



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**

**FACULTAD DE INGENIERIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y**

**AMBIENTALES**

**CARRERA DE AGROINDUSTRIAS**

**INFORME FINAL DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR,**

**MODALIDAD PRESENCIAL**

**TEMA:**

**“Fermentación sólida de desechos de la industria del café utilizando  
*Aspergillus niger* para la obtención de biomasa y celulasa”**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniera en Agroindustrias**

**Línea de investigación: Gestión, producción, productividad, innovación y desarrollo  
socioeconómico**

**Autor: Lisba Katherine Panamá Morillo**

**Director: Ing. Jimmy Núñez Pérez MSc.**

**Ibarra - 2024**



# UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

## BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

### AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

#### 1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la ley de educación superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
CEDULA DE IDENTIDAD:	1004323976		
APELLIDOS Y NOMBRES:	Panamá Morillo Lisba Katherine		
DIRECCION:	Cotacachi barrio la Pradera		
EMAIL:	lkpanamam@utn.edu.ec		
TELEFONO FIJO:	(06) 249-1092	TELF. MOVIL	0980955826
DATOS DE LA OBRA			
TITULO:	"Fermentación sólida de desechos de la industria del café utilizando <i>Aspergillus niger</i> para la obtención de biomasa y celulosa"		
AUTOR (ES):	Panamá Morillo Lisba Katherine		
FECHA: AAAAMMDD	16/01/2024		
SOLO PARA TRABAJOS DE TITULACION			
CARRERA/PROGRAMA:	<input checked="" type="checkbox"/> PREGRADO	<input type="checkbox"/> POSGRADO	
TITULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniero en Agroindustrias		
DIRECTOR:	Ing. Jimmy Núñez		

#### 2. CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrollo, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto, la obra es original y que es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad Técnica del Norte en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los veintitrés días del mes de enero del 2024

#### EL AUTOR

(Firma)   
Lisba Katherine Panamá Morillo


# CERTIFICACIÓN DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTERGRACIÓN CURRICULAR

Ibarra, 23 de Enero del 2024

Ing. Jimmy Núñez  
DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

CERTIFICA:


Haber revisado el presente informe final del trabajo de Integración Curricular, el mismo que se ajusta a las normas vigentes de la Universidad Técnica del Norte; en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.

(f):..........  
Firmado electrónicamente por:  
JIMMY NUNEZ PEREZ

Ing. Jimmy Núñez Pérez Msc  
C.C.: 1756606339

## APROBACIÓN DEL COMITÉ CALIFICADOR

El Comité Calificado del trabajo de Integración Curricular “FERMENTACIÓN SÓLIDA DE DESECHOS DE LA INDUSTRIA DEL CAFÉ UTILIZANDO *ASPERGILLUS NIGER* PARA LA OBTENCIÓN DE BIOMASA Y CELULASA” elaborado por **Lisba Katherine Panamá Morillo**, previo a la obtención del título de Ingeniero (a) Agroindustrial, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Universidad Técnica del Norte:

(f):  Firmado electrónicamente por:  
JIMMY NUNEZ PEREZ

Ing. Jimmy Núñez Msc  
C.C.: 1756606339

(f):  Firmado electrónicamente por:  
JUAN CARLOS DE LA  
VEGA QUINTERO

Ing. Juan Carlos de la Vega Msc  
C.C.: 1002958856

(f):  Firmado electrónicamente por:  
HOLGUER MARCELO  
PINEDA FLORES

Ing. Holguer Pineda Flores MBA  
C.C.: 1001672730

## DEDICATORIA

A mi familia, por su amor, paciencia y apoyo incondicional a lo largo de todo este camino. Sin ustedes, este logro no habría sido posible. Porque han sido mi mayor apoyo y motivación durante todo este proceso. Sus palabras de aliento, su paciencia y su amor incondicional han sido fundamentales para que haya llegado hasta aquí. Gracias por entender mis ausencias, mis preocupaciones y mis altibajos durante estos años. Su comprensión y apoyo incondicional me han permitido enfocarme en este trabajo y sacarlo adelante con éxito. A mis amigos y amigas por su alegría, distracción y palabras de ánimo en los momentos más difíciles. Gracias por estar siempre ahí para mí. A mi director de tesis, por su guía, sabiduría y dedicación en ayudarme a alcanzar este logro. Sin su orientación, no habría llegado hasta aquí. A todas las personas que participaron en mi investigación, por su colaboración y disposición para ayudarme a recopilar la información necesaria para este trabajo. A todos aquellos que me inspiraron, motivaron y desafiaron a seguir adelante en mi camino hacia la graduación. Esta tesis es un logro compartido, y quiero agradecerles por formar parte de este proyecto. Espero que esta dedicatoria sea un pequeño reconocimiento a todo lo que han hecho por mí. Gracias por creer en mí y en mi capacidad para lograr grandes cosas.

**Katherine Panamá**

## AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que contribuyeron a la realización de esta tesis.

En primer lugar, quiero agradecer a mi director de tesis y asesores por su guía, consejo y apoyo a lo largo de todo este proceso. Sus valiosas sugerencias y comentarios fueron fundamentales para el éxito de este trabajo.

Asimismo, quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que participaron en mi investigación, por su colaboración, paciencia y disposición para compartir sus conocimientos y experiencias.

A mi familia y amigos, quiero agradecerles por su amor, apoyo incondicional y por ser mi fuente de inspiración en todo momento. Gracias por comprender mis ausencias y por estar ahí cuando más los necesitaba.

Finalmente, quiero agradecer a todas las personas que, de una forma u otra, me inspiraron y motivaron a seguir adelante en este camino. Sin su influencia, este logro no habría sido posible.

¡Muchas gracias a todos por formar parte de este proyecto!

## RESUMEN EJECUTIVO

La creciente preocupación por el manejo inadecuado de los residuos del café ha generado un renovado interés en su aprovechamiento para producir bioproductos de valor añadido. Varios expertos han propuesto soluciones para este problema, como la codigestión anaeróbica de los residuos del procesamiento del café con excretas animales para acelerar la descomposición de compuestos orgánicos peligrosos, así como la fermentación en estado sólido (FES) utilizando hongos para transformar estos compuestos y obtener productos valiosos como hongos comestibles, biocombustibles y enzimas industriales.

El género *Aspergillus sp.* se ha identificado como un microorganismo altamente efectivo en la FES, ya que puede descomponer materiales lignocelulósicos y producir enzimas celulolíticas, como la celulasa. Este hongo puede crecer en condiciones de baja actividad de agua y en una amplia variedad de sustratos, y tiene la capacidad de producir una extensa gama de enzimas hidrolíticas que descomponen la celulosa, uno de los principales componentes de los residuos vegetales.

En este estudio se evaluó la capacidad de este hongo para degradar la celulosa presente en la pulpa de café y producir enzimas con actividad celulolítica por medio de una FES, teniendo en cuenta diferentes parámetros como temperatura (25 °C, 35 °C y 45 °C) y el pH (3, 4 y 5) para maximizar la producción de biomasa y celulasa. Gracias a lo cual se logró encontrar una condición en la que la producción de esporas se maximizaba simultáneamente, utilizando la metodología de superficie de respuesta, en un diseño factorial de 3 niveles, en biorreactores tipo bandeja simple. Luego del análisis y optimización de modelos cuadráticos se obtuvo como resultado un mayor crecimiento tanto de esporas como de enzimas a una temperatura de 25 °C Y pH de 5 como los óptimos

obteniendo un crecimiento de 6.27 esporas/g y 15,90 UI/g., estos valores coinciden con los predichos por los modelos cuadráticos, demostrando su validez.

### SUMMARY

La increasing concern for proper coffee waste management has sparked a renewed interest in utilizing it to produce value-added bioproducts. Several experts have proposed solutions, such as anaerobic co-digestion of coffee processing waste with animal excreta to expedite the decomposition of hazardous organic compounds. Additionally, solid-state fermentation (SSF) using fungi has been suggested to transform these compounds into valuable products like edible mushrooms, biofuels, and industrial enzymes.

The genus *Aspergillus sp.* has been identified as highly effective in SSF, breaking down lignocellulosic materials and producing cellulolytic enzymes, such as cellulase. This fungus thrives in low water activity conditions, on a wide array of substrates, and has the capacity to produce an extensive range of hydrolytic enzymes that break down cellulose, a key component in plant waste.

This study assessed this fungus's ability to degrade cellulose found in coffee pulp and produce enzymes with cellulolytic activity through SSF. Various parameters like temperature (25°C, 35°C, and 45°C) and pH (3, 4, and 5) were considered to maximize biomass and cellulase production. A condition maximizing spore production was found using response surface methodology in a 3-level factorial design within single tray bioreactors. After quadratic model analysis and optimization, the optimal condition resulted in higher growth of spores and enzymes at a temperature of 25°C and pH of 5, achieving a growth of 6.27 spores/g and 15.90 IU/g. These values align with those predicted by quadratic models, validating their accuracy.



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>15</b>
JUSTIFICACIÓN .....	17
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
Objetivo General.....	18
Objetivos específicos .....	18
HIPÓTESIS .....	19
ALTERNATIVA .....	19
NULA .....	19
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>20</b>
MARCO TEÓRICO .....	20
1.1    CAFÉ .....	20
1.1.1    Desechos de Café.....	20
1.2    BIOMASA.....	21
<b>1.3 FACTORES DE FERMENTACIÓN.....</b>	<b>22</b>
1.3.1 Influencia de la Temperatura en el Proceso FES.....	23
1.3.2 Influencia del pH en el Proceso FES .....	23
1.3.3    Fermentación Sólida .....	24
1.4    SELECCIÓN DEL MICROORGANISMO.....	25
1.5    SUPLEMENTOS.....	26
1.5.1 Microorganismos usados .....	26
1.6    ASPERGILLUS NIGER.....	27
1.6.1 Usos y aplicaciones.....	28
1.7    MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE BIOMASA .....	28
1.8    MEDICIÓN DE LA BIOMASA .....	29

1.9 ENZIMAS .....	29
1.9.1 Estabilidad Enzimática.....	30
1.9.2. Medición de la Estabilidad Enzimática.....	31
1.10 CELULASA .....	31
1.10.1 Usos y aplicaciones.....	32
<b>CAPITULO II .....</b>	<b>34</b>
<b>METODOLOGÍA .....</b>	<b>34</b>
2.1 CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO.....	34
2.2 MATERIALES, EQUIPOS E INSUMOS. ....	35
2.2.3 Software. ....	37
2.3.2 Establecer los parámetros de temperatura y pH en el proceso de fermentación en estado sólido.....	38
2.3.3 Evaluación de la Actividad Enzimática y formación de esporas del Producto.....	42
2.4 OPTIMIZACIÓN LOS PARÁMETROS DE TEMPERATURA Y PH .....	43
2.5 MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO .....	44
2.4.1 Diagrama de Flujo.....	44
2.6 DESCRIPCIÓN DEL PROCESO .....	47
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>53</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN. ....</b>	<b>53</b>
3.1. CARACTERIZAR LOS DESECHOS DE CAFÉ MEDIANTE ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS .....	53
3.2 ESTABLECER LOS PARÁMETROS DE TEMPERATURA Y PH EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO. ....	58
3.2.1 Actividad Enzimática.....	59
3.2.3 Formación de Esporas.....	61
3.3 OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES DEL PROCESO PARA MAXIMIZAR LA PRODUCTIVIDAD DE LAS ENZIMAS CELULÍTICAS.....	65
3.3.1 Optimización para la Productividad de la Actividad Enzimática .....	65

3.3.2 Optimización para la Productividad de Formación de Esporas de <i>Aspergillus</i> sp .....	68
<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>74</b>
4.1 CONCLUSIONES .....	74
4.2 RECOMENDACIONES .....	74
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>75</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>78</b>

**ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1</b> Parámetros para fermentación sólida .....	<b>24</b>
<b>Tabla 2</b> Ubicación y datos meteorológicos del lugar de experimentación .....	<b>34</b>
<b>Tabla 3</b> Variables cuantitativas del análisis físico químico.....	<b>37</b>
<b>Tabla 4.</b> Factores en estudio.....	<b>39</b>
<b>Tabla 5.</b> Combinación de factores en estudio. ....	<b>40</b>
<b>Tabla 6.</b> Factores en estudio.....	<b>40</b>
<b>Tabla 7.</b> Análisis para determinación de actividad enzimática .....	<b>42</b>
<b>Tabla 8.</b> Análisis fisicoquímicos de pulpa deshidratada.....	<b>54</b>
<b>Tabla 9.</b> Análisis de varianza para ae.....	<b>59</b>
<b>Tabla 10.</b> Análisis de varianza para Pe .....	<b>62</b>

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Sistema de cadena representación msr .....	<b>43</b>
<b>Figura 2.</b> Curva de calibración de azúcares reductores .....	<b>51</b>
<b>Figura 3.</b> Valores predichos vs reales de la formación de esporas .....	<b>59</b>
<b>Figura 4.</b> Interacción temperatura*ph vs actividad enzimática .....	<b>61</b>
<b>Figura 5.</b> Valores predichos vs reales de la formación de esporas .....	<b>62</b>
<b>Figura 6.</b> Interacción temperatura*ph vs formación de esporas .....	<b>64</b>
<b>Figura 7.</b> a) Superficie de respuesta estimada, b) Gráfico de contorno .....	<b>66</b>
<b>Figura 8.</b> Valores predichos vs observado de productividad ae. ....	<b>68</b>
<b>Figura 9.</b> Valores óptimos de productividad de esporas a) superficie de respuesta b) contorno..	<b>70</b>
<b>Figura 10.</b> Valores de normalidad de esporas. ....	<b>71</b>

## ÍNDICE DE ECUACIONES

<b>Ecuación (1).</b> Productividad de la actividad enzimática.....	<b>69</b>
<b>Ecuación (2).</b> Productividad de la formación de esporas.....	<b>72</b>

## Introducción

Los residuos del café como la corteza y pulpa, que se derivan de los procesos industriales, no son aprovechados por la mayoría de productores y procesadores. La pulpa del café es considerada generalmente como un desecho y los métodos comunes para deshacerse de este subproducto incluyen su descarga en los cursos de agua o su amontonamiento (INIAP, 2015).

