



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



Tema: Caracterización del proceso fermentativo de *Aspergillus niger* P.E.L. Van Tiegghem utilizando como sustrato cáscara de papa (*Solanum tuberosum* L.) para el enriquecimiento proteico

Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de investigación, previa 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.

El estudio forma parte del Proyecto de Investigación “Fermentación microbiana a partir de residuos de papa (*Solanum tuberosum* L.) para la obtención de un alimento animal enriquecido en proteínas”, aprobado mediante Resolución 2384-CU-P-2017 por el Honorable Consejo Universitario de la Universidad Técnica de Ambato.

Autora: Lilibeth Berenize Fonseca Balseca

Tutora: Lic. MSc. Danae Fernández Rivero

Ambato – Ecuador

Diciembre 2019

APROBACIÓN DEL TUTOR

Lic. 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 de Alimentos y Biotecnología, de la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, 05 de noviembre del 2019.



Lic. MSc. Danae Fernández Rivero

C.I. 175718120-9

TUTORA

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Lilibeth Berenize Fonseca Balseca, 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.



Lilibeth Berenize Fonseca Balseca

C.I. 050359952-4

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



Dra. Liliana Paulina Lalaleo Córdova
Presidente del tribunal



MSc. Wilson Patricio Orozco Freire
C.I. 1721363008



Dr. José Homero Vargas López
C.I. 1801978048

Ambato, 29 de noviembre del 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 de Investigación, 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.



Lilibeth Berenize Fonseca Balseca

C.I. 050359952-4

AUTORA

DEDICATORIA

A Dios por el regalo de la vida, la salud, la familia y la oportunidad de encaminar mi rumbo como una prueba de error y ensayo constante. Por la alegría y las adversidades que forman y sensibilizan nuestro carácter siempre de busca del bien común.

A mi mami Blanca; más allá de darme la vida, ella es mi vida. Cada uno de los logros y triunfos van enfocados a llenar de orgullo a esa madre valerosa, respetuosa, honorable y muy trabajadora. Su esfuerzo jamás será en vano y siempre será recompensado con mi gratitud infinita por dedicar su vida entera para ver triunfar y ser felices a sus hijos.

A mi papi Wilson allá en el cielo. Con la memoria aún fresca, aunque hayan pasado demasiados años, recuerdo sus enseñanzas. La palabra es una promesa y éstas nunca se rompen, y así lo he hecho durante este tiempo. Ha sido mi mayor fortaleza cuando carecía de motivación.

A mi hermana Sonia. Me hubiera encantado que estuvieras presente pero debías acompañar a nuestro padre. Siempre seguiste muy de cerca mis pasos y estoy segura que estarás tan feliz allá así como yo lo estoy aquí.

A mi abuelito Cesar y a mis sobrinitos Sarahí y Miguelito por ser la luz de mi vida. Gracias por irradiar mis días con su alegría, sabios consejos y recuerdos inolvidables.

AGRADECIMIENTO

Expreso mis más sinceros agradecimientos a Dios y a mi familia por ser el pilar fundamental que me sostuvo durante mi trayectoria universitaria.

A mi hermana Mari y a mi cuñado Edi por ayudarnos en los momentos más críticos de mi vida, por ser ejemplo de superación personal y mi guía espiritual. A mis hermanos Wilson y Joel, mis sobrinitos Sarahí y Miguelito, por ser mi motivación y compañía diaria; los mejores recuerdos los tengo junto a ustedes.

A la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, carrera de Ingeniería Bioquímica, por abrir sus puertas y brindarme las herramientas necesarias para forjarme como una profesional bajo sus objetivos y principios visionarios.

A los docentes Danae y Orestes por ser mis guías durante el desarrollo de este estudio. Su conocimiento y ayuda desinteresada han permitido que se cumplan satisfactoriamente los alcances del proyecto de investigación del que formo parte.

A los docentes David y Liliana, responsables del Laboratorio de Procesamientos de Canje de Deuda, por facilitarme las instalaciones, equipos y materiales necesarios para el desarrollo del proyecto.

A mis calificadores, los docentes Patricio y Homero, por su amplia ayuda profesional, por impartir sus erudiciones y encaminar este trabajo de titulación.

Un agradecimiento especial al Docente Oscar Ruiz por su apoyo moral y académico durante toda mi trayectoria universitaria. Sus consejos encaminados hacia una vida profesional íntegra estarán presentes en mis nuevos desafíos.

A mis compañeros y amigos de carrera, en especial a Andrés, Jeniffer, Jhonny, Dani, Diana, Denise, Erika y Ruth. Gracias por los momentos que hemos compartido, por cada aventura y largas noches de desvelo; los recuerdos dentro y fuera de clases quedaran grabados en un lugar especial de mi corazón.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

CAPÍTULO I	1
MARCO TEÓRICO	1
1.1 Antecedentes investigativos	1
1.1.1 <i>Solanum tuberosum</i> L.	1
1.1.1.1 Características morfológicas	1
1.1.1.2 Taxonomía.....	2
1.1.1.3 Variedad de papa “Superchola”.....	3
1.1.1.4 Perfil nutricional de <i>Solanum tuberosum</i> L.	3
1.1.1.5 Producción y consumo de <i>Solanum tuberosum</i> L.	4
1.1.2 Fermentaciones	6
1.1.2.1 Generalidades.....	6
1.1.2.2 Fermentación en estado sólido.....	7
1.1.2.3 Fermentación en estado líquido	8
1.1.3 <i>Aspergillus</i>	9
1.1.3.1 <i>Aspergillus niger</i> P.E.L Van Tiegghem	10
1.2 Objetivos.....	11
1.2.1 Objetivo General	11
1.2.2 Objetivos Específicos.....	12
1.3 Hipótesis.....	12
1.3.1 Hipótesis nula.....	12
1.3.2 Hipótesis alternativa.....	12
1.3.3 Señalamiento de las variables de la hipótesis	12
1.3.3.1 Variables dependientes.....	12
1.3.3.2 Variables independientes.....	13
CAPÍTULO II	14
MATERIALES Y MÉTODOS	14
2.1 Materiales, equipos y reactivos	14
2.1.1 Materiales.....	14
2.1.1.1 Material Vegetal	14
2.1.1.2 Material Biológico.....	14

2.1.1.3	Material de Laboratorio.....	14
2.1.2	Equipos.....	15
2.1.3	Reactivos.....	15
2.2	Métodos.....	16
2.2.1	Obtención del sustrato.....	16
2.2.2	Proceso de fermentación.....	16
2.2.3	Determinación de la concentración de biomasa.....	17
2.2.4	Determinación de la concentración de proteína.....	18
2.2.5	Determinación de la concentración de azúcares reductores.....	19
2.2.6	Determinación de los parámetros cinéticos.....	19
2.2.6.1	Curva de crecimiento microbiano de <i>Aspergillus niger</i>	20
2.2.6.2	Determinación de tasa de crecimiento microbiano.....	20
2.2.6.3	Determinación de tiempo de generación.....	21
2.2.6.4	Cálculo del rendimiento biomasa-sustrato.....	21
2.2.7	Análisis estadístico.....	22
CAPÍTULO III	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
3.1	Análisis y discusión de resultados.....	23
3.1.1	Análisis de la concentración de biomasa como variable respuesta.....	23
3.1.2	Análisis de la concentración de proteína como variable respuesta.....	26
3.1.3	Optimización del proceso de fermentación en estado sólido.....	29
3.1.4	Determinación de los parámetros cinéticos del proceso fermentativo.....	32
3.2	Verificación de la hipótesis.....	37
CAPÍTULO IV	38
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	38
4.1	Conclusiones.....	38
4.2	Recomendaciones.....	39
BIBLIOGRAFÍA	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. La papa (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	2
Figura 2. Caracterización microscópica de <i>Aspergillus niger</i>	10
Figura 3. Diagrama de Pareto estandarizada para la concentración de biomasa.	25
Figura 4. Gráfico de efectos principales para la concentración de biomasa.	25
Figura 5. Diagrama de Pareto estandarizada para la concentración de proteína.....	27
Figura 6. Gráfico de efectos principales para la concentración de proteína.	28
Figura 7. Superficie de respuesta del modelo ajustado en el proceso fermentativo para optimizar la concentración de biomasa con una concentración de inóculo de 50000 conidios/g de medio.	30
Figura 8. Superficie de respuesta del modelo ajustado en el proceso fermentativo para optimizar la concentración de proteína con una velocidad de agitación de 60 rpm.	30
Figura 9. Curva de crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> en sustrato de cáscara de papa	33
Figura 10. Fase exponencial de crecimiento para <i>Aspergillus niger</i>	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción taxonómica de <i>Solanum tuberosum</i> L.	2
Tabla 2. Composición química-bromatológica de <i>Solanum tuberosum</i> L.	4
Tabla 3. Tabla ANOVA para concentración de biomasa.....	24
Tabla 4. Tabla ANOVA para la concentración de proteína.	27
Tabla 5. Valores de las variables respuesta optimizados.	31

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Expresión para la determinación de la concentración de biomasa.	18
Ecuación 2. Expresión de la cinética de crecimiento microbiano.....	20
Ecuación 3. Linealización de la expresión de la cinética de crecimiento microbiano	21

Ecuación 4. Tiempo de generación.	21
Ecuación 5. Rendimiento biomasa sustrato.....	22
Ecuación 6. Ecuación optimizada para la predicción de la concentración de biomasa. .	26
Ecuación 7. Ecuación optimizada para la predicción de la concentración de proteína...	29

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Curva estándar para la determinación de la concentración de proteína.	43
Anexo 2. Curva estándar para la determinación de la concentración de glucosa.	43
Anexo 3. Control de los factores sobre las variables respuesta.	44
Anexo 4. Optimización de los factores sobre el proceso fermentativo.....	44
Anexo 5. Valores de peso seco para la determinación de la curva de crecimiento.	45

RESUMEN

La papa (*Solanum tuberosum* L) es uno de los tubérculos más frecuentes dentro de la canasta básica ecuatoriana; su principal uso radica en la industria alimenticia generando la acumulación de sus desechos, no obstante. Los avances biotecnológicos permiten aprovechar este tipo de residuos y generar productos mejorados a través de cambios en su composición final, como el caso de *Aspergillus niger*, que son capaces de modificar su ruta metabólica e incrementar en su porcentaje final de los macronutrientes. El objetivo de este estudio fue caracterizar el proceso fermentativo de *Aspergillus niger* utilizando como sustrato cáscara de papa (*Solanum tuberosum* L.) para el incremento proteico en el medio. En la fase inicial se evaluó el tiempo de fermentación (5 – 8 días), la velocidad de agitación (0 – 60 rpm) y la concentración del inóculo (5000 y 50000 conidios/g de medio), a través, de un diseño factorial (2^3); posteriormente, se optimizó la fermentación y se determinó los parámetros cinéticos. La evaluación determinó que los factores que influyen significativamente fueron la velocidad de agitación y la concentración del inóculo con sus máximos niveles (60 rpm y 50000 conidios respectivamente). La optimización dio como resultado una concentración de proteína de 16,3092 mg/ml y de biomasa de 0,9422 g/ml. Finalmente, se obtuvo una velocidad específica de crecimiento $u = 0,005708 h^{-1}$, un tiempo de duplicación $T = 121,42 h$ y un rendimiento $Y_{x/s} = 0,5074 g$ de biomasa/mg de sustrato consumido. Los resultados obtenidos constataron que hubo un incremento en el nivel proteico final del medio.

Palabras clave: Fermentación sólida, conidios, *Aspergillus niger*, cáscara de papa, proteína.

