo



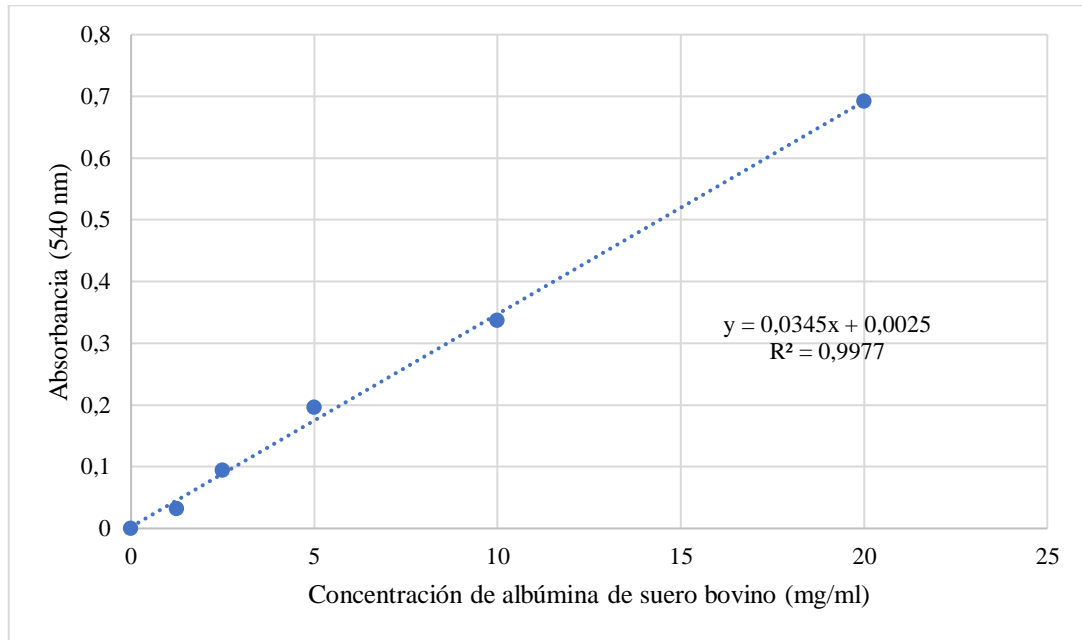
Anexo 8

Muestras tomadas durante el proceso fermentativo



Anexo 9

Curva patrón de albúmina de suero bovino (BSA)



Anexo 10

Análisis de Varianza para 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: Concentración del inóculo	4,16541	1	4,16541	24,90	0,0011
B: Días de fermentación	1,47701	1	1,47701	8,83	0,0178
AB	0,063075	1	0,063075	0,38	0,5563
Error total	1,3384	8	0,1673		
Total (corr.)	7,04389	11			

Anexo 11

Análisis de Varianza para 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: Concentración del inóculo	0,1083	1	0,1083	29,74	0,0006
B: Días de fermentación	0,0261333	1	0,0261333	7,18	0,0280
AB	0,0012	1	0,0012	0,33	0,5817
Error total	0,0291333	8	0,00364167		
Total (corr.)	0,164767	11			

Anexo 12

Control de los factores sobre la concentración de proteínas

Crispino



** = Concentración de Proteínas (mg/mL)

Días	5000*(Con/g)	50 000 (Con/g)
0	2,67	2,94
2	5,47	5,50
4	8,49	10,44
6	11,86	12,84
8	14,45	15,48
10	14,10	15,27
12	13,60	14,92

*(Con/g) = Conidios/g de medio, X** = Media de réplicas de cada variable

Anexo 13

Control de los factores sobre la concentración de biomasa

Días	X** = Biomasa (g/mL)		Ln de Concentración de Biomasa	
	5000 *(Con/g)	50 000 (Con/g)	5000 (Con/g)	50 000 (Con/g)
0	0,35	0,43	-1,059391576	-0,851752211
2	0,54	0,56	-0,62237811	-0,579818495
4	0,63	0,70	-0,456758402	-0,356674944
6	0,88	0,94	-0,131628442	-0,058335577
8	0,99	1,20	-0,010050336	0,182321557
10	0,94	1,17	-0,058335577	0,157003749
12	0,92	1,09	-0,087011377	0,083114907

*(Con/g) = Conidios/g de medio, X** = Media de réplicas de cada variable