(Tingo Proaño & Acosta, 2011) En el proceso de cultivo e industrialización del café solamente se aprovecha el 9.5% del peso del fruto fresco, por tanto, el 90.5% queda en forma de residuos (cascarillas, pulpa y mucílago) (Tingo Proaño & Acosta, 2011), provocando un gran impacto al ecosistema. Los desechos de esta industria podrían ser utilizados en la elaboración de subproductos de alto impacto para la agroindustria como productos concentrados para animales, pero solo se limita a ser empleado como abono en el mejor de los casos.

(*SECTOR CAFETERO ECUATORIANO*, n.d.) Según información del Servicio de Rentas Internas - SRI, las empresas dedicadas al cultivo de café a nivel nacional en el 2019, registraron un total de ventas locales de \$ 9,1 millones de dólares, del cual el 8.5% está concentrado en la provincia de Imbabura (Sánchez et al., 2020). Sin embargo, el cultivo de café en esta zona es en su mayoría realizado por familias que realizan la actividad agrícola de manera tradicional, lo cual provoca que el grano de café no sea aprovechado en su totalidad debido a la falta de conocimiento y maquinarias adecuadas, generando aún más desechos contaminantes y por ende una baja economía para estos pequeños caficultores.

Los desechos de la industria de café son una fuente importante de materia orgánica, por lo que es muy atractivo como sustrato para la producción de biomasa la cual se genera a través de un proceso

fermentativo con ayuda de microorganismos como *Aspergillus niger*. El aprovechamiento de estos residuos pretende minimizar el impacto ambiental que generan al ser desechados a las diferentes vertientes de agua o amontonados.



## Justificación

Los residuos de la industria del café pueden ser tratados e industrializados para la obtención de subproductos a partir de los mismos siendo esta una respuesta para reducir los índices de contaminación.

La presente investigación tiene como objetivo generar biomasa a partir de los desechos de la industria cafetera mediante la fermentación de estos con la ayuda de un hongo (*Aspergillus niger*) y de esta manera no solo dar uso a los residuos, sino también reducir la contaminación que este genera estableciendo un ciclo cerrado en la producción en donde el fruto es usado casi en su totalidad.

((PDF) *OBTENCIÓN DE BIOMASA A PARTIR DE CÁSCARA DE CAFÉ*, n.d.) La industria de café genera subproductos como la pulpa, mucilago y el pergamino o cascarilla, los cuales generalmente son desechados durante el procesamiento del mismo. La eliminación de estos desechos establece un problema ambiental, ya que la pulpa y mucilago (que se eliminan en mayor cantidad) representan casi el total de la contaminación del agua al ser desechados. De ahí que exista la preocupación por buscar nuevas alternativas para la utilización de residuos, como es el caso de obtención de biomasa. Este término conocido también como “proteína unicelular”, el cual se refiere al producto obtenido a partir de levaduras, algas y hongos que crecen debido a procesos fermentativos en los desechos orgánicos (Carrillo et al., 2011).

Esto dará como resultado la disminución en la tasa de contaminación por residuos producidos por la agroindustria. En Ecuador debido a su naturaleza agrícola, la biomasa residual constituye una fuente renovable de energía con alto potencial de aprovechamiento. Según datos estadísticos se producen 7.340 toneladas de residuos de café al año en el país de los cuales solo 13.46 MJ/kg son

usados razón por la cual es considerado un producto que se puede usar para la producción de biomasa y enzimas (Hidalgo et al., 2020).

El objetivo del presente estudio es determinar el efecto de tres diferentes condiciones de temperatura y de pH en el crecimiento y generación de biomasa y celulosa, su rendimiento, además de medir y plantear curvas que demuestren la actividad que tienen el extracto. Adicionalmente se optimizará los parámetros antes mencionados para encontrar el mejor tratamiento de estudio.

## Objetivos

### **Objetivo General**

Desarrollar un proceso de fermentación sólida para la obtención de biomasa y celulosa con *Aspergillus niger* a partir de residuos de café.

### **Objetivos específicos**

- Caracterizar la materia prima
- Establecer los parámetros de temperatura y pH en el proceso de fermentación en estado sólido.
- Optimizar los parámetros de temperatura y pH.

## **Hipótesis**

### **ALTERNATIVA**

La temperatura y el pH influyen en la cantidad de biomasa y celulasa de *Aspergillus niger* en un proceso de fermentación en estado sólido.

### **NULA**

La temperatura y el pH no influyen en la cantidad de biomasa y celulasa de *Aspergillus niger* en un proceso de fermentación en estado sólido.

# CAPÍTULO I

## MARCO TEÓRICO

### 1.1 Café

El café, una planta cultivada principalmente en regiones tropicales, se utiliza principalmente para extraer sus semillas y elaborar diversas bebidas. Actualmente, existen alrededor de 25 variedades de café cultivadas a nivel mundial. En Ecuador, el café ha sido un destacado producto en las exportaciones agrícolas, convirtiéndose en una poderosa fuente de empleo durante varias décadas, junto con el banano y el cacao. Estas actividades han dado origen a otras importantes ramas económicas, como el comercio local de productos agrícolas y el turismo en regiones cafetaleras. El café ecuatoriano, conocido por su calidad y variedad, ha ganado reconocimiento internacional, impulsando aún más su demanda en los mercados globales y contribuyendo significativamente al desarrollo económico del país (Asencio, 2019).

#### 1.1.1 Desechos de Café

En la agroindustria del café, tan solo el 9,5% del peso total del fruto se utiliza, dejando un 90,5% de subproductos tras el proceso de beneficio. Lamentablemente, estos subproductos suelen ser vertidos en los cuerpos de agua, lo que causa una significativa contaminación y reduce las posibilidades de vida en los ecosistemas afectados. En algunos casos, durante la época de recolección, estos subproductos se almacenan temporalmente en las instalaciones productivas, pero posteriormente se eliminan, contribuyendo a la contaminación del suelo. (Restrepo & Villa, 2020)

### *1.1.1.1 Usos y Aplicaciones*

La industria cafetalera en países productores enfrenta un desafío significativo: la gestión de subproductos y residuos, que representan una fuente considerable de contaminación y problemas ambientales. Desde mediados del siglo pasado, se ha impulsado la investigación y desarrollo de métodos innovadores para reutilizar estos residuos, transformándolos en valiosas materias primas. Estos subproductos, que anteriormente se descartaban, ahora se convierten en elementos esenciales para la elaboración de piensos, bebidas, vinagre, biogás, cafeína, pectina, enzimas pecticas, proteínas, biomasa y abono. (Serna, Torres, Martínez, & Hernández, 2018).

Esta reutilización creativa no solo ha logrado reducir la cantidad de desechos vertidos, sino que también ha generado oportunidades económicas y sostenibles. Al revalorizar estos subproductos, se ha minimizado el impacto ambiental negativo de la producción de café, promoviendo prácticas más responsables y alentando una economía circular dentro de la industria cafetalera. Esta transformación hacia la valorización de residuos ha marcado un paso fundamental en la sostenibilidad ambiental y la eficiencia económica en el sector del café. (Restrepo & Villa, 2020).

## **1.2 Biomasa**

La biomasa, entendida como material orgánico empleado para generar energía, abarca una diversidad de fuentes según la definición de (Revelo, 2017). Esta se refiere a la parte de productos, residuos y desechos de origen biológico que pueden descomponerse naturalmente, provenientes de actividades agrícolas, abarcando materiales derivados tanto de animales como de plantas. Además, la biomasa engloba aquellos provenientes de prácticas silvícolas, así como la porción biodegradable de residuos industriales y municipales.

Esta definición amplia y holística de biomasa implica que los recursos biomásicos se originan en una gama muy amplia y heterogénea de fuentes. Desde los desechos agrícolas como cáscaras de

frutas, pajas y restos de cultivos, hasta residuos forestales y de industrias de alimentos, y la fracción biodegradable de los residuos urbanos e industriales, todos estos contribuyen al potencial de la biomasa como una fuente energética renovable y sostenible.

La diversidad de estas fuentes refleja la versatilidad de la biomasa como un recurso energético que puede ser aprovechado para generar electricidad, calor o biocombustibles, Ayudando a disminuir la necesidad de utilizar energías no renovables y contrarrestando los efectos ambientales relacionados con la producción de energía.

### **1.3 Factores de fermentación**

La velocidad de fermentación del café está estrechamente ligada a múltiples factores interrelacionados. La calidad del sustrato, que engloba la madurez y la salud del fruto, ejerce una influencia crucial en la composición química y microbiológica de los granos despulpados, siendo determinante en el proceso de fermentación. Además, factores ambientales como la temperatura exterior y la higiene en las instalaciones, el entorno, los equipos utilizados y el tiempo empleado juegan un papel esencial en este proceso (Salazar, 2020.).

La calidad del sustrato se refiere a la condición del fruto de café: su madurez, salud y estado general. Los granos de café más maduros y sanos tienden a fermentar de manera más efectiva, lo que contribuye a una mejor calidad del producto final. La composición química y microbiológica de los granos despulpados se ve directamente influenciada por estas condiciones iniciales. Además, los factores ambientales juegan un rol determinante. La temperatura externa afecta significativamente la velocidad y la calidad de la fermentación. Un ambiente higiénico, tanto en las instalaciones como en los equipos utilizados, es crucial para evitar la contaminación y mantener condiciones óptimas para la fermentación. El tiempo empleado y el sistema de fermentación

empleado también influyen directamente en la velocidad y la calidad del proceso de fermentación del café.(Salazar, 2020).

En conjunto, todos estos factores interdependientes moldean la velocidad y la calidad de la fermentación del café, destacando la importancia de un control minucioso y cuidadoso de cada aspecto para obtener un producto final de alta calidad y consistencia.

### **1.3.1 Influencia de la Temperatura en el Proceso FES.**

La temperatura es un parámetro importante para el método FES ya que influye directamente en la velocidad de crecimiento de los microorganismos, por tanto, es de vital importancia definir un rango de temperatura ideal donde el crecimiento es óptimo, ya que fuera de este rango el crecimiento puede demorarse o incluso no ejecutarse, además, es ideal introducir un sistema de aireación ya que la transferencia de calor aumenta las condiciones térmicas que pueden afectar a las cepas y el desarrollo del proceso (Prieto & Torres, 2020).

### **1.3.2 Influencia del pH en el Proceso FES**

La presencia de factores ambientales y nutricionales influye en la generación de enzimas fuera de las células por parte de un microorganismo. Entre estos factores, el pH tiene un impacto significativo. Los hongos filamentosos pueden crecer en un rango amplio de pH, normalmente entre 3 y 7. No obstante, la producción de celulasas en estos hongos tiende a ser mayor en un rango más específico, típicamente entre pH 4 y 6. Se ha observado que los valores de pH de 4,5 y 5 promueven una mayor producción de esta enzima. A medida que el pH aumenta, la producción de proteínas fuera de las células también aumenta, lo cual afecta negativamente la actividad específica de las celulasas. Por otro lado, una reducción en este parámetro conlleva a la inhibición del crecimiento de los hongos (Gualberto et al., 2017).