ABSTRACT

Potato (*Solanum tuberosum* L) is one of the most frequent tubers in Ecuadorian's basic food basket; it has a high demand in the market and its main use is in the food industry, however, the accumulation of its waste has become a problem, even though, biotechnological advances allow using this type of waste and generate other improvements through fermentation processes giving changes in its final composition. It has been shown that some fungi, such as *Aspergillus niger*, which are able to modify their metabolic pathway and increase in their final percentage of macronutrients. The objective of this study was to characterize the fermentation process of *Aspergillus niger* using potato's peel (*Solanum tuberosum* L.) as a substrate to the protein increase in the medium. In the initial phase, the fermentation time (5-8 days), the agitation speed (0-60 rpm) and the inoculum concentration (5000 and 50,000 conidia / g of medium) were evaluated through a factorial design (2^3), these factors were important for the fermentation process; subsequently, fermentation was optimized and kinetic parameters were determined. Optimization resulted in a protein concentration of 16.3092 mg / ml and a biomass concentration of 0.9422 g / ml. Finally, the kinetic parameters of the microorganism in the optimized medium were determined obtaining a specific growth rate $\mu = 0.005708 \text{ h}^{-1}$, a doubling time $T = 121.42 \text{ h}$ and a yield $Y_{x/s} = 0.5074 \text{ g}$ of biomass/mg of substrate consumed. The results obtained confirmed that there was an increase in the final protein level of the medium.

Keywords: Solid fermentation, conidia, *Aspergillus niger*, potato peel, protein.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes investigativos

1.1.1 *Solanum tuberosum* L.

1.1.1.1 Características morfológicas

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es un cultivo originario de la Cordillera de los Andes, durante su expansión por el mundo evolucionó a través de cruces con otras especies silvestres del mismo género desarrollando una gran variabilidad (**Sinavimo, 2017**).

Solanum tuberosum L. es una planta herbácea tocosa perenne, su altura varía entre el rango de 30 a 80 cm, presenta glabras o pubescencias esparcidas y estolones con tubérculos globosos o elípticos de 3 a 10 cm de diámetro. Las hojas son alternas, compuestas, de forma ovada u oblonga. Su inflorescencia está situada en la extremidad del tallo y la sostiene un escapo floral (Figura 1). Sus flores son actinomorfas, bisexuales, pentámeras, de color blanco o violáceo; la corola es rotácea con un diámetro de 2 a 5 cm. El fruto tiene forma de baya globosa con un diámetro de 1 a 3 cm, su coloración es verde o amarillenta (**Gardens, 2016**).

Las raíces de la papa se caracterizan por ser muy ramificadas, finas y largas; tienen un débil poder de penetración y sólo adquieren buen desarrollo en suelos arenosos. Poseen estolones que son tallos subterráneos los cuales posteriormente originan el tubérculo.

El tubérculo es un tallo modificado con características de tejido caulinar y parenquimático con capacidad de reserva de almidón. En las axilas del tubérculo se sitúan las yemas de crecimiento dispuestas en espiral sobre la superficie del tubérculo (**Gardens, 2016**).



Figura 1. La papa (*Solanum tuberosum* L.)

Fuente: (Alamy Stock Photo, 2008)

1.1.1.2 Taxonomía

La Tabla 1 sintetiza la descripción taxonómica de *Solanum tuberosum* L. tomada de la base de datos para nomenclatura “Trópicos”.

Tabla 1. Descripción taxonómica de *Solanum tuberosum* L.

Clase	Equisetopsida C. Agardh
Subclase	Magnoliidae Novák <i>ex</i> Takht.
Superorden	Asteranae Takht.
Orden	Solanales Juss. <i>ex</i> Bercht. & J. Presl
Familia	Solanaceae Juss.
Género	<i>Solanum</i> L.
Subgénero	Potatoe
Sección	Petota
Especie	<i>Solanum tuberosum</i> L., 1753

Fuente: Trópicos, 2019.

1.1.1.3 Variedad de papa “Superchola”

La variedad de papa Superchola ha sido clasificada como subespecie andígena. Es la variedad de papa con mayor preferencia de consumo en el Ecuador. Su crecimiento es óptimo a una altitud de 2800 a 3600 m. Posee una maduración tardía y obtiene hasta el 24% de contenido de materia seca (**INIAP, 2013**).

Morfológicamente es una planta erecta con varios tallos verdes con pigmentación púrpura y presencia de nudos sobresalientes. Las hojas son de color verde intenso con tres pares de folíolos primarios, cinco secundarios, cinco terciarios y uno terminal. Las flores son moderadas de color morado; estas caen por falta de fecundación. Los tubérculos son medianos, elípticos u ovalados, piel rosada y lisa, pulpa amarilla pálida sin pigmentación y ojos superficiales (**INIAP, 2013**).

1.1.1.4 Perfil nutricional de *Solanum tuberosum* L.

Se ha establecido que, en la postcosecha, la papa presenta un contenido de humedad entre 70-75%. La cantidad de materia seca varía entre 25-30%, de esta cantidad el 60-80% es almidón. El almidón de papa está compuesto por sacáridos complejos como celulosa, amilasa y amilopectina en proporción (1:3) y se descompone en carbohidratos tales como glucosa y sacarosa (**Prada, 2012**).

El contenido de proteína de la papa es similar en comparación a otras raíces y tubérculos; es equivalente al contenido de proteína de los cereales (**Peña, 2015**). En la Tabla 2 se detalla la composición química-bromatológica promedio tomada de un estudio a 10 variedades de papas del Ecuador realizado en el Centro de Investigaciones Agropecuarias INIAP (2009).

Tabla 2. Composición química-bromatológica de *Solanum tuberosum* L.

Composición química		Composición funcional	
Humedad	72 %	Vitamina C	15 %
Materia seca	27,32 %	Polifenoles	518-643 mg ácido gálico/100 g
Almidón	80,25%	Carotenos	10,03 mg/g de muestra
Hierro	6 mg/100g	-	-
Potasio	1741 mg/ 100 g materia seca	-	-

Fuente: (Villacrés, Quilca, Muñoz, Monteros, & Reinoso, 2009)

La cantidad de nitrógeno total en base seca es de 1-2% y la mitad o un tercio de este porcentaje se catalogan como proteína. Las proteínas de la papa son casi exclusivamente globulinas en un 60 - 70% y glutelinas de un 20 - 40%, se han podido identificar cerca de 21 aminoácidos como constituyentes normales en el tejido del tubérculo (Prada, 2012).

Otros reportes señalan que la papa contiene cantidades módicas de hierro y ácido ascórbico, vitaminas (B₁, B₃ y B₆) y minerales tales como potasio, fósforo y magnesio (Peña, 2015). Se ha demostrado que la papa contiene compuestos fenólicos con características antioxidantes, entre estos se destacan fenoles como: ácido gálico (518-643 mg/g de papa) (Villacrés *et al.*, 2009), flavonoides (61-87/100 g de papa), Mirecetina (48 µg/100 g de papa BS) y ácido clorogénico (34,4 -73,5 mg/100 g BS) (Villalobos, López, Rodríguez, & Prado, 2014).

1.1.1.5 Producción y consumo de *Solanum tuberosum* L.

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) reporta que en el año 2017 a nivel mundial existió un área total destinada para la producción de papa de 19,302,642 hectáreas y una producción anual de 388,190,674

toneladas siendo Estados Unidos el país líder en producción con 20,017,350 toneladas; valor que representa el 3% de la producción mundial total **(FAO, 2017)**.

Ecuador, en el mismo año, ocupó un área de cultivo de papa de 29,532 hectáreas y una producción de 377,243 toneladas; este valor equivale al 0,098% de producción mundial y 7,89% de producción en América latina **(FAO, 2017)**.

Las excelentes características físicas del tubérculo permiten al sector industrial mantener a la papa como un ingreso sostenible. Del total de la producción agrícola, el 75% se usa en la industria para elaboración de frituras, conservas, harina y extracción de almidón; 25% restante se utiliza como consumo minorista generalmente en patios de comida, restaurantes y hogares **(Martín & Montes, 2012)**.

La cáscara de la papa es desprendida del tubérculo representando aproximadamente el 2% del volumen total comestible, es considerada como desecho; se acumula, tanto en la industria como en los hogares a razón de 2 kilogramos por cada 100 kilogramos de papa procesada en el país de Perú **(Vargas & Pérez, 2018)**.

El almidón es la razón de existencia del tubérculo. A medida que la planta avanza su crecimiento, genera gran cantidad de azúcares en forma de polisacáridos dentro de las raíces; estas se adaptan y generan protuberancias en la zona periférica donde se almacenan formando un callo que se conoce como tubérculo **(Wachner, 2014)**. Los seres humanos y animales, al consumir la papa, transforman el almidón y lo convierten en fuente de carbono para la generación de energía **(Guzmán, Hurtado, Carreño & Casos, 2017)**.

Hoy en día, el consumo se extiende hacia la alimentación animal. Varios países de la región suministran papa fresca o cocida a porcinos, bovinos, caprinos y aves. Sin embargo, es necesario el suministro de minerales como sales de calcio y fósforo para complementar la nutrición requerida por el animal **(Siebald et al., 2002)**.

En la actualidad se busca el desarrollo de metodologías y tecnologías que sean capaces de maximizar compuestos de interés presentes en los subproductos de desecho. Se ha realizado ensayos en los que se somete los desechos de papa a procesos de fermentación láctea con el fin de generar un mayor tiempo de vida útil al producto, además de obtener alimentos líquidos ricos en nutrientes para alimentación animal. Este campo se va expandiendo gracias a los avances biotecnológicos (**Borras, Iglesias & Moyano, 2016**).

1.1.2 Fermentaciones

1.1.2.1 Generalidades

La fermentación es un proceso metabólico que llevan a cabo ciertas levaduras, hongos y varias bacterias. Transforman compuestos orgánicos de alto peso molecular en sustancias más simples como etanol, ácido láctico, ácido butírico entre otros. Los procesos de fermentación han sido usados por el hombre desde hace miles de años con el fin de preservar los alimentos, producir bebidas y comestibles con sabores, texturas y aromas específicos como yogur, quesos, kumis, chocolate, cerveza, vinos, panes y encurtidos (**Wachner, 2014**). Hoy en día, mediante las fermentaciones, se han desarrollado diversos productos industriales de mayor complejidad como antibióticos, medicamentos, ácidos y combustibles mismos que requieren de mayor control y tecnología (**Arnold, & Noblesse, 2012**).

La fermentación en alimentos es un proceso en el que la transformación del sustrato se produce por acción de microorganismos del medio ambiente capaces de cambiar su ruta metabólica por la influencia de perturbaciones físicas o químicas. Un cambio de ruta metabólica puede desencadenar reacciones que modifiquen los parámetros fisicoquímicos e incluso el valor nutricional del producto fermentando (**Guzmán *et al.*, 2017**), de ahí la importancia de controlar las variables críticas del proceso.

El crecimiento microbiano en los alimentos en proceso de fermentación se caracteriza por cambios sucesivos, una serie de cambios intrínsecos o relacionados con los propios

alimentos y una serie de cambios extrínsecos o del entorno que interacciona con la comunidad microbiana a lo largo del tiempo. Dependiendo de la característica del medio en el que se desarrolla la fermentación se clasifica en: Fermentación en estado sólido y fermentación en estado líquido (**Guzmán *et al.*, 2017**).