### 1.3.3 Fermentación Sólida

La fermentación en estado sólido (FES) ha demostrado ser un método exitoso en la producción de biomasa, asociado con la fase estacionaria de crecimiento microbiano. Este proceso se ha implementado a escala industrial con el propósito de generar productos destinados a la agricultura y la alimentación animal. La singularidad de la FES radica en su capacidad para producir un producto más estable en comparación con otros métodos de fermentación, además de requerir menor consumo energético. La utilización de fermentadores más pequeños facilita el proceso de separación de los productos en la etapa de separación (downstream), lo que resulta en una mejora significativa de la eficiencia del proceso. Esta técnica, al aprovechar el estado sólido del sustrato, permite un control preciso de las condiciones de fermentación, generando así un producto final más homogéneo y de mayor calidad (Giraldo, 2020).

La fermentación en estado sólido (FES) se distingue por llevarse a cabo en un sustrato sólido con niveles de humedad reducidos, generalmente por debajo de un límite de aproximadamente el 12%. Este proceso se desarrolla en un entorno no aséptico y natural, tal como se señala en el estudio de (Fonseca, Fernández, & López, 2020).

#### 1.3.2.1 Parámetros

Los parámetros más importantes dentro de la fermentación en estado sólido se pueden detallar los presentes en la siguiente tabla:

**Tabla 1.**

*Parámetros para fermentación Sólida*

<b>Parámetro</b>	<b>Unidad</b>
------------------	---------------



---

<b>Temperatura</b>	20-45 °C
<b>pH</b>	3-4,5
<b>Humedad</b>	30%-80%

---

Fuente: (Gallardo, 2017)

Estos parámetros son esenciales para controlar y optimizar el proceso de fermentación en estado sólido, pero su importancia y valores específicos pueden variar según el sustrato y los microorganismos utilizados.

#### **1.4 Selección del microorganismo**

Los microorganismos tienen diferentes requisitos para crecer en un sustrato sólido. La capacidad de desarrollarse en un entorno no líquido depende de varios factores, incluida la actividad de agua, la capacidad de anclaje y la capacidad de penetración en matrices porosas. Además, la actividad del agua es fundamental, ya que determina cuánta agua está disponible para los microorganismos. Algunos microorganismos pueden desarrollarse en condiciones de baja actividad de agua, lo que les permite prosperar en sustratos sólidos con baja humedad (Noguera, Sánchez, Soto, Ojeada, & Rodríguez, 2020).

Los microhongos, como los mohos y algunas especies de levaduras, son especialmente adecuados para la fermentación en estado sólido. Su capacidad natural para crecer sobre materiales sólidos les otorga una ventaja en este tipo de fermentación. Además, su capacidad de penetrar y colonizar sustratos porosos les permite descomponer y utilizar una amplia variedad de sustratos, convirtiéndolos en una opción favorable para la fermentación en estado sólido. (Pastrana, 1996).

A pesar de que las bacterias y levaduras son utilizadas comúnmente en la industria alimentaria, los microhongos se destacan en la fermentación en estado sólido debido a su adaptabilidad para crecer en sustratos sólidos y su capacidad para producir enzimas y metabolitos deseables en este entorno.

### **1.5 Suplementos**

El interés en el uso de suplementos en procesos fermentativos ha experimentado un notable crecimiento entre los investigadores a nivel mundial en años recientes. Esto se debe al empleo de estos suplementos en procesos alternativos de fermentación, aprovechando desechos o subproductos de la agroindustria. Además, el bajo contenido de humedad en los sistemas de fermentación en estado sólido establece que solo ciertos grupos de microorganismos pueden desarrollarse en este entorno, principalmente hongos y levaduras. Estos microorganismos tienen la capacidad de crecer y prosperar con niveles reducidos de agua, lo que les otorga una ventaja en la fermentación en estado sólido (Parzanese, 2016).

La utilización de suplementos en estos procesos ofrece una oportunidad innovadora para transformar subproductos agrícolas en productos valiosos, contribuyendo así a la reducción de residuos y al desarrollo de prácticas más sostenibles en la industria. La habilidad de ciertos microorganismos, como hongos y levaduras, para prosperar en condiciones de baja disponibilidad de agua ha ampliado significativamente las posibilidades y la versatilidad de la fermentación en estado sólido, promoviendo así un enfoque más eficiente y sostenible en la producción de diversos productos fermentados. (Parzanese, 2016).

#### **1.5.1 Microorganismos usados**

En cada proceso fermentativo, la presencia de cultivos microbiológicos, ya sean bacterias, hongos o levaduras, es fundamental. En particular, en el proceso de fermentación en estado sólido (FSS),

la presencia de cultivos de hongos filamentosos resulta crucial debido a ciertas características específicas que les permiten adaptarse a un entorno con escasez de agua. Específicamente, se han utilizado diversas especies de *Aspergillus*, las cuales son ampliamente preferidas y empleadas en estos procesos (Parzanese, 2016).

La elección de *Aspergillus* se justifica por su notable capacidad para adaptarse a condiciones con bajos niveles de humedad. Estos hongos filamentosos poseen características únicas que los hacen ideales para el FSS: tienen la habilidad de crecer rápidamente y secretar una amplia variedad de enzimas. Además, su forma de crecimiento en forma de micelios o filamentos facilita la extracción de los productos resultantes del proceso.

El desarrollo de estas especies de *Aspergillus* en el FES no solo ofrece la producción de productos específicos, sino que también contribuye a la extracción eficiente de enzimas y metabolitos valiosos. Esta elección estratégica de cultivos microbiológicos es esencial para optimizar la eficacia y la calidad en los procesos de fermentación en estado sólido, permitiendo la producción de una amplia gama de productos fermentados con un alto valor comercial. (Greice Sandri & Moura da Silveira, 2018).

### **1.6 *Aspergillus niger***

El *Aspergillus niger* es, un hongo filamentosos que se caracteriza por su coloración negra. Este hongo suele encontrarse principalmente en frutas cítricas y vegetales, cuando alcanzan un estado avanzado de descomposición. El *Aspergillus niger* es conocido por su capacidad para prosperar en condiciones de pH bajo y altas concentraciones de azúcares, lo que a menudo se encuentra en frutas y vegetales maduros o en proceso de descomposición. (Sandri & da Silveira, 2018).

Este hongo al desarrollarse condiciones óptimas tanto de nutrientes como de condiciones ambientales son capaces de producir metabolitos que son empleados dentro de la industria,

principalmente la alimentaria, un ejemplo de esto son las enzimas celulíticas que se aplican en una variedad de campos y sectores debido a su capacidad para descomponer la celulosa, así también en la industria del café y cacao para acelerar el proceso fermentativo para la remoción del mucilago de la semilla dando a estos también sus características organolépticas deseadas (Sandri & da Silveira, 2018).

### **1.6.1 Usos y aplicaciones**

Los hongos, debido a su capacidad para producir una variedad de metabolitos según el medio en el que se cultivan, son utilizados a escala industrial para la extracción de enzimas, especialmente en la industria cafetera y cacaotera. Las enzimas producidas por estos hongos tienen un papel fundamental al acelerar el proceso fermentativo para eliminar el mucílago de la semilla de café o cacao. Entre las enzimas que estos hongos pueden producir se encuentran la proteasa, pectinasa, celulasa, entre otras. Estas enzimas son clave en el proceso de fermentación, ya que la proteasa descompone las proteínas, la pectinasa descompone la pectina y la celulasa descompone la celulosa, contribuyendo así a la degradación de los componentes del mucílago.

La extracción de estas enzimas se realiza principalmente en medios sólidos, lo que simula de manera efectiva el entorno de desarrollo natural de estos hongos. Esta metodología ofrece una forma sencilla y eficiente de producción de enzimas, facilitando su obtención para su aplicación en la industria cafetera, cacaotera y otras áreas relacionadas con la fermentación y la producción de alimentos. (Sandri & da Silveira, 2018).

### **1.7 Métodos de producción de biomasa**

La biomasa, como fuente de energía renovable, se deriva de diferentes fuentes, siendo los cultivos bioenergéticos, los residuos agrícolas y los residuos forestales sus principales componentes. Estas categorías abarcan desde cultivos específicamente destinados a la producción de energía, como

maíz o caña de azúcar, hasta subproductos agrícolas y forestales, como la paja, los desechos de madera y otros residuos orgánicos. Cuando se trata de la conversión de biomasa en energía, se emplean dos procesos fundamentales: el termoquímico y el bioquímico. El proceso termoquímico involucra la transformación de la biomasa a través de la combustión, pirolisis o gasificación, donde se aplica calor para descomponer la materia orgánica y producir energía en forma de calor, electricidad o biocombustibles gaseosos o líquidos.

Por otro lado, el proceso bioquímico se centra en la utilización de microorganismos para descomponer la biomasa mediante la fermentación. Este proceso es de particular interés en nuestro experimento, ya que la fermentación de materiales orgánicos puede generar biocombustibles como etanol o biogás, además de producir subproductos útiles como enzimas y otros compuestos bioquímicos (Quintero, 2015.).

### **1.8 Medición de la biomasa**

El análisis de estas mediciones proporcionar información valiosa sobre la eficacia del tratamiento seleccionado, su estabilidad durante el almacenamiento y su capacidad para mantener la actividad enzimática a lo largo del tiempo. Estos datos son fundamentales para comprender la viabilidad y la aplicabilidad práctica del tratamiento en cuestión, así como para evaluar su potencial en aplicaciones futuras en el ámbito de la biomasa y la producción de biocombustibles (Bello et al., 2006).

### **1.9 Enzimas**

Las enzimas desempeñan un papel esencial como catalizadores en los procesos celulares, interviniendo y acelerando reacciones químicas vitales para el funcionamiento de los organismos. Su función dentro de las células es de suma importancia. La eficacia de las enzimas como

catalizadores radica en su capacidad para aumentar drásticamente la velocidad de las reacciones químicas, superando en muchos casos a los catalizadores artificiales conocidos.

Una de las características más impresionantes de las enzimas es su alta especificidad. Cada enzima está diseñada para interactuar con una sustancia específica, denominada sustrato, y catalizar una reacción particular. Esta especificidad permite que las enzimas induzcan la transformación de un tipo particular de sustancia, mientras ignoran otras moléculas presentes en el entorno de la reacción. Esta capacidad de reconocimiento y unión selectiva con sus sustratos es fundamental para la precisión de las reacciones bioquímicas en los organismos vivos.

Gracias a esta combinación de alta eficiencia catalítica y selectividad, las enzimas juegan un papel crítico en los procesos biológicos, regulando y facilitando un amplio espectro de actividades metabólicas, desde la digestión de los alimentos hasta la replicación del ADN. Su especificidad y capacidad para acelerar reacciones químicas de manera selectiva son aspectos fundamentales que permiten la realización de las complejas funciones celulares con precisión y eficacia. (Ramírez, 2014).

### **1.9.1 Estabilidad Enzimática**

La estabilidad enzimática es esencial para evaluar la capacidad de una enzima para mantener su actividad biológica o su estructura conformacional frente a condiciones adversas, como el almacenamiento, aislamiento, purificación u otras manipulaciones físicas o químicas. Esto incluye la exposición a enzimas proteolíticas o a cambios de temperatura.

En el contexto del experimento, es crucial considerar este aspecto para comprender si la enzima en cuestión conserva sus propiedades funcionales a pesar del almacenamiento al que será sometida. El objetivo principal será evaluar la estabilidad de la enzima a lo largo del tiempo y bajo diferentes condiciones de almacenamiento. Esto permitirá determinar si la enzima conserva su actividad

catalítica deseada y si mantiene su estructura conformacional, lo que aseguraría su utilidad práctica y su viabilidad en aplicaciones futuras.

El análisis de la estabilidad enzimática proporcionará información valiosa sobre la longevidad funcional de la enzima, su capacidad para mantener sus propiedades activas y su resistencia a condiciones adversas. Esto permitirá tomar decisiones fundamentadas sobre la viabilidad y el potencial de uso de la enzima en aplicaciones industriales o en otros campos donde se requiera su actividad enzimática específica. (Ubalde et al., 2002).