1.1.2.2 Fermentación en estado sólido

Los cultivos en estado sólido se caracterizan por contener el sustrato transformado por el microorganismo en estado sólido y no en solución o suspensión como ocurre en una fermentación líquida (**Aranda, Georgana, Salgado & Ramos, 2012**). El objetivo del proceso es el aumento parcial del contenido proteico de los alimentos, mejorando además las posibilidades de conservación, cambio de las características físicas y químicas, el color, el olor o el sabor (**Suarez, 2012**).

Existen dos tipos de fermentación sólida. El primer tipo es aquel donde el material sólido actúa como principal fuente de nutrientes y como soporte físico del microorganismo al mismo tiempo. El segundo tipo, es en el que el material sólido actúa únicamente como soporte o anclaje del microorganismo y para su cultivo se adiciona una solución nutritiva (**Moyano, 2014**).

El desarrollo de productos obtenidos mediante una fermentación en estado sólido ha mantenido un interés creciente en los últimos años particularmente en países como Cuba. La mayor parte de aplicaciones está destinada al enriquecimiento proteico de los residuos agroindustriales de la producción azucarera (**Borras *et al.*, 2016**).

Las ventajas que ofrece la fermentación en estado sólido han permitido que se desarrollen investigaciones con productos que requieren bajas concentraciones de agua y aireación. **Berradre *et al.* (2009)** desarrollaron una fermentación en estado sólido usando desechos de uva para elaborar abonos ricos en nutrientes y además, redujeron el impacto ambiental. **Granda *et al.* (2005)** emplearon plátano como sustrato en una fermentación en estado sólido para la producción de componentes de uso farmacéutico.

Rodríguez et al. (2010) generaron una alternativa de fermentación en estado sólido para residuos de manzana enriquecida con proporciones variantes de soya y urea; el resultado fue el incremento de proteína en el medio. **Ramos, et al. (2006)** utilizaron la caña de azúcar enriquecida con residuos de sorgo y pulidura de arroz para obtener un alimento de mejores características bromatológicas. **Cárdenas et al. (2008)**, trataron las plantas de sorgo con bagacillo de caña para desarrollar un alimento para animales, obtuvieron un menor contenido de fibra y un incremento del 11% de la proteína verdadera en el producto final.

Trabajos recientes han usado residuos de papa con harina de alfalfa para obtener un alimento por fermentación en estado sólido con menor cantidad de fibra y mejorar su digestibilidad, logrando un alimento con 21% de proteína de la cual el 70% es proteína verdadera (**Borras et al., 2016**).

1.1.2.3 Fermentación en estado líquido

La fermentación en estado líquido (FEL) o fermentación sumergida (FS) es aquella donde existe por lo menos la misma cantidad de sustrato sólido y agua en el proceso, es decir se desarrolla en una solución (**Suarez, 2012**). Los nutrientes deben ser solubles en agua o encontrarse en forma de suspensión. Se trata del tipo de fermentación más utilizado por la industria debido al control sencillo y eficaz de las variables que requiera el proceso además es más fácil recuperar el producto final que en una fermentación en estado sólido (**Cujilema, León, & Porro, 2018**).

En la fermentación en estado líquido los microorganismos se desarrollan flotando en la solución, existen microorganismos como los hongos miceliales (mohos) que para poder crecer en el medio desarrollan esferas conocidas como pellets cuando no existe agitación, en el caso de que exista agitación los mohos crecen en la superficie. Las fases de crecimiento microbiano son bien definidas en este tipo de fermentaciones (**Guzmán et al., 2017**). La FEL se divide principalmente en tres tipos: por lote, continua y alimentada dependiendo de la entrada y salida de sustrato y producto (**Suarez, 2012**).

Los estudios más comunes para este tipo de fermentación se radican en la producción de nutrimentos y compuestos activos para medicamentos. **Horincar, Popa, Parfene & Balaes (2014)** estudiaron los medios preliminares para cultivar *Pleuroto ostreatus* en sistema sumergido donde identificaron que las condiciones óptimas fueron: pH entre 5-6, tiempo de cultivo entre 120 - 240 horas y nutrientes ricos en sales de potasio y amonio para mejorar el rendimiento de la producción de biomasa en condiciones de cultivo sumergidas.

Una de las aplicaciones de fermentaciones en estado líquido se desarrolló en Colombia. Se estableció la producción de biomasa fúngica de *Lentinula edodes* conocido como hongo Shiitake donde se identificaron polisacáridos y triterpenoides que se sintetizaban durante el cultivo sumergido y fueron conservados en una matriz de gelatina para posteriores evaluaciones fisicoquímicas (**Suarez, 2012**). Sin embargo, los altos costos de producción aún siguen siendo una limitante para este tipo de fermentación.

1.1.3 *Aspergillus*

Aspergillus es un hongo filamentoso, pertenece al grupo Deuteromycetes u hongos imperfectos. Se caracteriza por poseer estructuras esporíferas o reproductoras llamadas cabezas conidiales, estas cabezas están compuestas por una vesícula rodeada por una corona de fiálides en forma de botella, en cuyo extremo se forman cadenas de esporas. Su micelio es lanoso de color blanco amarillento que cambia a negro. El reverso presenta forma conidiófora larga, lisa y fiálides biseriadas que cubren completamente la vesícula (Figura 2) (**Reyes, González & López, 2013**).

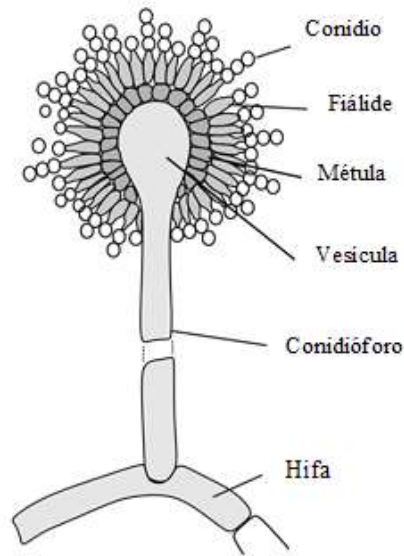


Figura 2. Caracterización microscópica de *Aspergillus niger*.

Fuente: (Reyes, González & López, 2013).

1.1.3.1 *Aspergillus niger* P.E.L Van Tieghem

Aspergillus niger es un hongo que produce un moho negro en vegetales, es muy común en lechuga, tomate, acelga y limón. Es una especie de hongo inocua para los seres humanos y también para la mayoría de los cultivos. Es una de las especies más corrientes del género *Aspergillus* (Reyes *et al.*, 2013).

Los compuestos químicos naturales del fósforo son poco saludables, sin embargo, en el caso de los vegetales, son un nutriente esencial de ahí que se puede generar un sin número de investigaciones con aplicaciones usando *Aspergillus niger* (Chanagá, Plácido, Marín, & Yepres, 2012). Investigadores de la Universidad Tecnológica de Veracruz determinaron que la especie *Aspergillus niger* encontrada en los suelos puede emplearse para favorecer el desarrollo de distintos cultivos debido a una pequeña porción del fósforo que contiene este hongo, afirman que es posible aplicarlo como fertilizante biológico en huertas y plantaciones de tamaño relativamente reducido (Peña,

2015). Actualmente, se investiga si el hongo puede solubilizar compuestos de hierro, otro importante micronutriente vegetal

La producción de ácido cítrico a escala industrial es el principal uso que se le da a este microorganismo, sin embargo, empiezan a desarrollarse nuevas líneas de investigación con novedosos resultados. Una de estas líneas de investigación trata de estudios con *Aspergillus niger* en medios de fermentación sólida donde se ha podido minimizar los problemas de asimilación de la papa cruda en animales rumiantes. Al minimizar la cantidad de fibra soluble del medio, por efecto del catabolismo del microorganismo durante la fermentación, los rumiantes presentaron síntomas de aceleración del proceso metabólico del suplemento modificado con el cual se alimentaron e incrementaron su masa muscular (Borras *et al.*, 2016).

Las aplicaciones para extracción de enzimas es otro campo en el cual se utiliza *Aspergillus niger*. Cujilema, León & Porro (2018) obtuvieron lipasas por fermentación en estado sólido empleando *Aspergillus niger*; determinaron las condiciones óptimas de pH empleando un medio a base de residuos agroindustriales de origen nacional. Los ensayos establecieron que la enzima podía ser extraída sin alteración de su estructura a pH bajos; esta condición también permitía el crecimiento óptimo del microorganismo.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Caracterizar el proceso fermentativo de *Aspergillus niger* P.E.L. Van Tieghem utilizando como sustrato cáscara de papa (*Solanum tuberosum* L.) para el incremento proteico en el medio.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Determinar la influencia de la concentración inicial de inóculo de *Aspergillus niger* P.E.L. Van Tieghem, el tiempo de fermentación y la velocidad de agitación sobre el proceso fermentativo.
- Optimizar el proceso de fermentación en estado sólido, tomando en cuenta los parámetros idóneos obtenidos del estudio de las variables.
- Determinar los parámetros cinéticos del proceso fermentativo.

1.3 Hipótesis

1.3.1 Hipótesis nula

Los factores velocidad de agitación, concentración de inóculo y tiempo de fermentación no influyen significativamente sobre el enriquecimiento proteico del sustrato de cáscara de papa (*Solanum tuberosum* L.) durante el proceso fermentativo de *Aspergillus niger*.

1.3.2 Hipótesis alternativa

Los factores velocidad de agitación, concentración de inóculo y tiempo de fermentación influyen significativamente sobre el enriquecimiento proteico del sustrato de cáscara de papa (*Solanum tuberosum* L.) durante el proceso fermentativo de *Aspergillus niger*.

1.3.3 Señalamiento de las variables de la hipótesis

1.3.3.1 Variables dependientes

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

1.3.3.2 Variables independientes

- Velocidad de agitación (0 y 60 rpm)
- Tiempo de fermentación (5 y 8 días)
- Concentración de inóculo (5000 y 50000 conidios/g de medio)

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales, equipos y reactivos

2.1.1 Materiales

2.1.1.1 Material Vegetal

Residuos domésticos de papa (*Solanum tuberosum* L.) (Variedad Súper chola).

2.1.1.2 Material Biológico

Hongo *Aspergillus niger* aislado y conservado en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

2.1.1.3 Material de Laboratorio

- Material de vidrio (GLASSCO).
 - Probetas de 10 y 100 ml
 - Vasos de precipitación (10, 50, 100 y 200 ml)
 - Balón de aforo (10, 25, 50, 100 ml)
 - Botellas de esterilización
 - Varillas de agitación
- Espátulas estériles
- Magnetos (Golderie Trading)
- Toallas de papel

- Tubos de centrífuga (15ml)
- Tubos de microcentrífuga
- Puntas (100 µl, 1000 µl y 10 ml)
- Morteros
- Tupper de plástico (2 L)

2.1.2 Equipos

- Secadero de bandejas (Gander MTN)
- Molino de cuchillas (Baumgarten Porta Westfalica)
- Balanza de Humedad (Citizen MB 200)
- pH-metro (Thermo Scientific)
- Incubadora (Lab- INCUBATOR- Digisystem Laboratory Inc)
- Estufa (Precision-Thermo Scientific)
- Autoclave (H1-CLAVE™ HV-110)
- Cámara de flujo laminar (OptiMAIR)
- Agitador incubador orbital (Incu-Shaker mini-Benchmark)
- Pipeta manual (Thermo Scientific, Dinamarca)
- Micropipeta manual (Thermo Scientific, Dinamarca)
- Balanza analítica (Adventurer Pro)
- Centrífuga (Rotina 380- Hettich Zentrifugen)
- Espectrofotómetro UV-VIS (accuSkan GO- Fisher Scientific)
- Software de análisis de datos estadístico y gráfico, Statgraphics XVI.I 64x.