### **1.9.2. Medición de la Estabilidad Enzimática**

La prueba DNS, una técnica refractométrica, es una opción para medir la cantidad de azúcares reductores presentes en el extracto. Esta prueba se emplea para cuantificar y representar gráficamente la actividad enzimática a lo largo del tiempo, mostrando las variaciones en la concentración de azúcares reductores como consecuencia de la actividad de las enzimas que se encuentran en el extracto.

Este enfoque proporciona una visión detallada de la actividad enzimática en el extracto y cómo esta puede ser afectada por el almacenamiento. Las curvas resultantes muestran la eficiencia de las enzimas a lo largo del tiempo y bajo condiciones de almacenamiento, proporcionando información valiosa sobre la estabilidad y la viabilidad de las enzimas para aplicaciones futuras en biotecnología, producción de biocombustibles u otros campos donde se requiera su actividad catalítica (Bello et al., 2006).

### **1.10 Celulasa**

La celulasa es una enzima clave que pertenece al grupo de las hidrolasas, con la habilidad para degradar la celulosa, un elemento que conforma la estructura de las paredes celulares de las plantas.

Su presencia es crucial para mejorar el valor nutricional de los alimentos y facilitar la digestión de la fibra presente en la dieta.

Ingerir enzimas celulasas puede ser beneficioso, ya que estas enzimas ayudan a descomponer las complejas estructuras de la celulosa, permitiendo así que el organismo pueda aprovechar una mayor cantidad de energía. La acción de la celulasa convierte la celulosa en unidades más simples de glucosa, que son más fáciles de absorber y utilizar como fuente de energía por el cuerpo humano.

Esta capacidad de las enzimas celulasas para romper las paredes celulares de las plantas y liberar la glucosa tiene un impacto significativo en la digestión de la fibra dietética, lo que contribuye a mejorar la eficiencia de la digestión y a obtener un mayor aporte energético a partir de los alimentos vegetales. Esto puede ser especialmente beneficioso para aquellos con una dieta rica en fibras, ya que les permite obtener una mayor cantidad de nutrientes y energía a partir de esos alimentos (Vazquez, 2011)

### **1.10.1 Usos y aplicaciones**

Las enzimas, especialmente las celulasas, tienen una gran variedad de usos en el sector alimentario y más allá. En la producción de zumos vegetales, estas enzimas son utilizadas para la extracción y clarificación, ayudando a liberar los nutrientes y mejorar la transparencia del jugo. En la industria del aceite de oliva, las celulasas son empleadas para incrementar el rendimiento del aceite, actuando sobre la pulpa del fruto y facilitando la extracción del aceite.

En la panadería, las enzimas son fundamentales para mejorar la calidad de los productos horneados, modificando la estructura del almidón y la fibra, lo que influye en la textura y la calidad del pan, pasteles y galletas. En la industria de la cerveza y el vino, estas enzimas juegan un papel



crucial en la fermentación, ayudando a descomponer los compuestos de la materia prima y mejorando la eficiencia del proceso (Medellín, 2020) .

Además de la industria alimentaria, las enzimas celulasas se utilizan en otros sectores como la alimentación animal para mejorar la digestibilidad de los alimentos, en la lavandería para la eliminación de manchas, en la industria textil para suavizar fibras y en la industria papelera para reducir la viscosidad y mejorar el blanqueo de la pulpa.

Estas aplicaciones diversas resaltan la versatilidad y la importancia de las enzimas celulasas en múltiples campos industriales, donde su capacidad para catalizar reacciones específicas es fundamental para mejorar procesos, aumentar la calidad de productos y reducir los costos de producción. (Medellín, 2020)

## CAPITULO II

### METODOLOGÍA

#### 2.1 Caracterización del Área de Estudio

El experimento se lo realizó en la ciudad de Ibarra, específicamente en los de la Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales (FICAYA) de la Universidad Técnica del Norte. La Tabla 2 proporciona una descripción detallada de los laboratorios y la ubicación exacta donde se llevaron a cabo los experimentos.

**Tabla 2.**

*Ubicación y datos meteorológicos del lugar de experimentación*

Provincia	Imbabura
Cantón	Ibarra
Altitud	2225 m.s.n.m
Humedad Relativa Promedio	62%
Temperatura media	17 °C
Pluviosidad	503-1000 mm. Año
Sitio 1	Campus Colegio Universitario Laboratorios de biotecnología ubicados en las unidades eduproductivas de la Universidad Técnica del Norte
Sitio 2	Campus “San Vicente de Paul” – Laboratorios de Análisis Físico-Químicos FICAYA

Fuente: (Weather Spark, 2020)

## **2.2 Materiales, Equipos e insumos.**

Para la realización del experimento se requirió de diversos materiales directos los cuales se detallan a continuación.

### **Insumos**

- Pulpa de café
- Agar tripticasa de soja (TSA)
- Sacarosa
- Extracto de levadura
- Agua destilada
- Pectina
- Hidróxido de Sodio (NaOH) 0.1N
- Ácido cítrico
- Ácido 3,5 dinitrosalicílico
- Tartrato de Sodio-Potasio

### **Materiales.**

- Tubos de Ensayo
- Balón aforado

- Soporte universal
- Papel filtro
- Membrana de filtración
- Kitasato
- Cajas Petri
- Frasco Boeco
- Tubos falcon
- Tubos Eppendorf
- Cubetas para espectrofotometría de 1.5 ml
- Probeta
- Matraz Erlenmeyer
- Vaso de precipitación
- Tamiz 0.2 mm
- Bolsas de polietileno
- Bolsas Ziploc.

### **Equipos.**

- Centrifuga refrigerada
- Biorreactor con regulación de temperatura y humedad
- Congelador
- Bomba de vacío
- Agitador magnético
- Estufa

- Espectrofotómetro
- Secador de bandejas
- Licuadora.

### 2.2.3 Software.

Para el análisis de los datos obtenidos en el experimento se utilizaron diversos programas estadísticos y de cálculo, entre los que se incluyen:

- Excel 2016
- Design-Expert 13 (versión libre)

## 2.3 Métodos.

Se realizaron análisis en la pulpa de café para medir su pH, humedad, contenido de materia seca y cenizas, siguiendo las normativas detalladas en la Tabla 3. También se llevó a cabo un proceso de secado para preservar la pulpa de café.

**Tabla 3.**

*Variables Cuantitativas del Análisis Físico Químico.*

Análisis	Método	Unidades	Referencia
Secado	Deshidratación	-	(Torres, Martínez, Serna, & Hernández, 2018)
pH	Potenciométrico	Adimensional	(NTE INEN 0381)
Cenizas	Cenizas totales	%	(NTE INEN 0401)
Humedad	Termobalanza	%	(NTE INEN 1 513)
Materia seca	Termobalanza	%	(NTE INEN 1 513)

---

### **2.3.2 Establecer los parámetros de temperatura y pH en el proceso de fermentación en estado sólido.**

La temperatura y el pH son factores clave en el método FES, dado que afectan directamente la velocidad de crecimiento de los microorganismos. Por ende, es crucial establecer los intervalos óptimos de estas variables, donde el crecimiento sea más favorable.

#### **Obtención y manejo de las cepas de *Aspergillus sp.***

Se emplearon cepas de *Aspergillus sp.* provenientes del laboratorio de Biotecnología Aplicada. El crecimiento de estas cepas siguió el procedimiento detallado por, Trejo Hernandez (1991). Se escogieron aquellas cepas que colonizaron completamente la placa, lo que posibilitó dar inicio a la experimentación en el laboratorio de microbiología de la Carrera de Agroindustrias del Campus San Vicente de Paúl.

El proceso de preparación del inóculo consistió en propagar el *Aspergillus sp.* en medio TSA, incubándolo entre 23 y 25 °C durante 5 días hasta que el peso de las placas  $\geq$  1 g. Posterior al aislamiento del hongo se procederá a realizar la siembra en el sustrato el cual previamente será mezclado con suplemento nutritivo a razón de 8 ml respecto a su masa total con el fin de proveer al hongo de la fuente necesaria de nutrientes para su desarrollo. La composición de la citada solución fue, expresado en g · dm<sup>-3</sup>: glucosa 50, sulfato de amonio 25, hidrógenofosfato de potasio 10, sulfato de magnesio heptahidratado 2.5, extracto de levadura 5 (Aguilar-Navarro et al., 2014), y se vertió sobre la placa para arrastrar las esporas e hifas del *Aspergillus sp.* al medio fijador. Seguido, se mezcló con la cantidad de agua destilada estéril necesario para ajustar a la humedad de 80% (inicio del proceso de fermentación) el y se inoculó en 75 g del sustrato seco, que consiste

en residuos de café deshidratado y estéril. El sustrato inoculado se colocó en charolas para facilitar el intercambio de gases y calor y garantizar el crecimiento del hongo en condiciones estáticas (Núñez Pérez Jimmy, 2020).

### **Variables de investigación.**

Se utilizó un diseño experimental  $3^2$ , en donde las variables evaluadas fueron la temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) y pH, cada uno con tres niveles diferentes. La utilización de un diseño  $3^2$  proporciona una estimación más precisa de los resultados de las variables y de sus interacciones, ya que se basa en múltiples repeticiones de cada combinación de niveles. Esto mejora la confiabilidad y robustez de los resultados obtenidos. Según (Fernández, 2020) el diseño experimental  $3^2$  es una estrategia poderosa y eficiente para estudiar múltiples factores y sus interacciones, lo que proporciona una comprensión más profunda del fenómeno investigado y facilita la toma de decisiones informadas en diversos campos de la ciencia y la ingeniería. Estos factores y sus respectivos niveles se presentan en la Tabla 4

**Tabla 4.**

*Factores en estudio.*

---

Temperatura	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>T^{\circ}1=25\text{ }^{\circ}\text{C}</math></li> <li>• <math>T^{\circ}2=35\text{ }^{\circ}\text{C}</math></li> <li>• <math>T^{\circ}3=45\text{ }^{\circ}\text{C}</math></li> </ul>
pH	<ul style="list-style-type: none"> <li>• pH1=3</li> <li>• pH2=4</li> <li>• pH3=5</li> </ul>

---

### Características de experimento.

Se llevó a cabo tres repeticiones de cada uno de los nueve tratamientos. Esto condujo a un conjunto de 27 unidades experimentales en total. Cada una de ellas contiene 75 g de sustrato esterilizado e inoculado con un 1% m/m de biomasa de hongo (*Aspergillus sp.*). Se realizó un análisis DCA (análisis de componentes principales) con un arreglo factorial AxB para evaluar los resultados. Las características específicas del experimento se presentan en la Tabla 5 y 6.

**Tabla 5.**

Combinación de factores en estudio.

<b>Tratamientos</b>	9
<b>Repeticiones</b>	3
<b>Unidades experimentales</b>	27

**Tabla 6.**

*Factores en estudio.*

<b>N° tratamientos</b>	<b>Factor A (Temperatura)</b>	<b>Factor B (Sustrato)</b>	<b>Combinación</b>
1	T1	pH1	T1 pH 1
2	T2	pH1	T2 pH 1
3	T3	pH1	T3 pH 1
4	T1	pH 2	T1 pH 2



5	T2	pH 2	T2 pH 2
6	T3	pH 2	T3 pH 2
7	T1	pH 3	T1 pH 3
8	T2	pH 3	T2 pH 3
9	T3	pH 3	T3 pH 3

### **Descripción de las variables del experimento.**

El experimento se centra en el análisis de diversas variables fundamentales que influyen en el resultado del estudio. Estas variables, cuidadosamente seleccionadas, desempeñan un papel crucial en el desarrollo y la comprensión de los fenómenos bajo investigación. A continuación, se detallarán las principales variables que han sido consideradas en este riguroso estudio y su relevancia en el contexto del experimento.

**Temperatura y pH:** La medición de la temperatura se realizó utilizando un sensor DHT11, el cual fue programado a un Arduino nano. La lectura obtenida del sensor fue proyectada en una pantalla LED que también estaba conectada al dispositivo. Se debe tener en cuenta que el margen de error para la temperatura era de  $\pm 1^\circ\text{C}$ , en cuanto al pH se reguló al inicio del experimento con buffers de pH 3, 4 y 5 respectivamente.

**Inóculo:** Para la inoculación, se utilizó un 1% m/m de biomasa del hongo *Aspergillus sp.* El cálculo de la cantidad de biomasa se llevó a cabo mediante la medición de la diferencia de peso, tomando el peso de la placa antes de la inoculación y restando el peso final una vez que el hongo la colonizó por completo.