2.1.3 Reactivos

- Etanol al 96% de pureza (ISSE LABS)
- Hidróxido potásico (KOH) (ISSE LABS).
- Sulfato cúprico (CuSO₄) (ISSE LABS)
- Tartrato de sodio y potasio (KNaC₄O₆·4H₂O) (ISSE LABS).
- Agua destilada (ISSE LABS).

- Reactivo 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (ISSE LABS).
- Hidróxido de sodio (NaOH) (ISSE LABS).
- Ácido Clorhídrico (HCl) (ISSE LABS).
- Ácido acético (CH₃COOH) (ISSE LABS).
- Acetato de sodio (C₂H₃NaO₂) (ISSE LABS).
- Tartrato de sodio y potasio (KNaC₄H₄O₆·4H₂O) (ISSE LABS).
- Enzima α-amilasa (Elicrom)
- Enzima glucoamilasa (Elicrom)
- Papa-Dextrosa-Agar (PDA) (Sigma-aldrich)

2.2 Métodos.

2.2.1 Obtención del sustrato

Se recolectó los residuos de cáscara de papa (variedad Superchola) generados por los desechos alimenticios domésticos de un hogar de Ambato y fueron transportados hacia los laboratorios de la Unidad Operativa de la Dirección de Investigación y Desarrollo (UODIDE) radicada en la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Las cáscaras fueron lavadas con agua potable y cortadas en trozos de 5-7 cm de longitud. Posteriormente, se sometieron a un proceso de secado por aspersión durante 48 horas a una temperatura de 50 °C en un horno de bandejas (GANDER MTN) hasta conseguir la cantidad más baja de humedad. Finalmente, fueron pulverizadas con un molino de cuchilla (Baumgarten Porta Westfalica) hasta obtener una harina con grano de diámetro fino (Aranda *et al.*, 2012).

2.2.2 Proceso de fermentación

Se pesó 150 g de la harina obtenida tras la molienda y se colocó en frascos de tapa azul. Se sometió a un proceso de esterilización en un autoclave (H1-CLAVE) a 120 °C

durante 15 minutos (Aranda *et al.*, 2012). Se enfrió y se colocó en bandejas de un volumen aproximado de 2 L (10 cm x 20 cm x10 cm) a una temperatura de 25 °C, humedad de 60-65% y pH del medio entre 5-6.

La fermentación se llevó a cabo en un agitador orbital (Incu-Shaker mini). Los parámetros fueron definidos en base los resultados que determinaron las condiciones del medio de crecimiento óptimo para el desarrollo de *Aspergillus niger* en harina de cáscara de papa (Apunte, 2019) dentro del proyecto de investigación “Fermentación microbiana a partir de residuos de papa (*Solanum tuberosum* L.) para la obtención de un alimento animal enriquecido en proteínas” que se desarrolla en la facultad.

Los factores evaluados fueron: la concentración del inóculo (5000 y 50000 conidios/g de medio), tiempo de incubación (5 y 8 días) y la velocidad de agitación (0 y 60 rpm). Las variables respuestas a evaluar fueron la concentración de biomasa y la concentración de proteína.

2.2.3 Determinación de la concentración de biomasa

Para la determinación de la concentración de biomasa se pesaron tres tubos de centrífuga de 15 ml limpios y secos, se registró este valor. En la bandeja de fermentación se mezcló la muestra en una esquina con ayuda de una espátula estéril y se colocó dentro de cada tubo una cantidad equivalente a 5 ml y fueron centrifugados a 4000 rpm durante 10 minutos con una centrífuga (Rotina 380- Hettich Zentrifugen). Se desechó el sobrenadante y se procedió a realizar tres lavados seguidos, cada lavado con 2 ml de agua destilada y centrifugados con las condiciones antes mencionadas.

Se colocaron los tubos dentro de una estufa (Precision-Thermo Scientific) a 70 °C durante 24 horas para eliminar la humedad. Finalmente, se pusieron en un desecador durante 3 horas; se pesaron en una balanza analítica (Adventurer Pro) y se registró el valor para realizar los cálculos de biomasa (Moyano, 2014). Para estimar la concentración de biomasa se utilizó la siguiente ecuación:

Ecuación 1. Expresión para la determinación de la concentración de biomasa.

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

Dónde

[B]: concentración de biomasa (g/ml).

PMS: peso del tubo con la muestra seca (g).

PV: peso del tubo vacío (g).

V: volumen de la muestra tomada (ml).

2.2.4 Determinación de la concentración de proteína

Biuret es un método colorimétrico que permite determinar la concentración de proteínas de una muestra mediante espectroscopia ultravioleta-visible. Bajo condiciones alcalinas, las uniones peptídicas forman un complejo púrpura con sales de cobre, esta unión es detectada a una longitud de onda de 540 nm por el ion Cu^{2+} (**Argañaraz & Hazán, 2017**).

Para la cuantificación de proteína en el medio se tomó muestras a los 0, 5 y 8 días de fermentación. Se mezcló una esquina del producto fermentado con ayuda de una espátula estéril y se pesó 2 g de éste en una balanza analítica (Adventurer Pro). Se colocó en un mortero y se añadió 8 ml de solución de NaCl al 1%, se adicionó una cantidad aproximada de 5 g de arena estéril y se trituró durante 5 minutos. El macerado se colocó en un tubo de centrifuga de 15 ml limpio y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos, se recolectó el sobrenadante.

Se colocó 0,1 ml del sobrenadante y se añadió 0,9 ml de reactivo Biuret previamente preparado según las especificaciones de **Argañaraz & Hazán (2017)**. Se realizó las pruebas por triplicado. Los tubos reposaron durante 20 minutos a temperatura ambiente mientras ocurre la reacción.

Finalmente, se leyó la absorbancia de la muestra con un espectrofotómetro UV-vis (accuSkan GO- Fisher Scientific) a una longitud de onda de 540 nm. Se determinó la concentración de proteínas a partir de una curva patrón de albúmina bovina con una concentración en el rango de 5 hasta 20 mg/ml previamente realizada (Anexo 1).

2.2.5 Determinación de la concentración de azúcares reductores

Se pesó 50 mg de la harina y se colocó en tres tubos de centrífuga de 15 ml. Se realizó una hidrólisis enzimática en cada uno, para ello se colocó una pequeña cantidad de la enzima α -amilasa termoestable (Termamyl) y se calentó la muestra a 90°C durante 30 minutos en un baño María (Memmart). El blanco se corrió a las condiciones antes mencionadas, pero con ausencia de harina. Se enfrió la solución y se añadió 2 ml de tampón acetato, se reguló cada una a pH 5 y enseguida fueron sometidas a una segunda hidrólisis enzimática; para ello se añadió 100 μ L de glucoamilasa comercial y se incubó a 50 °C durante 4 horas.

Se enfrió la solución y se centrifugó (Rotina 380- Hettich Zentrifugen) a 4500 rpm durante 5 minutos, se conservó el sobrenadante. Se tomó una alícuota de 0,150 ml de sobrenadante y se añadió 0,150 ml de DNS en un tubo bacteriológico, se calentó a 100 °C durante 5 minutos, se colocó 3 ml de agua destilada y se leyó la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (accuSkan GO- Fisher Scientific) (Peña, 2015). 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 2).

2.2.6 Determinación de los parámetros cinéticos

Se consideró los mejores valores obtenidos durante la fermentación del medio optimizado y se procedió a realizar tres fermentaciones. Éstas se realizaron con los parámetros de humedad, temperatura y pH mencionado en el apartado 2.2.2. Al finalizar el proceso se elaboró la curva de crecimiento de *Aspergillus niger* en cáscara de papa y

se determinó la tasa de crecimiento, el tiempo de generación y el rendimiento biomasa-sustrato.

2.2.6.1 Curva de crecimiento microbiano de *Aspergillus niger*

Para la obtención de la curva de crecimiento microbiano se recolectaron muestras cada dos días por doce días de la fermentación optimizada especificada en el apartado 2.2.6. Se utilizó el método de determinación de concentración de biomasa especificado en el apartado 2.2.3.

Los datos fueron procesados en una hoja de cálculo donde se representó el logaritmo de la concentración de biomasa frente al tiempo de fermentación. Se determinó las fases de la curva de crecimiento de *Aspergillus niger*.

2.2.6.2 Determinación de tasa de crecimiento microbiano

La tasa de crecimiento microbiano (μ) es la tasa a la cual una población microbiana se duplica en un tiempo determinado tomada en la fase exponencial suponiendo que existe un exceso de sustrato (Ausel, Auxt, & Sin, 2009). Se define como el incremento en el número de células (dN) en un intervalo corto de tiempo (dt). En este caso, la ecuación que describe la cinética es la siguiente:

Ecuación 2. Expresión de la cinética de crecimiento microbiano

$$\frac{dN}{dt} = \mu N$$

Al integrar y aplicar logaritmo neperiano se obtiene la siguiente expresión que describe el comportamiento lineal de un microorganismo en la fase exponencial de la curva de crecimiento:

Ecuación 3. Linealización de la expresión de la cinética de crecimiento microbiano

$$\ln N = \ln N_0 + \mu t$$

Dónde

N : número de células

N_0 : número de células en un tiempo definido

μ : tasa de crecimiento

t : tiempo

Al aplicar esto en los resultados obtenidos se procedió a tomar la fase exponencial de la curva de crecimiento microbiano y se aplicó logaritmo neperiano y se halló la pendiente de la curva.

2.2.6.3 Determinación de tiempo de generación

En base a la tasa de crecimiento específica se pudo determinar el tiempo de generación (T) con la siguiente ecuación:

Ecuación 4. Tiempo de generación.

$$\mu = \frac{\ln 2}{T} .$$

Dónde:

μ : tasa de crecimiento microbiano.

T : tiempo de generación

2.2.6.4 Cálculo del rendimiento biomasa-sustrato

El parámetro rendimiento biomasa-sustrato ($Y_{x/s}$) es un parámetro cinético que relaciona la cantidad de biomasa que se forma en función de la cantidad de sustrato que

se consume. Para ello se considera la biomasa inicial y final de *Aspergillus niger* así como el sustrato inicial y consumido por el microorganismo (Ausel *et al.*, 2009). El parámetro sigue la siguiente expresión:

Ecuación 5. Rendimiento biomasa sustrato.

$$Y_{x/s} = -\frac{x_f - x_0}{s_f - s_0}$$

Dónde

$Y_{x/s}$: Rendimiento biomasa-sustrato.

x_f : Concentración de biomasa final.

x_0 : Concentración de biomasa inicial.

s_f : Concentración de sustrato final.

s_0 : Concentración de sustrato inicial.

2.2.7 Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se utilizó el software Statgraphics Centurion versión XVI.I con un diseño experimental 2^3 donde se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existen diferencias significativas entre los factores estudiados y sus interacciones.

Se optimizó los factores: concentración de inóculo, tiempo de fermentación y velocidad de agitación para conocer la mejor relación entre las variables respuesta: concentración de biomasa y proteína. Se consideraron las diferencias significativas con un valor-p < 0,05 (Gutierrez, 2012).

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis y discusión de resultados

3.1.1 Análisis de la concentración de biomasa como variable respuesta

Los factores que se controlaron en el proceso fermentativo fueron: velocidad de agitación, concentración de inóculo y tiempo de fermentación. El Anexo 3 muestra un resumen de los valores obtenidos durante la fermentación en estado sólido de *Aspergillus niger* en sustrato de harina de cáscara de papa. Se realizó un diseño factorial 2^3 para determinar la influencia sobre las variables respuestas de la concentración de biomasa y proteína por individual.