**Biomasa:** Se emplea la cámara de Neubauer y la de Fuchs-Rosenthal para determinar la cantidad de esporas presentes por mililitro de muestra diluida. Las fórmulas utilizadas para calcular la concentración de esporas finales se encuentran detalladas en el Anexo 1. (Yépez, 2019)

**Actividad enzimática:** La actividad enzimática se expresa en Unidades Internacionales (UI), Y se establece mediante un factor de conversión que transforma los azúcares reductores en unidades de actividad enzimática. En este caso, 1 mg de glucosa liberada equivale a 0,185 UI/ml. (Jaen, Álvarez, Angulo, & Moreno, 1986).

### 2.3.3 Evaluación de la Actividad Enzimática y formación de esporas del Producto

Se llevo a cabo curvas de actividad enzimática y formación de esporas con el propósito de identificar los tratamientos más efectivos. Para ello, se utilizará un Análisis de la Varianza (ADEVA). Si se detectan diferencias significativas entre los tratamientos, se realizó la prueba Tukey al 5%. Esta prueba permitió realizar comparaciones entre las medias de los distintos tratamientos en el experimento, lo que resulta esencial para evaluar las hipótesis planteadas. De esta manera, se podrá determinar cuáles tratamientos muestran un impacto significativo tanto en la actividad enzimática como en la formación de esporas y cuáles podrían ser considerados como los más prometedores

**Tabla 7.**

*Análisis para determinación de actividad enzimática*

<b>Análisis</b>	<b>Método</b>	<b>Unidades</b>	<b>Referencia</b>
Determinación de azúcares reductores	DNS (ácido 3,5 dinitro salicílico)	g/l	(Bello et al., 2006)

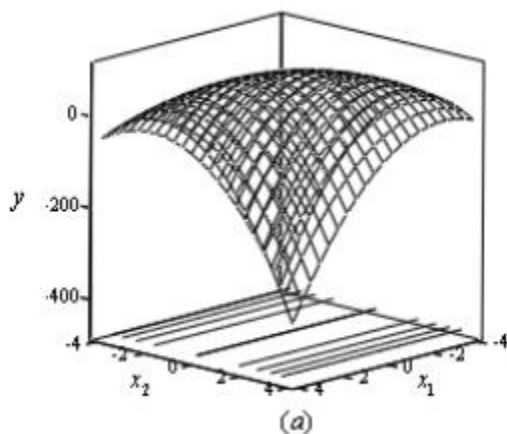
Esta prueba se la realizó con la finalidad de determinar la cantidad de azúcares reductores producidos por la enzima permitiendo de esta manera elegir el mejor tratamiento.

## 2.4 Optimización los Parámetros de Temperatura y pH

La naturaleza secuencial de la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR), inicia cuando existe una característica de interés a ser medida y continúa con la generación de ideas para determinar el conjunto de factores o variables controlables significativas que determinan su comportamiento (Nóchez, J. & Ventura, A., 2009). El documento establece que el objetivo inicial de estas técnicas es crear un experimento que genere valores coherentes para la variable medida, seguido por la identificación del modelo matemático más adecuado para los datos obtenidos. El propósito último es definir los valores de los factores que maximicen el valor de la variable medida.

*Sistema de Cadena representación MSR*

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 \dots$$



**Fuente:** (Nóchez & Ventura, 2009)

Se implementó el programa Design Expert 13.0 para evaluar los diseños experimentales, una breve definición la presenta Anderson (2018) Design Expert 13 está diseñado para quienes no son

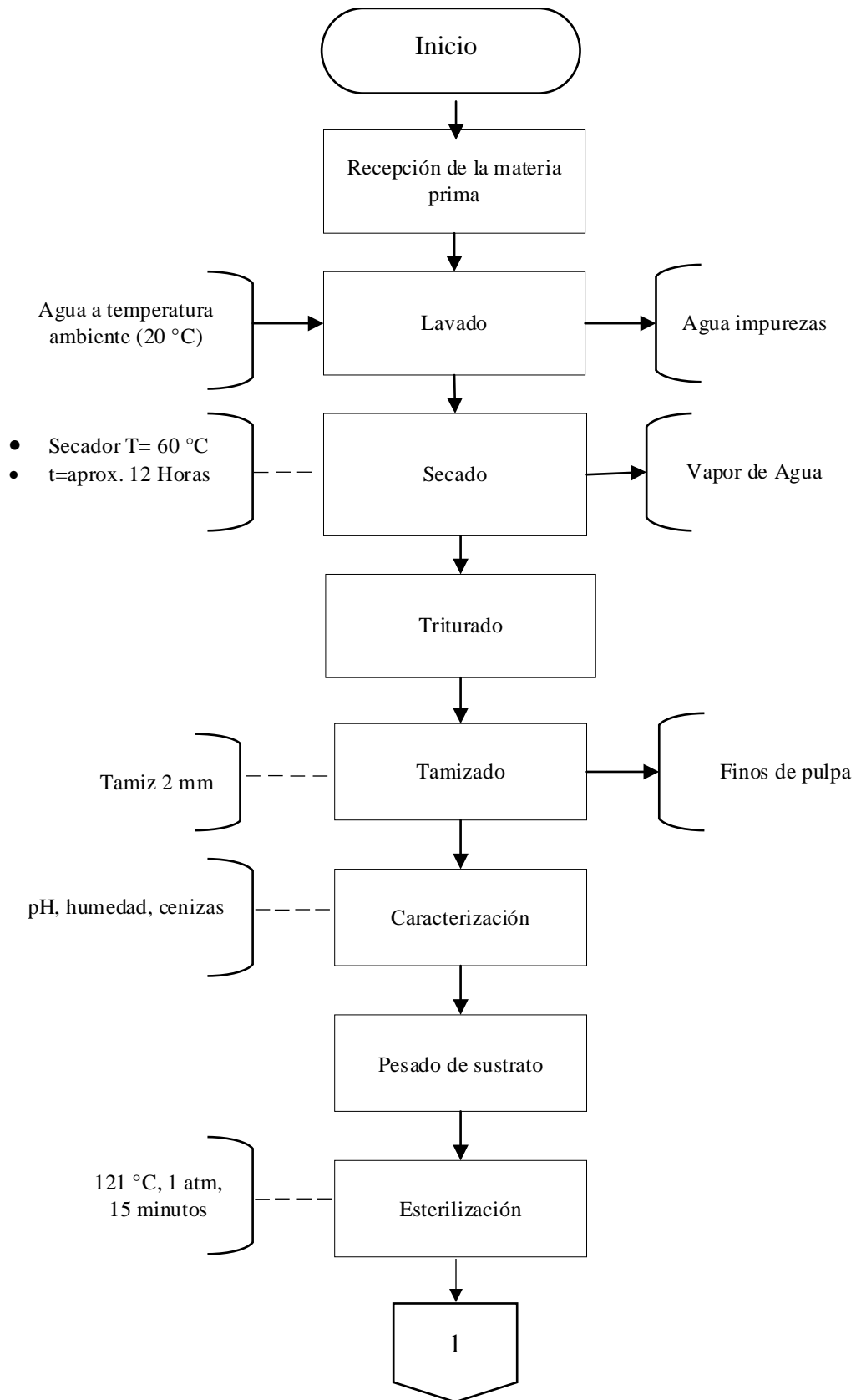
estadísticos y necesitan ejecutar el diseño de experimentos solo ocasionalmente. La interfaz intuitiva facilita la construcción y análisis de diseños, siendo aún el único paquete de software de diseño experimental que identifica con máxima eficacia las relaciones causa-efecto.

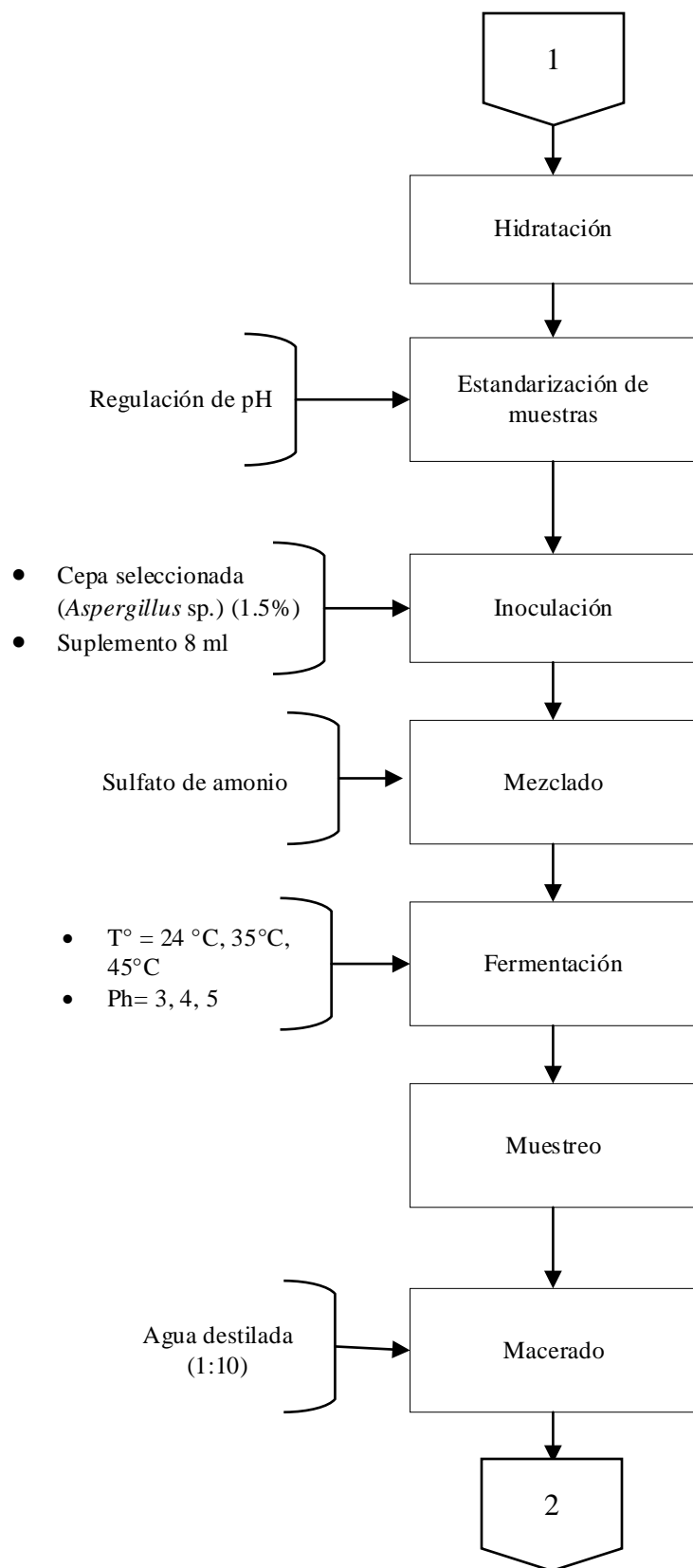
Se aplicó la metodología de superficie de respuesta utilizando un diseño central compuesto en el programa Design Expert 13.0 para optimizar los parámetros de temperatura y pH. Estos son fundamentales para alcanzar los mejores resultados en la productividad volumétrica de biomasa y enzimas en el bioproceso. El proceso incluyó múltiples experimentos y se verificará la validez del modelo con tres repeticiones, empleando los parámetros óptimos sugeridos por el programa. Esto permitirá identificar las condiciones ideales que maximicen la productividad.

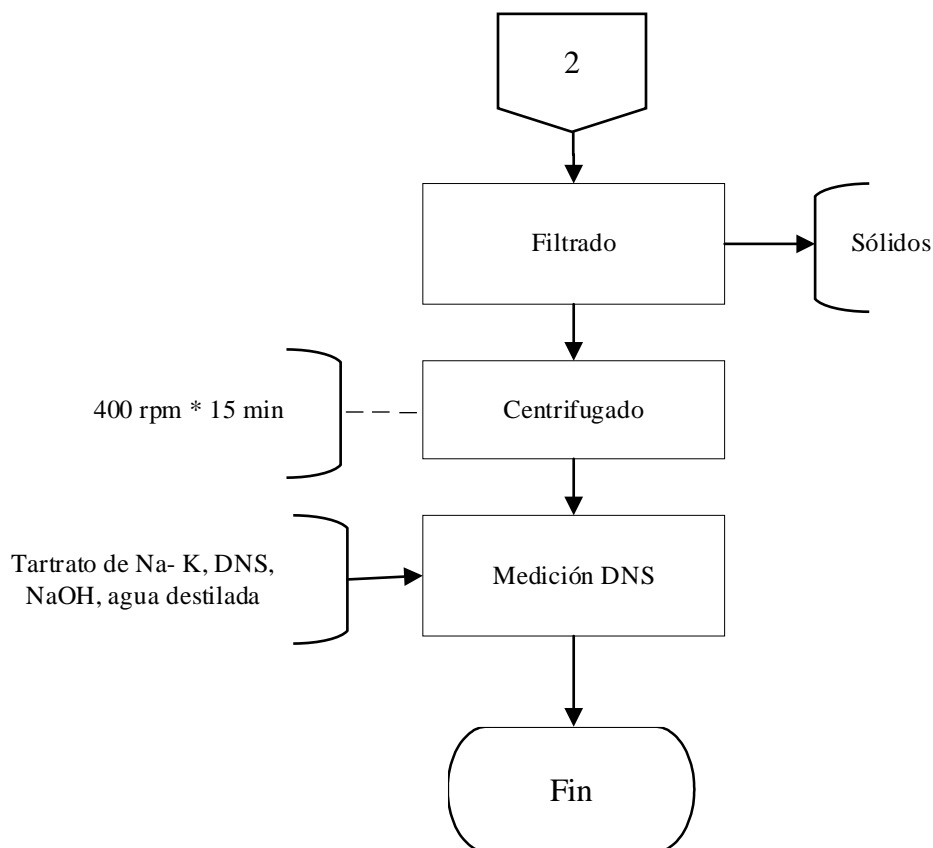
## **2.5 Manejo Específico del Experimento**

El manejo preciso y meticuloso del experimento es esencial para asegurar que los resultados obtenidos sean válidos y fiables. En este sentido, se han establecido procedimientos rigurosos y detallados para llevar a cabo cada etapa del experimento de manera sistemática y controlada.

### **2.4.1 Diagrama de Flujo**







## 2.6 Descripción del Proceso

A continuación, se describirá en detalle el manejo específico del experimento, abordando desde la preparación de las muestras hasta el análisis de los datos, con el objetivo de garantizar la precisión y la reproducibilidad de los hallazgos obtenidos, los cuales también se muestran en el Anexo 2

### **Selección y toma de muestras.**

El sustrato utilizado en este experimento fue recolectado en el barrio Santa Rosa de Nanegal, ubicado en Pichincha. Se aseguró de que la materia prima no presentara señales de descomposición o fermentación antes de ser recolectada y transportada en bolsas de polietileno selladas.

### **Lavado y selección.**

El lavado fue llevado a cabo con el objetivo de eliminar cualquier sustancia que pudiera interferir con los resultados del experimento. Para ello, se utilizó agua a temperatura ambiente y se llevó a cabo un lavado continuo durante 2 a 3 minutos.

### **Secado.**

El propósito de realizar el proceso de secado fue para obtener una medida inicial de la humedad de la materia prima y para su posterior conservación. Para llevar a cabo el secado, se utilizó un secador de bandejas el cual estuvo programado para llegar hasta una temperatura de 60 °C durante un período de 12 horas, lo que permitió facilitar la tritución del material.

### **Triturado.**

Para permitir que el hongo colonizara rápidamente el sustrato durante su desarrollo, se llevó a cabo un proceso de tritución que tuvo como objetivo reducir y homogeneizar el tamaño de las partículas. Como resultado, se obtuvieron partículas de alrededor de 2 mm, lo que permitió al hongo fijarse al sustrato de manera eficiente y colonizarlo completamente.

### **Caracterización.**

Se llevaron a cabo pruebas fisicoquímicas (pH, humedad, azúcares reductores y cenizas) con el objetivo de determinar si se necesitaba estandarizar la materia prima, en particular la humedad y el pH, utilizando los métodos descritos en la Tabla 3.

### **Envasado.**

El sustrato se colocó en bolsas transparente de polietileno de 250 g cada una, se sellaron y se almacenaron a temperatura ambiente.



**Esterilización.**

El sustrato fue esterilizado en la autoclave a 121 °C y 1.2 atmósfera de presión durante un período de 15 minutos.

**Pesado del sustrato.**

Para evitar exceder el límite recomendado de un centímetro de altura del sustrato, se utilizó una masa de 75 g de sustrato por cada repetición en la bandeja, siguiendo las sugerencias de Villalpando (2010).

**Hidratación de muestras.**

La hidratación del sustrato se llevó a cabo midiendo la diferencia de peso y considerando la humedad inicial del mismo. Esto aseguró que todos los tratamientos comenzaran con la humedad adecuada. Una vez dentro del biorreactor, se mantuvo constante la humedad inyectando aire húmedo según fuera necesario.

**Inoculación.**

Se agregó al sustrato una cantidad de biomasa equivalente al 1% de su masa total, de acuerdo con la recomendación de Villalpando (2010). Después de la inoculación, se distribuyó el sustrato en las bandejas correspondientes a cada ambiente para iniciar el proceso de fermentación.

**Regulación del pH**

El pH se reguló con ayuda de una solución buffer de sulfatos, preparado con fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) y fosfato monosódico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) utilizando la ecuación de Henderson-Hasselbalch, (2) y ajustando con hidróxido de sodio y ácido clorhídrico al 10% de acuerdo con el pH requerido en cada tratamiento de acuerdo con la tabla 4.

**Mezclado.**

Se llevó a cabo la mezcla de la muestra para lograr una distribución uniforme al inicio del proceso de fermentación.

**Fermentación.**

Durante el proceso fermentativo, se controlaron los factores, temperatura (25 °C, 35 °C y 45 °C) y pH (3, 4, y 5). Se recolectaron muestras de cada tratamiento cada 72 horas, analizando la actividad enzimática y la producción de esporas. Para determinar el momento de finalización de la fermentación, se aguardó hasta que alcanzara la fase estacionaria, identificada por el recuento de esporas, y se consideró concluida cuando los valores se mantuvieron estables o disminuyeron durante tres muestras consecutivas. Se seleccionó el tiempo más corto de los tres para señalar la escasez de nutrientes o cambios en la composición del medio, características de esta etapa. El biorreactor utilizado permitió controlar los distintos entornos propuestos para el experimento, por lo que se procedió a estabilizar el equipo antes de incubar las unidades experimentales.

**Filtrado.**

El objetivo de este proceso fue separar los sólidos de mayor tamaño, como el sustrato y la biomasa, del líquido sobrenadante. Para lograrlo, se utilizó un sistema de filtrado al vacío y luego se procedió con el proceso de centrifugación.

**Centrifugación**

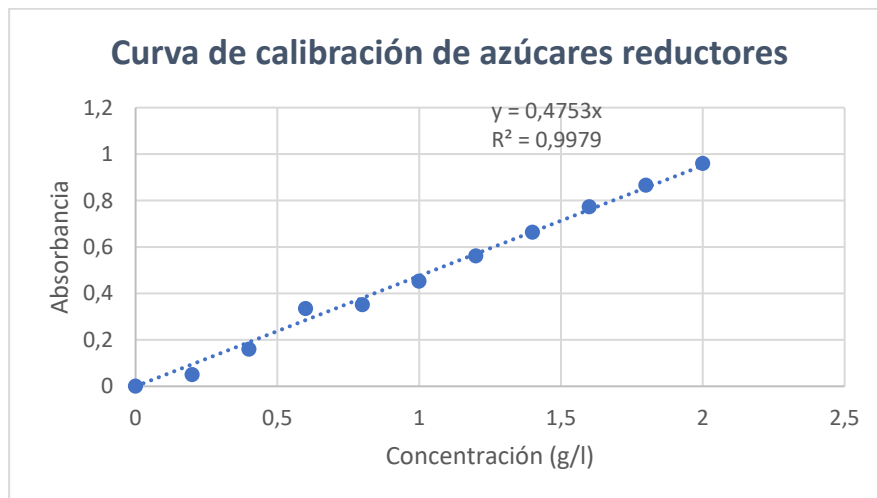
Se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 20 °C, lo que provocó la lisis celular de las esporas que pudieran haber quedado en el extracto después del filtrado, obteniendo así un extracto limpio y libre de impurezas.

## Medición DNS.

El método utilizado para medir la cantidad de azúcares reductores presentes en la muestra es un método colorimétrico que involucra la reacción de estos azúcares con el ácido 3,5 dinitrosalicílico. Esta técnica fue utilizada tanto en el análisis inicial de las muestras, así como en todas las unidades experimentales, para ello se realizó una curva de calibración con la cual determinamos la cantidad de azúcares presentes en cada etapa del estudio. Para llevar a cabo la medición, se realizó una curva de calibración de glucosa, que permitió estimar los valores de las muestras utilizadas, y se muestra en la figura 1.

**Figura 1.**

*Curva de calibración de azúcares reductores*



El método de Miller (1959) que se menciona aquí se refiere al método de determinación de azúcares reductores mediante el reactivo DNS (ácido 3.5-dinitrosalicílico), el cual se utiliza comúnmente para cuantificar la cantidad de azúcares presentes en una muestra. La curva de

calibración se realiza a partir de diferentes concentraciones conocidas de una solución estándar de glucosa y se utiliza para estimar la cantidad de azúcares presentes en las muestras.

## CAPÍTULO III.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

#### 3.1. Caracterizar los Desechos de Café Mediante Análisis Físicoquímicos

El análisis físicoquímico de la materia prima, en este caso, la pulpa de café fue realizada para determinar su composición y crear un punto inicial en el proceso de fermentación utilizando el hongo. (*Aspergillus sp*). Esta caracterización se llevó a cabo después de someter el material a un proceso de conservación mediante secado, seguido de un envasado adecuado.

El objetivo de esta caracterización físicoquímica era obtener información precisa sobre los componentes presentes en la pulpa de café, tales como su contenido de humedad, azúcares reductores, cenizas y otros parámetros relevantes para el proceso de fermentación. Al conocer la composición inicial de la materia prima, se puede establecer una base para el desarrollo del proceso de fermentación con el hongo, asegurando así un entorno adecuado y controlado para su crecimiento y actividad metabólica.

Se realizó el proceso en tres ocasiones, obteniendo muestras de la pulpa de café de un único proveedor de forma aleatoria. La selección aleatoria garantiza que las muestras sean representativas y evita cualquier sesgo en la selección del material además de asegurar así la uniformidad del material utilizado. Al realizar el proceso por triplicado, se busca obtener resultados más confiables y precisos, reducir la posibilidad de errores aleatorios y aumentar la confiabilidad de los datos obtenidos

### 3.1.1. Análisis Físicoquímicos.

En la tabla 8 se muestran los análisis proximales realizados a las muestras, permitiendo establecer el punto de partida del experimento. Esto demostró que las muestras son adecuadas para continuar con el proceso de obtención de enzimas, aspecto que se abordará posteriormente.

**Tabla 8.**

Análisis físicoquímicos de pulpa deshidratada.

	Unidades	*Valor
<b>pH</b>	Adimensional	5.46 ± 0.14
<b>Humedad</b>	%	6.47 ± 1.34
<b>Materia seca</b>	%	90.15 ± 1.34
<b>Cenizas</b>	%	9.96 ± 0.23
<b>Azúcares reductores</b>	%	0.30 ± 0.02

Promedio ± desviación estándar

### pH.

Se obtuvo un pH de  $5,46 \pm 0,14$  el cual cae dentro del rango de acidez, y se encuentra en concordancia con los valores mencionados en el estudio de Lizarraga, 2020, quien menciona que es allí donde puede desarrollarse el hongo y la producción de enzimas. Además, según (Gallardo, 2017) el pH óptimo para el crecimiento de *Aspergillus sp.* esta en el rango de 3 y 5. Por otro lado de acuerdo con los informes de (Fierro Cabrales et al., 2018), se confirma que el pH de la pulpa de café es de 4.21, esto se debe principalmente a la presencia de ácido gálico y acético. Otros estudios realizados por Revelo, (2017), señalan que un sustrato con pH superior a 5,0 conlleva una

reducción en la producción de celulasa. Sin embargo, según (Vilches, 2002), se ha demostrado que las enzimas celulolíticas presentan un crecimiento activo en un amplio rango de pH, abarcando desde 4 hasta 7. Esto sugiere que estas enzimas pueden mantener su actividad en condiciones ligeramente ácidas a neutras, lo que las hace potencialmente útiles en diversos contextos industriales y biotecnológicos.