Del análisis estadístico total se reporta para cada variable respuesta (Concentración de biomasa y proteína) los siguientes indicadores: tabla de análisis de varianza (ANOVA), coeficiente de determinación, diagrama de Pareto estandarizada, gráfico de efectos principales y gráfico de superficie de respuesta.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la ANOVA para la concentración de biomasa (Tabla 3), el Valor-p de los factores tiempo de fermentación (A), velocidad de agitación (B), concentración de inóculo (C) y la interacción BC fueron inferiores a 0,05, lo que indica que son significativamente diferentes de cero en el nivel de confianza del 95,0%. Según **Gutierrez (2012)** una significancia diferente de cero indica que los factores que cumplen con este parámetro influyen significativamente sobre el proceso en análisis.

Tabla 3. Tabla ANOVA 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: Tiempo	0,012341	1	0,012341	27,36	0,0004
B: V agitación	0,0507781	1	0,0507781	112,56	0,0000
C:C inóculo	0,0443187	1	0,0443187	98,25	0,0000
BC	0,015798	1	0,015798	35,02	0,0001
Bloques	0,000141491	1	0,000141491	0,31	0,5878
Error total	0,00451102	10	0,000451102		
Total (corr.)	0,127888	15			

El Diagrama de Pareto indica la magnitud absoluta del efecto estandarizado de cada factor significativamente influyente (**Gutierrez, 2012**), es decir el grado de afectación de cada factor sobre el proceso. Este gráfico elimina el error estándar del muestreo.

El efecto estandarizado se grafica en el eje x del diagrama de Pareto expresado en valor absoluto. Sirve de estadístico de prueba para aprobar la hipótesis nula contra la alternativa. Así, se rechaza la hipótesis nula si el valor absoluto del efecto estandarizado es mayor que el valor crítico de tablas de la distribución t de Student con ν grados de libertad correspondientes al error del análisis (**Gutierrez, 2012**). Éste último valor se adiciona en el diagrama de Pareto con una línea azul.

Para el caso de la concentración de biomasa se puede apreciar que el factor velocidad de agitación (B) seguido del factor concentración de inóculo (C) abarcan la mayor parte de influencia sobre el proceso fermentativo (Figura 3) Sin embargo la interacción BC y el tiempo de fermentación (A) también sobrepasan la línea de valor crítico de la tabla de distribución t de Student (Línea vertical de color azul). Por tanto, los estadísticos del diagrama de Pareto corroboran la afirmación que proporcionó la ANOVA al concluir que todos los factores son estadísticamente diferentes de cero.

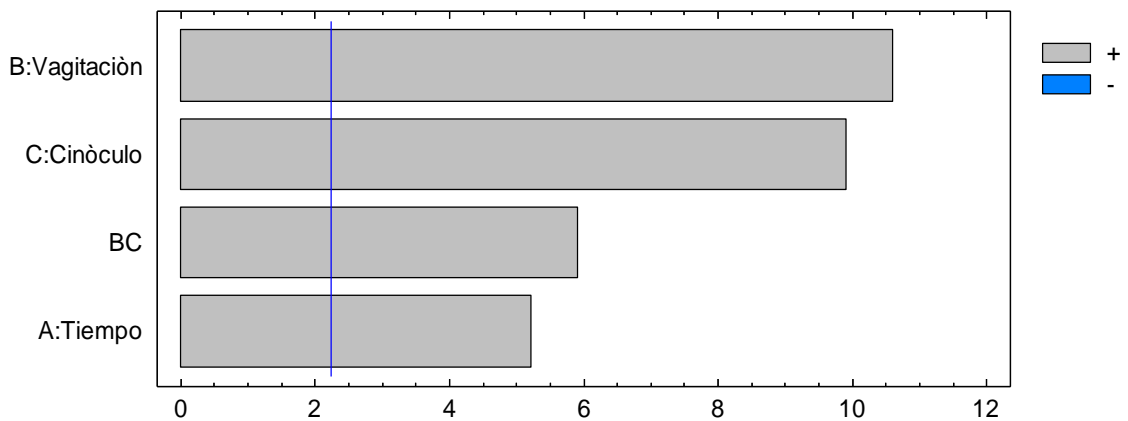


Figura 3. Diagrama de Pareto estandarizada para la concentración de biomasa.

El Gráfico de Efectos Principales (Figura 4) indica una mayor influencia para los factores velocidad de agitación (B) y concentración de inóculo (C) sobre la concentración de biomasa. Se determina que a medida que aumenta la velocidad de agitación de 0 a 60 rpm y la concentración de inóculo de 5000 a 50000 conidios, aumenta la concentración de biomasa; es decir existe una mayor tasa de duplicación celular. El tiempo (A) presenta una línea menos pronunciada al incrementar los días de fermentación, es posible que la influencia de este factor afecte de manera significativa al proceso en un rango más alto o cuando se alcance la máxima tasa de duplicación celular (Reyes *et al.*, 2013).

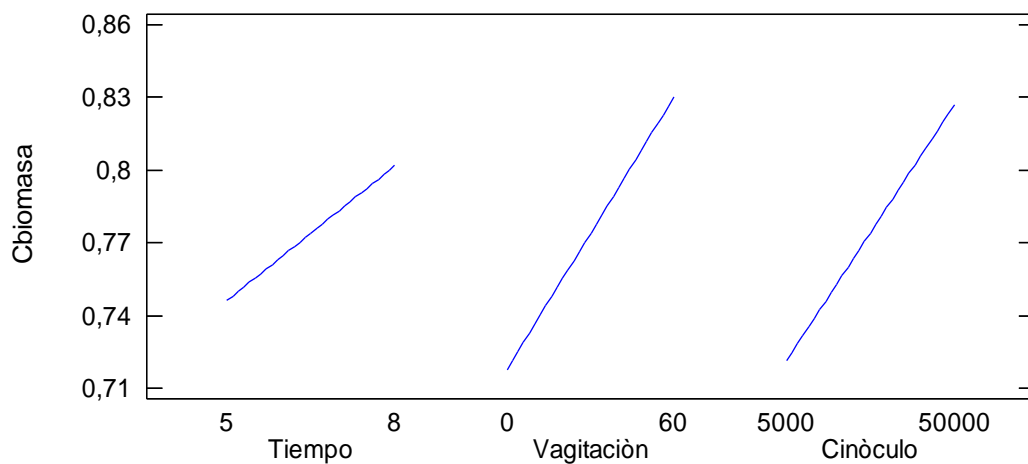


Figura 4. Gráfico de efectos principales para la concentración de biomasa.

El análisis de regresión muestra un coeficiente de correlación de 96,4727% lo que indica una relación ajustada a la línea de tendencia de los datos muestrales. A continuación, se reporta la ecuación optimizada para la predicción de la concentración de Biomasa en el proceso fermentativo de *Aspergillus niger* en sustrato de cáscara de papa.

Ecuación 6. Ecuación optimizada para la predicción de la concentración de biomasa.

$$CB = 0,57144 + 0,018515 A + 0,000597657 B + 9,4255 \times 10^{-7} C + 4,65519 \times 10^{-8} BC$$

Dónde:

CB: Concentración de Biomasa

A: Tiempo de Fermentación

B: Velocidad de agitación

C: Concentración de inóculo

3.1.2 Análisis de la concentración de proteína como variable respuesta

De acuerdo a los resultados obtenidos en la ANOVA para la concentración de proteína (Tabla 4), el Valor-P de los factores tiempo de fermentación (A), velocidad de agitación (B), concentración de inóculo (C) y la interacción AB y AC fueron inferiores a 0,05, lo que indica que son significativamente diferentes de cero en el nivel de confianza del 95,0% por tanto se concluye que los mismos afectan significativamente al proceso fermentativo para los resultados de la concentración de proteína.

Tabla 4. Tabla ANOVA para la concentración de proteína.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A: Tiempo	52,753	1	52,753	176,11	0,0000
B: V agitación	81,9509	1	81,9509	273,58	0,0000
C:C inóculo	2,493	1	2,493	8,32	0,0180
AB	9,47978	1	9,47978	31,65	0,0003
AC	2,09489	1	2,09489	6,99	0,0267
Bloques	0,0443208	1	0,0443208	0,15	0,7094
Error total	2,69592	9	0,299546		
Total (corr.)	151,512	15			

El diagrama de Pareto indica que el factor velocidad de agitación (B) seguido del factor concentración tiempo de fermentación (A) abarcan la mayor parte de influencia sobre el proceso fermentativo (Figura 5) El factor cantidad de inóculo (C) y las interacciones AB y AC representan valores menores, pero se consideran significativos debido a que sobrepasan la línea de valor crítico de la tabla de distribución *t* de Student (Línea vertical de color azul). Por tanto, los estadísticos del diagrama de Pareto corroboran la afirmación que proporcionó el análisis de varianza al concluir que los factores son estadísticamente diferentes de cero para la variable concentración de proteína.

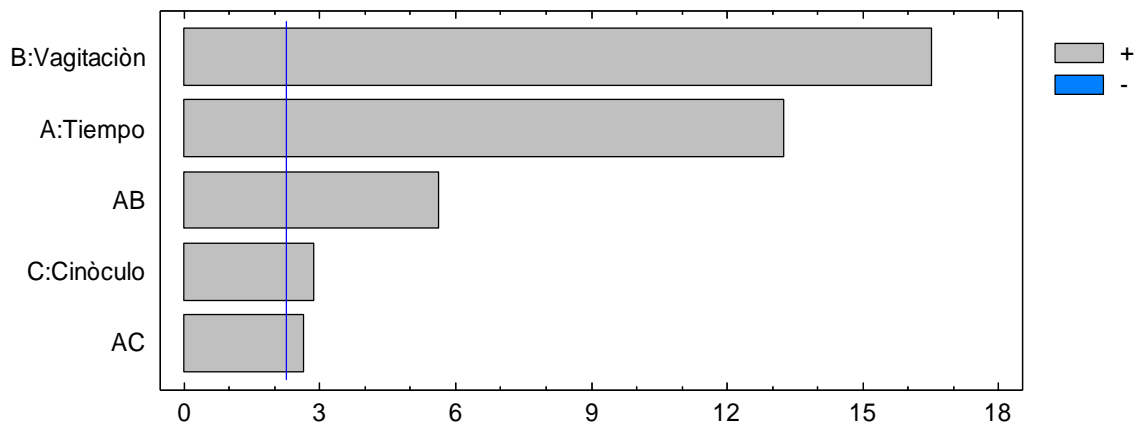


Figura 5. Diagrama de Pareto estandarizada para la concentración de proteína.

El Gráfico de Efectos Principales (Figura 6) indica una mayor influencia para los factores velocidad de agitación (B) y tiempo de fermentación (A) sobre la concentración de proteína. Se determina que a medida que aumenta la velocidad de agitación de 0 a 60 rpm y el tiempo de fermentación de 5 a 8 días, aumenta la concentración de proteína. La velocidad de agitación presenta una línea con mayor inclinación. Al parecer la agitación permite que las células obtengan un mejor contacto con la superficie y pueden disponer de mejor manera los nutrientes del medio. De esta manera existe una correlación directamente proporcional entre la superficie del sustrato y el crecimiento celular de *Aspergillus niger*.

El tiempo de fermentación influye sobre el crecimiento celular. A mayor división celular mayor síntesis de proteína en el medio, esto se consigue cuando el microorganismo se encuentra en la fase de crecimiento exponencial (Cujilema *et al.*, 2018). De tal manera, mientras el conidio se encuentre en la fase exponencial de crecimiento existirá mayor cantidad de biomasa y por ende mayor nivel de proteína sintetizada.