Después de analizar minuciosamente estos datos, se llegó a la conclusión de que el sustrato era adecuado para el experimento. A continuación, se llevó a cabo la regulación del pH a los rangos de interés mediante la adición de un buffer de sulfato, logrando así alcanzar el pH necesario para dar inicio al experimento de manera óptima.

### **Humedad.**

Luego del proceso de secado se obtuvo una humedad de  $6,47 \pm 1,34\%$ . Este procedimiento se llevó a cabo con el propósito de preservar el sustrato hasta el momento de la fermentación, tal como se menciona en el trabajo de (Ortiz et al., 2019) quienes sugieren mantener niveles de humedad en la pulpa de café entre 5% y 8%. Por otro lado, (Torres, Martínez, Serna, & Hernández 2019), recomiendan mantener la humedad de la pulpa de café por debajo del 14%.

Este proceso de secado es necesario dado que la pulpa presenta un elevado contenido de humedad, superior al 80%, y una actividad de agua por encima de 0.6, se vuelve susceptible a la acción de microorganismos y a reacciones bioquímicas que pueden ocasionar su deterioro.

### **Materia seca.**

Después del proceso de deshidratación, se obtuvo un contenido de materia seca del  $90,15 \pm 1,34\%$ . Este resultado fue fundamental para determinar las diversas concentraciones de los agentes

fijadores a utilizar durante la inoculación, ya que estos se midieron en relación con la base seca del sustrato. Este enfoque se basa en una técnica empleada por (Villalpando et al., 2010) para enriquecer el sustrato.

Según los informes de Granda (2016), el contenido de materia seca disminuye a medida que avanza el proceso de fermentación. Granda también utiliza una pulpa de café con un 85,33% de materia seca en sus estudios, lo que sugiere que la pulpa de café utilizada en este experimento podría prolongar el proceso de fermentación.

### **Azúcares reductores.**

Se detectó una cantidad aproximada de  $0,30 \pm 0,02$  mg/ml de azúcares reductores en el sustrato. Según los reportes de Fierro, Contreras, Gonzales, Rosas, & Morales, (2018), la cantidad de azúcares reductores en la pulpa de café es de alrededor de 0,45 mg/ml. Estos azúcares reductores son inherentes a la fruta y su cantidad está ligada a las prácticas de cultivo.

Este valor obtenido en el sustrato es crucial, ya que actúa como un punto de referencia para evitar malinterpretaciones en los resultados posteriores al proceso de fermentación. Es decir, permite distinguir los azúcares reductores presentes naturalmente en el sustrato de aquellos que puedan ser producidos por la acción enzimática durante el proceso de fermentación. Al tener este punto de partida, se evita la confusión entre ambas fuentes de azúcares reductores en el análisis de los resultados.

Según los informes de (Velásquez et al., 2010), cuando hay una mayor cantidad de azúcares reductores en el sustrato, se incrementa la disponibilidad de fuente de carbono, lo que lleva a una



mayor producción de metabolitos por parte del *Aspergillus sp.* En su estudio, trabajaron con 3 niveles de azúcares reductores, y el tratamiento que mostró los mejores resultados fue aquel con una concentración mayor a 0.15 mg/ml en cuanto al crecimiento del hongo, por lo que la materia prima del trabajo puede generar resultados beneficiosos para el cumplimiento del objetivo de investigación.

### **Ceniza.**

Molina, Lechuga, & Bressani (2016), llevaron a cabo un estudio con pulpa de café sometido a fermentación sólida utilizando *Aspergillus niger*; en el cual obtuvo un contenido de cenizas del 5.97%, el cual es más bajo en comparación con el valor obtenido en este experimento ( $9.96\% \pm 0.23$ ).

Por otra parte, en un estudio realizado por Granda (2016), se encontró que el contenido de cenizas del sustrato fue del 10,5%, y se afirmó que mantener este nivel favorece el proceso fermentativo. En consecuencia, los niveles de cenizas obtenidos en el presente experimento son considerados aceptables para su uso posterior. Aunque son más altos que los informados por Molina, Lechuga y Bressani, se encuentran dentro del rango propuesto por Granda para favorecer el proceso de fermentación. Estos resultados respaldan la idoneidad del sustrato en el contexto de nuestro estudio y refuerzan la importancia de considerar diferentes perspectivas y parámetros en la optimización del proceso de fermentación. En conclusión, los niveles de cenizas obtenidos en este estudio son adecuados y podrían proporcionar un ambiente favorable para el proceso fermentativo con *Aspergillus sp.*, tal como lo sugiere el trabajo de Granda (2016).

Por otro lado, es importante considerar los estudios realizados con anterioridad por Tlachi, et. al. (2007), quienes indican que los niveles ideales de cenizas para un exitoso proceso de Fermentación

en Estado Sólido (FES) deben mantenerse en un intervalo de 7% a 8%. Si los valores son menores a este rango, pueden provocar deficiencias y un escaso desarrollo del microorganismo que participa en el proceso de fermentación. Sin embargo, los reportes de Caridad & Ramos (2007) afirman que valores de cenizas por encima del 18% generan toxicidad en el sustrato, lo cual prácticamente imposibilita el desarrollo de microorganismos.

Con base en los resultados previamente expuestos, se puede concluir que el sustrato es apropiado para iniciar el proceso fermentativo, dado que los niveles de los diversos análisis fisicoquímicos se encuentran dentro del rango aceptable para dicho proceso. Esta observación nos permitirá explorar con mayor precisión los rangos óptimos de temperatura y pH, cruciales para el crecimiento óptimo de las enzimas celulolíticas. Estos hallazgos revisten una gran relevancia, ya que contribuyen de manera significativa al entendimiento y la optimización del desarrollo de dichas enzimas, lo que resulta de vital importancia para su potencial aplicación en diversas áreas de la biotecnología y la producción industrial

### **3.2 Establecer los Parámetros de Temperatura y pH en el Proceso de Fermentación en Estado Sólido.**

El experimento consistió en evaluar diferentes niveles de temperatura y pH para determinar el tratamiento óptimo que maximizara la actividad enzimática, la cantidad de esporas y productividad total. Se obtuvieron valores para cada variable se tomaron los valores del día en el cual hubo mayor producción de actividad enzimática y formación de esporas para posterior realizar análisis adicionales como la determinación de la normalidad de los datos, análisis de varianza y evaluación de posibles interacciones entre las variables.

### 3.2.1 Actividad Enzimática

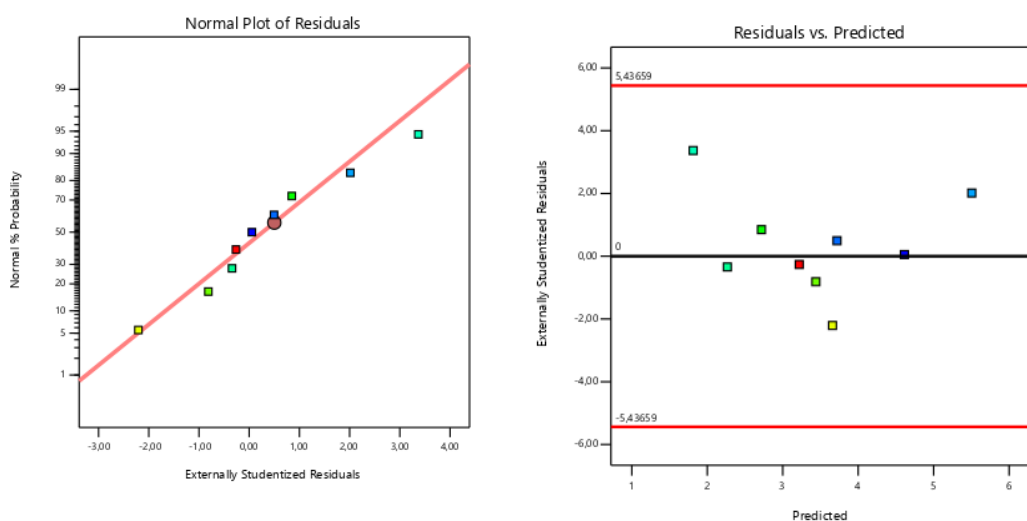
La actividad enzimática del extracto se calculó transformando los azúcares reductores presentes en la muestra mediante un factor de conversión.

#### Análisis de Varianza

El análisis de normalidad de los datos de la cantidad de enzima (UI/g)/día indicó que el 94% de confianza proviene de una distribución normal, como se ilustra en la figura 2.

**Figura 2.**

*Valores predichos vs reales de la formación de esporas*



Los resultados del análisis de varianza revelan que tanto la temperatura como el pH ejercen un efecto estadísticamente significativo, ya que ambos valores de p son inferiores a 0.05.

**Tabla 9.**

*Análisis de varianza para AE*

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value
--------	----------------	----	-------------	---------	---------

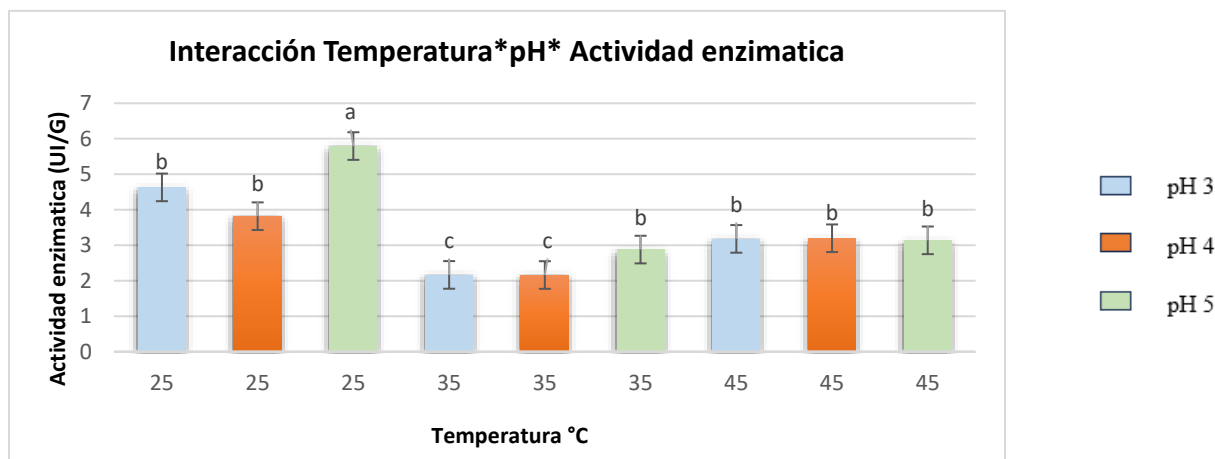
Model	1037,98	3	345,99	32,13	0,0011	significant
<b>A-Temperatura</b>	828,78	1	828,78	76,97	0,0003	
<b>B-pH</b>	28,73	1	28,73	2,67	0,1633	
<b>AB</b>	180,47	1	180,47	16,76	0,0094	
<b>Residual</b>	53,84	5	10,77			
<b>Cor Total</b>	1091,82	8				

**Nota:** Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Esto sugiere que la interacción entre la temperatura y el pH, con un valor de  $p=0.009$ , tiene una relevancia significativa en el proceso de fermentación en lo que respecta a la producción de enzimas. Los valores de  $R^2 = 0.95$  y  $R^2$  ajustado = 0.92 indican que la combinación de ambos factores puede ser reproducida, obteniendo valores casi idénticos en un 92%.

### **Interacción entre pH y temperatura para actividad enzimática.**

La Figura 3 representa la influencia de los factores vinculados y las disparidades entre las medias de cada tratamiento, determinadas a través de la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 5%.

**Figura 3.***Interacción Temperatura\*pH vs Actividad Enzimática*

El estudio evidencia que bajo condiciones de temperatura de 25 °C y un pH de 5, correspondientes al tratamiento T3, se obtiene el mayor valor de actividad enzimática con 15,90 UI/g. Esta cifra difiere significativamente de los valores obtenidos en los demás tratamientos, con un nivel de confianza del 95%. Comparando con estudios de (Revelo 2017) que realizó la extracción de este tipo de enzimas mediante fermentación semisólida, en donde a pH 4.5 y 5, obtuvieron valores de 25,11 UI/g. También Lizárraga (2020), en un proceso FES, a temperatura de 28 °C y pH de 5.5, alcanzó 8,14 UI/g. Valores que se encuentran en un rango similar al que se obtuvo en este estudio a temperatura de 25 °C Y pH de 5.