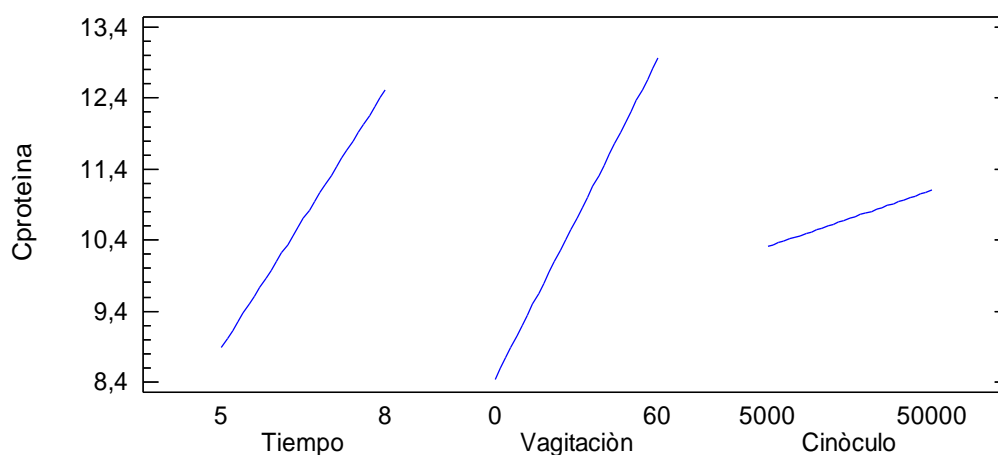


Figura 6. Gráfico de efectos principales para la concentración de proteína.

El análisis de regresión muestra un coeficiente de correlación de 98,2207% lo que indica una relación ajustada a la línea de tendencia de los datos muestrales. A continuación, se reporta la ecuación optimizada para la predicción de la concentración de proteína en el proceso fermentativo de *Aspergillus niger* en sustrato de cáscara de papa.

Ecuación 7. Ecuación optimizada para la predicción de la concentración de proteína.

$$CP = 5,34187 + 0,402531 - 0,03574 B - 5,21448 \times 10^{-5} C + 0,0171051 AB \\ + 1 \times 10^{-5} AC$$

Dónde:

CP: Concentración de Proteína

A: Tiempo de Fermentación

B: Velocidad de agitación

C: Concentración de inóculo

3.1.3 Optimización del proceso de fermentación en estado sólido

Para optimizar un proceso es necesario ajustar el modelo de las ecuaciones de regresión lineal a un conjunto de puntos que pertenecen a la región experimental del proceso en análisis. El programa estadístico emite un gráfico que describe el comportamiento de la vibración de estos puntos sobre la región experimental (**Gutierrez, 2012**). El diagrama toma el nombre de Superficie de Respuesta y describe el comportamiento de la respuesta promedio en cada punto de la región experimental.

De las ecuaciones 6 y 7 se obtuvo los diagramas de superficie de respuesta para la optimización de la concentración de biomasa (Figura 7) y la optimización de la concentración de proteína (Figura 8).

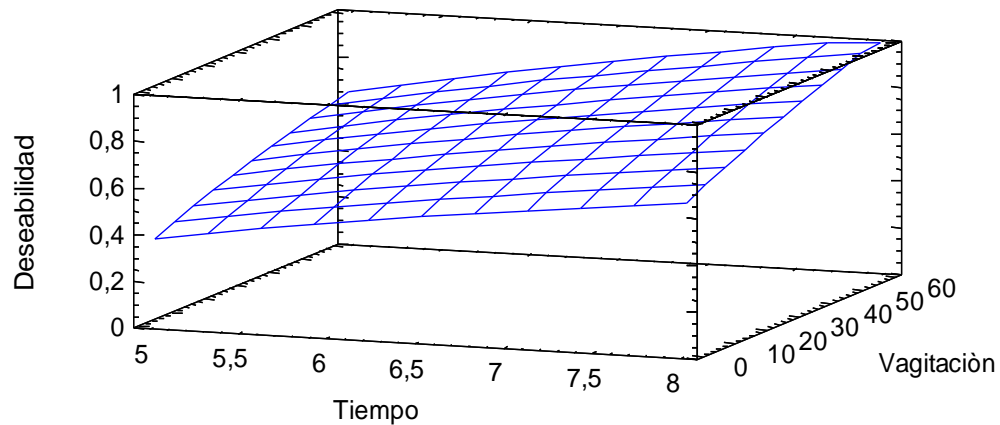


Figura 7. Superficie de respuesta del modelo ajustado en el proceso fermentativo para optimizar la concentración de biomasa con una concentración de inóculo de 50000 conidios/g de medio.

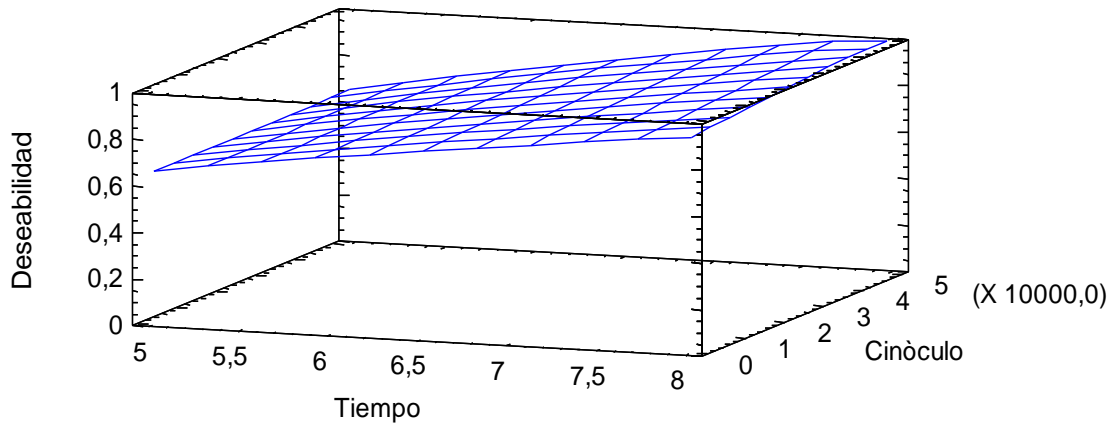


Figura 8. Superficie de respuesta del modelo ajustado en el proceso fermentativo para optimizar la concentración de proteína con una velocidad de agitación de 60 rpm.

Se observa que con una concentración de inóculo de 50000 conidios, una velocidad de agitación de 60 rpm y un tiempo de fermentación de 8 días es posible alcanzar la deseabilidad más alta (1), por tanto, la optimización de los factores en el proceso fermentativo (Anexo 4).

Tanto en la Figura 7 como en la Figura 8 se observa una superficie lineal con tendencia a un crecimiento positivo. Este fenómeno explica que aún no se ha alcanzado el nivel

máximo de optimización y que los valores críticos de los 3 factores se encuentran por encima de los rangos establecidos en el análisis (**Gutierrez, 2012**). Sin embargo, se necesita de un estudio con variación de niveles altos y bajos para poder establecer los verdaderos puntos críticos. Si se quiere reproducir los valores obtenidos en este experimento no es recomendable variar los valores de los factores establecidos en este estudio puesto que no se conoce el comportamiento del hongo fuera del rango preestablecido.

Los resultados de las variables respuesta optimizadas se resumen en la Tabla 5. Se obtuvo una concentración de biomasa de 0,9422 g/ml y una concentración de proteína de 16,3092 mg/ml al finalizar el proceso de fermentación.

Tabla 5. Valores de las variables respuesta optimizados.

<i>Variable respuesta</i>	<i>Valor Óptimo</i>
Concentración de biomasa (g/ml)	0,9422
Concentración de proteína (mg/ml)	16,3092

Isique & Sing (2017) realizaron estudios sobre la disponibilidad de azúcares reductores y el análisis químico de residuos de cáscara de papa, camote y yuca. Los resultados del análisis químico reportan valores para la concentración de proteína en cáscara de papa de 5,26 g/ml.

Borras-Sandoval et al. (2016) en su estudio de la determinación de la influencia de la temperatura sobre el crecimiento de *Aspergillus niger* en sustrato de harina de papa logró incrementar el valor proteico de 3,21 a 8,33 g/ml al finalizar la fermentación al mantener una temperatura de crecimiento de 25 ± 3 °C. Por otro lado, **Aranda et al. (2012)** lograron obtener un alimento enriquecido proteicamente basado en caña de azúcar a través de una fermentación en estado sólido utilizando una mezcla de bacterias lácticas en simbiosis con hongos como *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger*, el

incremento fue de 4, 18 a 19,43 mg de proteína sobre 100 g de cultivo de cultivo fermentado.

Por tanto, el valor de incremento proteico obtenido en esta experimentación se encuentra dentro de los rangos reportados bibliográficamente.

3.1.4 Determinación de los parámetros cinéticos del proceso fermentativo.

Según **Arnáiz (2000)**, la cantidad total de biomasa representa la concentración de microorganismos vivos, muertos, material inerte, polímeros extracelulares y materia orgánica en el momento de la toma de la muestra. Esta magnitud puede medirse en términos de peso seco por unidad de volumen. Los resultados arrojan valores muy proximales además de ser un método de fácil aplicación en medios líquidos y semisólidos.

Con el método de peso seco se determinó la concentración de biomasa obtenida en el proceso de fermentación tomando muestras cada 2 días durante 12 días. De cada uno de estos valores se determinó el logaritmo neperiano (\ln) como se observa en el Anexo 5. En la Figura 9 se presenta la curva de crecimiento del *Aspergillus niger* en sustrato de cáscara de papa en la cual se observan 3 fases del crecimiento microbiano.

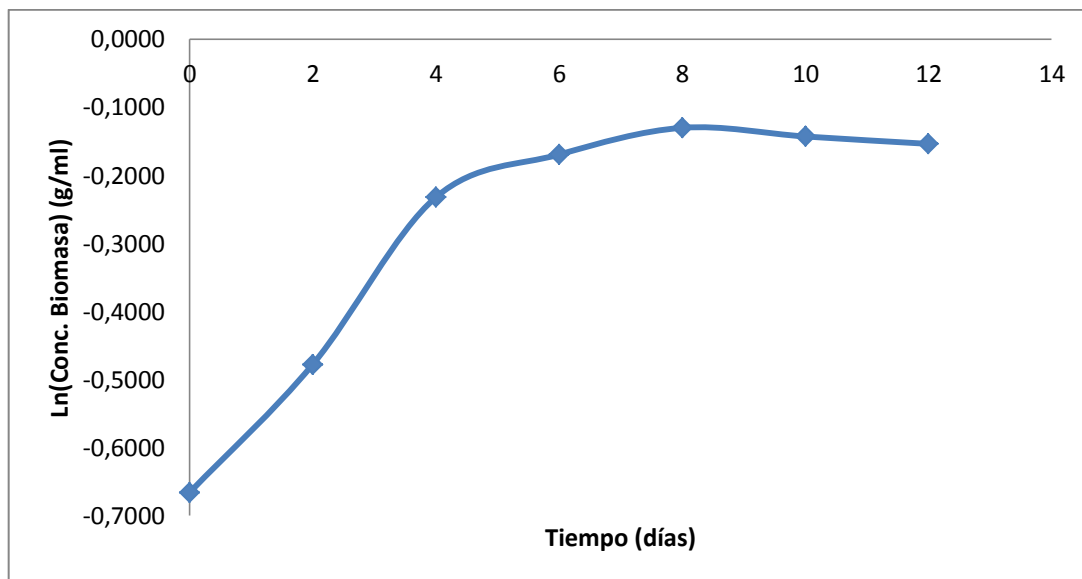


Figura 9. Curva de crecimiento de *Aspergillus niger* en sustrato de cáscara de papa

El cultivo comienza la fase exponencial desde 0 hasta los 4 días de fermentación. Se consideran estos valores ya que existe un cambio brusco desde 0,25 a 0,65 g/ml en un tiempo relativamente corto. Durante esta fase la síntesis de todos los constituyentes celulares se incrementa a una rapidez constante, de modo que la población de células se duplica a intervalos regulares (Mendez, 2013).

A partir del cuarto día en adelante se observan cambios pequeños y poco variables en la concentración de biomasa. De ahí que se puede asumir que a partir del cuarto hasta el octavo día el hongo experimenta la fase de crecimiento estacionario. Esta fase se caracteriza por no tener un crecimiento neto. De hecho, el crecimiento puede estar ocurriendo, pero está equilibrado con la lisis celular (Mendez, 2013). Las células pueden permanecer viables por períodos largos en esta fase con existencia de metabolismo endógeno, oxidación y almacenamiento de polímeros, formación de proteínas entre otros.

Al décimo día, la concentración de biomasa empieza a descender. Es evidente que para este punto el medio ha perdido en gran medida la humedad relativa y se ha producido una reducción notable de sustrato para el metabolismo de *Aspergillus*.

Reyes *et al.* (2013) en su estudio del comportamiento cinético de *Aspergillus niger* sobre un cultivo sólido muestra la influencia de la concentración de glucosa sobre el desarrollo de la biomasa resultante. Varió la concentración de glucosa desde 0,025 a 0,25 g/ml en el sustrato. Determinó que el tiempo en el que *Aspergillus niger* entra en la fase exponencial para este rango de concentración de sustrato varía desde 70 a 100 horas, esto es de 2,9 a 4,17 días. La concentración inicial de glucosa en este experimento fue de 0,123 g/ml y se determinó que la fase exponencial se cumple hasta los 4 días de fermentación por lo que los datos obtenidos experimentalmente concuerdan con los reportados en bibliografía.

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 3) en la región de crecimiento exponencial como que se observa en la Figura 10, obteniendo un valor de $u = 0,005708 h^{-1}$. El tiempo de duplicación de la población se determinó a partir de la Ecuación 4, teniendo como resultado un $T = 121,42 h$.

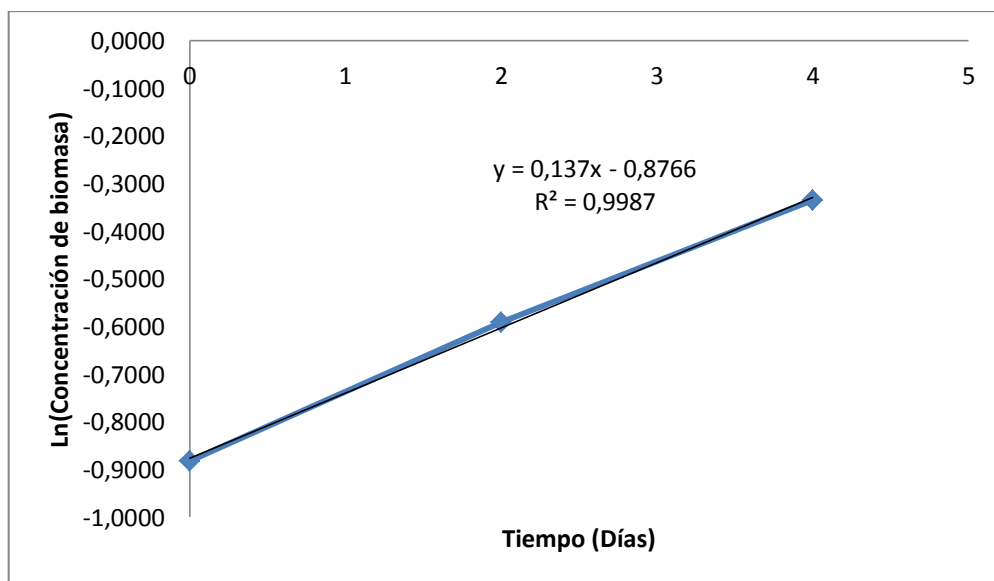


Figura 10. Fase exponencial de crecimiento para *Aspergillus niger*.

Según Chanagá *et al.* (2012), la velocidad específica para hongos como *Aspergillus niger* se encuentra desde $0,01032 h^{-1}$ hasta $0,1213 h^{-1}$. El valor experimental obtenido

de la fermentación en estado sólido fue de $0,005708 \text{ h}^{-1}$ es decir, 0,005 unidades menos que el valor mínimo reportado bibliográficamente.

Entre las posibilidades existentes para explicar este fenómeno se reportan las relacionadas al mantenimiento celular y acondicionamiento al medio por parte del hongo en el medio de crecimiento. Existe una etapa durante el crecimiento celular denominada fase de latencia (Lag). La fase Lag representa un período de adaptación para el crecimiento en un medio nuevo y modifica la síntesis de las enzimas requeridas para la evolución en este medio.

No es posible detectar la fase de latencia en la curva de crecimiento microbiano (Figura 9) debido a que el intervalo de tiempo es muy amplio y las modificaciones de las rutas metabólicas en los microorganismos ocurren en las primeras horas después de la inoculación (**Cujilema et al., 2018**). De ahí que es necesaria una curva de crecimiento con un rango de tiempo más corto para poder identificar los cambios mencionados.

Sin embargo, tomando en cuenta el comportamiento del hongo (valores de peso seco) durante los primeros 2 días después de la inoculación es posible afirmar que requirió de un tiempo considerable para adaptarse al medio y poder iniciar con su etapa de duplicación celular (**Mendez, 2013**).

Otro de los factores que influye en un largo periodo de adaptación es el desdoblamiento de polisacáridos en azúcares más simples para el metabolismo de *Aspergillus niger* (**Reyes et al., 2013**). Siendo el sustrato almidón, el hongo necesita de la síntesis de enzimas capaces de destruir estos enlaces para obtener un azúcar de menor peso molecular para una mayor biodisponibilidad.

El rendimiento biomasa sustrato indica la eficiencia de la fermentación. Relaciona la variación de la cantidad de biomasa obtenida al finalizar la fermentación en función del sustrato consumido durante el proceso (**Ausel et al., 2009**). Aplicando la Ecuación 5 se obtuvo un rendimiento de $Y_{x/s} = 0,5074 \text{ g de biomasa/mg de glucosa consumida}$, es

decir que por cada mg de glucosa consumida el microorganismo produce 0,5074 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 $T = 61,23 h$ y un $Y_{x/s} = 9,79 g$ de biomasa/g sustrato (0,00979 g de biomasa/ mg de sustrato). Por otro lado **Mendez (2013)** en su estudio sobre la producción de ácido glucónico empleando *Aspergillus niger* obtuvo una velocidad específica de crecimiento $u = 0,00891 h^{-1}$, un tiempo de duplicación $T = 77,79 h$ y un $Y_{x/s} = 5,38 g$ de biomasa/g sustrato (0,00538 g de biomasa/ mg de sustrato)

Es evidente que existe un mejor rendimiento en el sustrato de cáscara de papa que en los sustratos mencionados bibliográficamente ya que *Aspergillus niger* en el sustrato de experimentación proporcionó un incremento de biomasa. Es muy probable que éste fenómeno ocurra debido al tipo de sustrato que se suministra. El almidón al ser un polisacárido, posee en su composición mayor cantidad de azúcares a comparación de los sustratos citados bibliográficamente donde la fuente de carbono es directamente sacarosa o glucosa

Del mismo modo se explica los valores bajos de la tasa de crecimiento microbiano (μ) y altos del tiempo de generación (T) en este experimento. *Aspergillus niger*, al encontrarse en un sustrato con nutrientes de alto peso molecular se ve en la necesidad de adaptar su ruta metabólica con la producción de enzimas específicas capaces de desdoblar el almidón en azúcares más liviano (**Cujilema et al., 2018**).

3.2 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 los factores: velocidad de agitación, concentración de inóculo y tiempo de fermentación influyen significativamente sobre el enriquecimiento proteico del sustrato de cáscara de papa (*Solanum tuberosum* L.) durante el proceso fermentativo de *Aspergillus niger*.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

Se determinó la influencia de los factores: concentración de inóculo, tiempo de fermentación y velocidad de agitación sobre el proceso fermentativo de *Aspergillus niger* en sustrato de cáscara de papa mediante un análisis estadístico de diseño factorial 2^3 indicando que existieron diferencias significativas entre los tres factores con un nivel de confianza $p < 0,05$.

Se observó que a pesar de que todos los factores influyeron significativamente sobre el proceso fermentativo, los que afectaron en mayor proporción fueron la velocidad de agitación (B) y la concentración del inóculo (C).

Se optimizó el proceso de fermentación en estado sólido con los siguientes parámetros: velocidad de agitación (60 rpm), concentración de inóculo (50000 conidios) y tiempo de fermentación (8 días) con las cuales se maximizó las variables respuesta obteniendo valores de concentración de proteína de 16,3092 mg/ml y una concentración de biomasa de 0,9422 g/ml.

Se determinaron los parámetros cinéticos del microorganismo en el medio optimizado obteniendo una velocidad específica de crecimiento $u = 0,005708 \text{ h}^{-1}$, un tiempo de duplicación $T = 121,42 \text{ h}$ y un rendimiento $Y_{x/s} = 0,5074 \text{ g de biomasa/mg de sustrato consumido}$.

Se caracterizó el proceso fermentativo de *Aspergillus niger* P.E.L Van Tiegghem utilizando un medio sólido optimizado con sustrato de harina de cáscara de papa (*Solanum tuberosum* L.) y se determinó un incremento del nivel proteico final del medio en comparación con los valores iniciales del proceso debido al aumento de biomasa celular.

4.2 Recomendaciones

Realizar la conservación de la cepa cada 2 meses para reducir el riesgo de la pérdida de viabilidad.

Acondicionar las cepas conservadas a la temperatura ambiente por lo menos durante 24 horas para que el hongo pueda adaptarse de mejor manera al sustrato durante la fermentación.

Realizar pruebas de viabilidad de esporas para determinar el porcentaje de germinación. Este valor ayudará en la decisión de agregar o no una cantidad de conidios para compensar el déficit y obtener una mejor eficiencia.

Para obtener una curva de crecimiento microbiano más definida se recomienda tomar muestras de 6-12 horas durante 15 días. De esta manera se obtendrá un rango con menos dispersión de punto y una mejor predicción del comportamiento de *Aspergillus niger* en el medio.

Considerar otros tipos de modelos cinéticos de crecimiento celular que proporcionen mejores resultados de crecimiento y rendimiento.

BIBLIOGRAFÍA

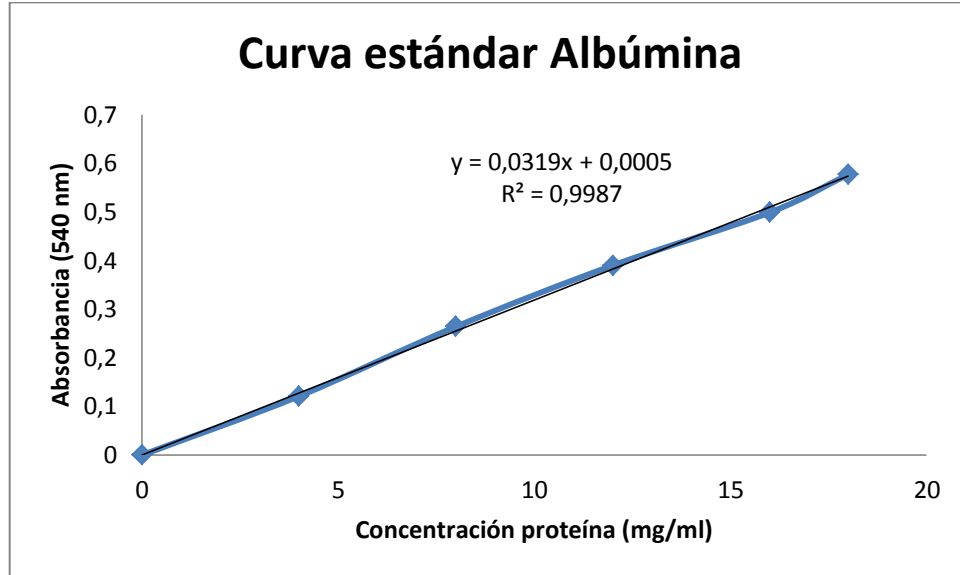
- Apunte, D. (2019). *Obtención de un medio enriquecido en proteínas a partir de residuos de papa (Solanum tuberosum) por fermentación microbiana Trabajo*. 1–42.
- Aranda, E. M., Georgana, L. E., Salgado, S., & Ramos, J. (2012). Elaboración de un alimento basado en caña de azúcar a partir de la fermentación en estado sólido y con diferentes niveles de zeolitas. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 46(2), 159–164.
- Argañaraz, Natalia; Hazán, M. (2017). Reconocimiento de Proteínas. *Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva*, 3, 1–21. Retrieved from http://lcve.mincyt.gob.ar/downloads/Santiago_del_Estero_TPC2016_par3.pdf
- Arnáiz, C., Isac, L., & Lebrato, J. (2000). Determinación de la biomasa en procesos biológicos. *Grupo de Tratamiento de Aguas Residuales. Escuela Universitaria Politécnica*, 2, 1–8.
- Arnold, M., Dahan, G., & Noblesse-Rocher, A. (2012). Fundamentos del proceso de fermentación en el beneficio del café. *Cenicafé*, 2, 1–30. <https://doi.org/0120-0178>
- Ausel, A., Auxt, A., & Sin, P. (2009). Comparación de Bacteria , Archaea y EucO / ya. In *McGRAW-HILL Interamericana* (5th ed.). España.
- Borras, L. M., Iglesias, A. E., & Moyano, M. A. (2016). Efecto de la temperatura y el tiempo sobre los indicadores de la papa (*Solanum tuberosum*) fermentada en estado sólido. *Ciencia Y Agricultura*, 11(2), 31. <https://doi.org/10.19053/01228420.3835>
- Chanagá, X., Plácido, J., Marín, M., & Yepres, M. D. S. (2012). Hongos Nativos con Potencial Degradador de Tintes Industriales en el Valle de Aburrá , Colombia. *Revista Facultad Nacional Agronomía de Medellín*, 65(2), 6811–6821. <https://doi.org/6811-6821>
- Cujilema, M. C., León, G., & Porro, M. R. (2018). Producción de lipasas por fermentación sólida con *Aspergillus niger*: influencia del ph. *Revista Centro Azúcar*, 45, 1–9.
- Gardens, R. B. (2016). Review Author (s): Alan Paton Review by: Alan Paton Published by: Springer on behalf of Royal Botanic Gardens , Kew Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/4110257> Accessed : 25-06-2016 03 : 46 UTC. *Royal*

- Botanic UK*, 50(4), 838–839.
- Gutierrez, H. (2012). *Análisis y Diseño de Experimentos* (Tercera). Retrieved from IQ/146073555478947?ref=bookmarks
- Guzmán, C., Hurtado, A., Carreño, C., & Casos, I. (2017). Production of polyhydroxyalkanoates by native halophilic bacteria using *Solanum tuberosum* L. shell starch. *Scientia Agropecuaria*, 8(2), 109–118. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2017.02.03>
- Horincar, V., Popa, A., Parfene, G., & Balaes, T. (2014). Study of preliminary Biothechnological Conditions for *Pleurotus ostreatus* cultivation on submerged system. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 15, 58–62.
- INIAP. (2013). Programa nacional de raíces y tubérculos. *Varietades de Papa En El Ecuador*, 1, 1–320.
- Isique, M., & Sing, J. (2017). Influencia de la hidrólisis química en las características fisicoquímicas y funcionales de los residuos industriales de papa, camote y yuca. *Universidad Nacional Del Santa*, 7, 1–234.
- Martín Bedoya, J. G., & Montes Ortiz, A. M. (2012). *Evaluación de las actividades antibacteriana y alelopática del extracto en acetato de etilo y de algunas fracciones de Miconia caudata* (Primera). Colombia.
- Mendez, J. (2013). Producción de ácido glucónico aplicando cinética de crecimiento microbiano a partir de *Aspergillus niger* y como medio de cultivo, dulce de atado. *Revista de Universidad de El Salvador*, 6, 1–184.
- Moyano, M. A. (2014). Fermentacion en estado solido (FES) de la papa (*Solanum tuberosum*), como alternativa tecnológica para la alimentación. *Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD)*, 3, 1–87. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Peña, C. B. (2015). Evaluación del contenido nutricional y actividad antioxidante en *Solanum tuberosum*. *Revista Universidad Nacional de Colombia*, 4, 1–149. Retrieved from [http://bdigital.unal.edu.co/50055/1/Evaluación del contenido nutricional y actividad antioxidante en *Solanum tuberosum* grupo Phureja Final.pdf](http://bdigital.unal.edu.co/50055/1/Evaluación%20del%20contenido%20nutricional%20y%20actividad%20antioxidante%20en%20Solanum%20tuberosum%20grupo%20Phureja%20Final.pdf)
- Prada Ospina, R. (2012). Alternativa de aprovechamiento eficiente de residuos biodegradables: El caso de almidón residual derivado de la industrialización de la

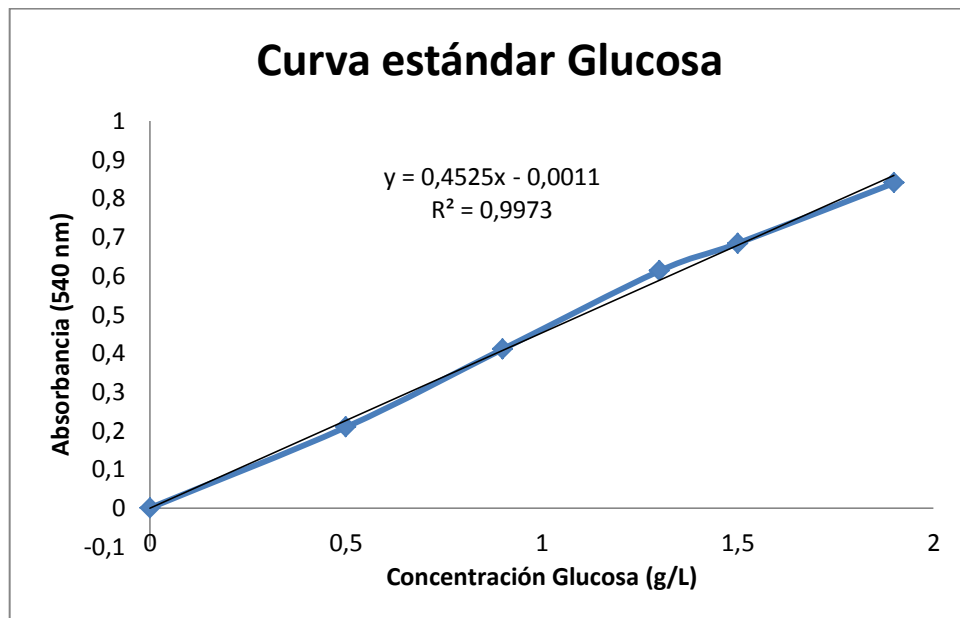
- papa. *Revista EAN*, 3, 180–192. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/ean/n72/n72a12.pdf>
- Reyes, I., González, M., & López, F. (2013). Un análisis del metabolismo de *Aspergillus niger* creciendo sobre un sustrato sólido. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12(1), 41–56.
- Suarez, C. (2012). Utilización de la fermentación líquida de *Lentinula edodes* (SHIITAKE), para la producción de metabolitos secundarios bioactivos y evaluación de su potencial empleo en la producción de un alimento funcional. *Universidad Nacional de Colombia Programa Interfacultades En Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 2, 1–122.
- Vargas Corredor, Y. A., & Pérez Pérez, L. I. (2018). Aprovechamiento de residuos agroindustriales en el mejoramiento de la calidad del ambiente. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 14(1), 1–14. <https://doi.org/10.18359/RFCB.3108>
- Villacrés, E., Quilca, N., Muñoz, R., Monteros, C., & Reinoso, I. (2009). Caracterización física , nutricional y funcional de papas nativas (*Solanum tuberosum ssp.*) para orientar sus usos en Ecuador Physical , nutritional and functional native potatoes (*Solanum tuberosum ssp*) characterization to orient their uses in Ecuado. *Revista Latinoamericana de La Papa*, 15, 52–54.
- Villalobos, M., López, M., Rodríguez, P., & Prado, M. (2014). Obtención de almidón a partir de los residuos de papa del mercado Abastos. *Congreso Interdisciplinario de Cuerpos Académicos*, 3, 266–271. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4859502>
- Wachner, C. (2014). La biotecnología alimentaria antigua: los alimentos fermentados. *Revista Digital Universitaria*, 15(8), 4–5. Retrieved from <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num8/art64/art64.pdf>

ANEXOS

Anexo 1. Curva estándar para la determinación de la concentración de proteína.



Anexo 2. Curva estándar para la determinación de la concentración de glucosa.



Anexo 3. Control de los factores sobre las variables respuesta.

Factores			Variables respuesta	
			Biomasa (g/ml)	Proteína (mg/ml)
Inóculo *(Con/g)	Velocidad (rpm)	Tiempo (días)	\bar{X}^{**}	\bar{X}
5000	60	5	0,7105±0,518	10,4474±0,709
		8	0,7797±0,518	14,8158±0,709
	0	5	0,6933±0,518	8,0263±0,709
		8	0,7124±0,518	8,7105±0,709
50000	60	5	0,8839±0,518	9,9211±0,709
		8	0,9252±0,518	16,0263±0,709
	0	5	0,7118±0,518	7,0789±0,709
		8	0,7517±0,518	10,1842±0,709

*(Con/g)= Conodios/ gramo de sustrato, \bar{X}^{**} Media de réplicas de cada variable

Anexo 4. Optimización de los factores sobre el proceso fermentativo.

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Tiempo	5,0	8,0	8,0
V. agitación	0,0	60,0	60,0
C. inóculo	5000,0	50000,0	50000,0

Anexo 5. Valores de peso seco para la determinación de la curva de crecimiento.

Tiempo (Días)	Conc. Biomasa (g/ml)	Ln (Conc. Biomasa)
0	0,41383	-0,8823
2	0,55353	-0,5914
4	0,71573	-0,3344
6	0,80753	-0,2138
8	0,88803	-0,1187
10	0,86690	-0,1428
12	0,85757	-0,1537
15	0,83043	-0,1858