### 3.2.3 Formación de Esporas

La variable descrita se refiere al crecimiento del microorganismo durante el proceso FES, y sus valores se han transformado a logaritmo (número de esporas) para su análisis estadístico. Esta transformación es comúnmente utilizada para normalizar los datos y hacerlos más apropiados para su análisis mediante técnicas estadísticas. Por lo tanto, la variable log (número de esporas)

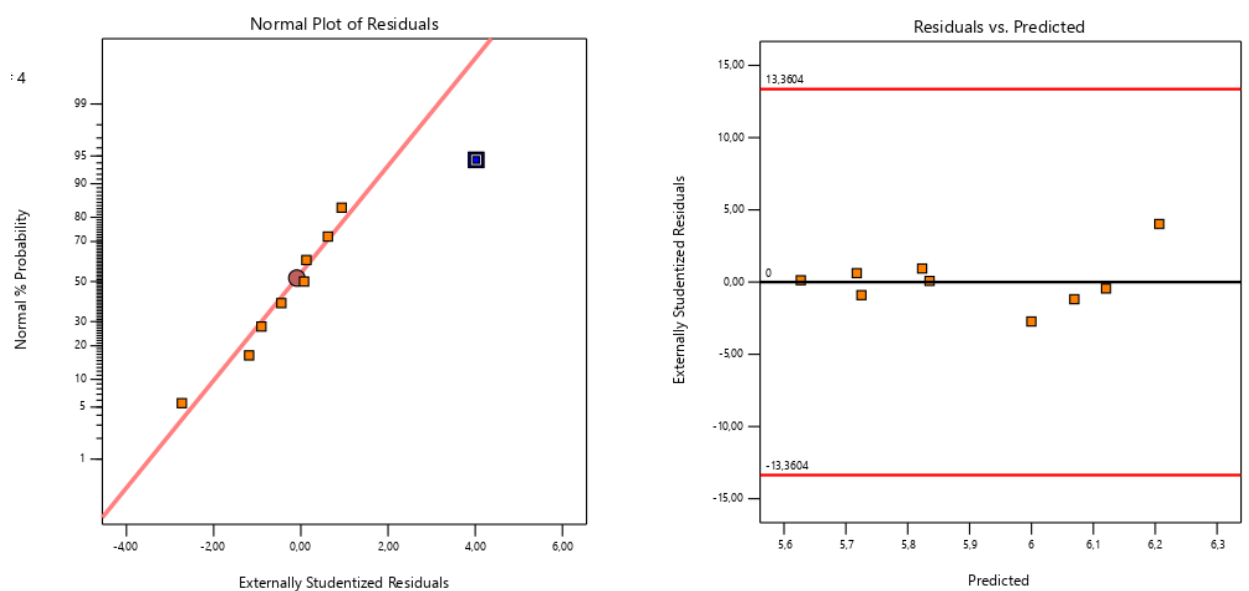
proporciona una medida de la cantidad de microorganismos presentes en cada fase de crecimiento, lo que es crucial para comprender el proceso FES.

### **Análisis de varianza.**

El análisis de normalidad de los datos de log (número de esporas) evidenció que provienen de una distribución normal con un nivel de confianza del 94%, tal como se ilustra en la figura 4.

**Figura 4.**

*Valores predichos vs reales de la formación de esporas*



Los valores p obtenidos en el análisis de varianza confirman la significancia estadística de cada uno de los factores, según se detalla en la Tabla 10.

**Tabla 10.**

*Análisis de varianza para PE*

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	0,3055	5	0,0611	21,63	0,0147	significant
<b>A-Temperatura</b>	0,0431	1	0,0431	15,26	0,0298	
<b>B-pH</b>	0,0191	1	0,0191	6,75	0,0805	
<b>AB</b>	0,0015	1	0,0015	0,5233	0,5218	
<b>A<sup>2</sup></b>	0,2187	1	0,2187	77,41	0,0031	
<b>B<sup>2</sup></b>	0,0232	1	0,0232	8,20	0,0644	
<b>Residual</b>	0,0085	3	0,0028			
<b>Cor Total</b>	0,3140	8				

Los tres valores p son menores a 0.05, lo que confirma que los factores investigados tienen un efecto estadísticamente significativo en la formación de esporas (log (número de esporas)). Esto sugiere que tanto la temperatura, el pH, así como su interacción, son elementos determinantes en el proceso FES para la producción de esporas.

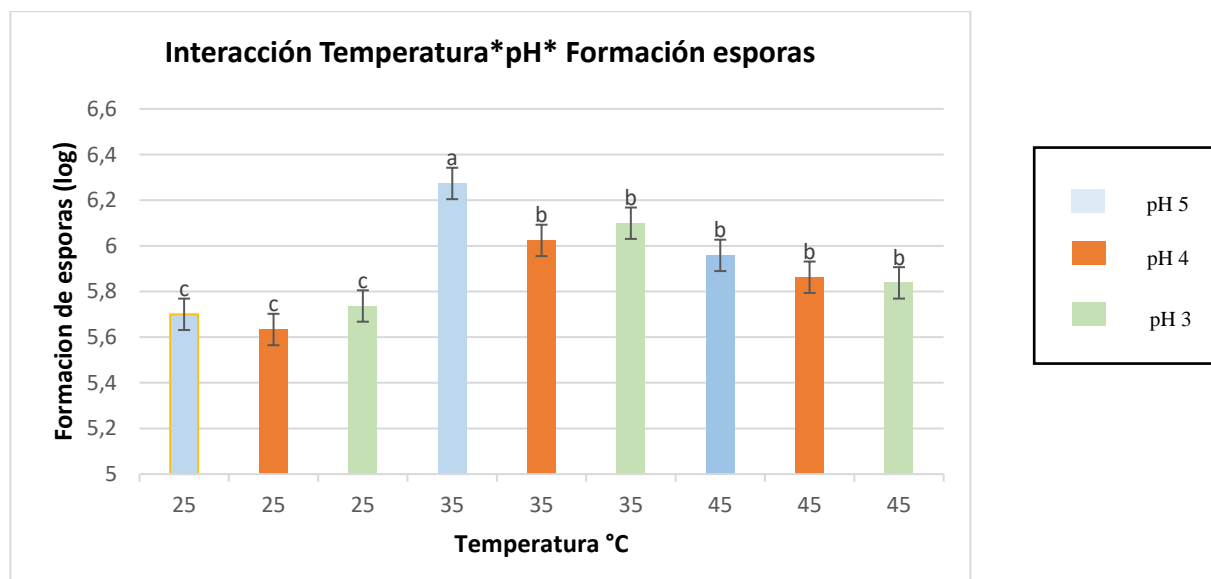
Los resultados indican que los valores obtenidos de  $R^2 = 0.96$  y  $R^2$  ajustado = 0.91 señalan que las combinaciones de ambos factores pueden reproducirse con alta fiabilidad. Se puede esperar que al realizar un adecuado control de los parámetros de fermentación, se obtengan valores casi idénticos en un 91%. Estos altos valores de coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y  $R^2$  ajustado sugieren que la relación entre los factores y los resultados es bastante sólida y predecible, lo que brinda confianza en la replicabilidad de los experimentos y en la posibilidad de obtener resultados consistentes con el control adecuado de los parámetros.

### **Interacción para la formación de esporas.**

La figura 5 presenta los resultados de la productividad AE. Se llevó a cabo la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95% para determinar diferencias entre tratamientos, representando estas diferencias con letras distintas.

**Figura 5.**

*Interacción Temperatura\*pH vs Formación de esporas*



La medición del crecimiento microbiano es crucial durante el proceso de FES y la transformación logarítmica se utiliza comúnmente para normalizar los datos. La Prueba Tukey demostró que T5 (35 °C y pH 5), es estadísticamente significativo posicionándolo como el mejor tratamiento con un máximo de 6.27 esporas/g el cual es comparable con (Chavez, et al. 2022) quien obtuvo resultados de conteo de esporas a una temperatura de 35 °C y humedad de 79%, presentando un valor de log 6.42 esporas/g. En conclusión, el manejo controlado de los parámetros de temperatura y pH parece generar resultados positivos en cuanto a la actividad enzimática obtenida. Al analizar las condiciones del proceso, se puede determinar que estos fueron sometidos a ambientes poco



favorables para el hongo el cual produce enzimas con mayor actividad enzimática como mecanismo de supervivencia según (PATINO et al., 2020).

### **3.3 Optimización de las Variables del Proceso Para Maximizar la Productividad de las Enzimas Celulíticas.**

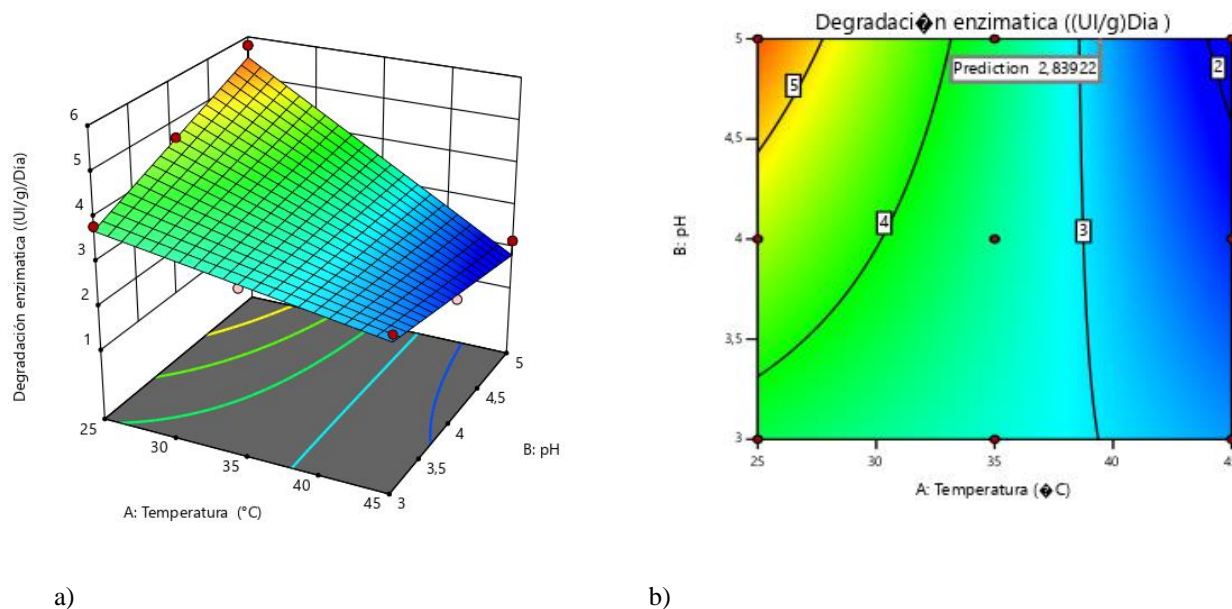
Basándonos en los datos previamente mencionados, se llevó a cabo la optimización de estos factores mediante métodos numéricos con el objetivo de alcanzar los máximos niveles de productividad, tanto en la actividad enzimática como en la cantidad de esporas. Para ello se utilizó el programa Desing expert Versión 13.

#### **3.3.1 Optimización para la Productividad de la Actividad Enzimática**

En la figura 6 se muestran los gráficos que representan el área de análisis, explorando la interacción entre los factores investigados, como la temperatura y el pH, en relación con la variable respuesta, que en este caso es la Productividad AE (actividad enzimática) A través de estos gráficos, es posible identificar y definir el punto que muestra la mayor productividad, es decir, la combinación óptima de temperatura y pH que maximiza la actividad enzimática (Productividad AE).

**Figura 6.**

a) Superficie de respuesta estimada, b) gráfico de contorno



Basándonos en el análisis de la superficie estimada, en la Figura 6.a se aprecia un mínimo de productividad AE en uno de los extremos derechos, precisamente bajo condiciones de 45°C de temperatura y un pH de 3. Por otro lado, el valor máximo de productividad se encuentra en el lado izquierdo de la figura, en puntos donde la temperatura es de 35 °C y pH de 4.9. Datos que son similares a (Yaillet et al., 2018) y (Bonilla Ospina, 2020) quienes realizaron estudios que se enfocaron en la obtención de celulasa mediante el manejo de la temperatura a en un rango de 25 a 40 °C (usando *Fusarium* sp.), la elección de temperaturas se hizo debido a que favorecía la producción de celulasa con una actividad enzimática elevada. Por otro lado, (Dary et al., 2012) manejo un pH de 5 como óptimo para la producción enzimática de celulosa bacteriana, lo cual está directamente vinculado con el enfoque del estudio.

Este resultado se confirma en la Figura 6.b, que muestra el gráfico de contornos. En este gráfico, las líneas de colores representan los niveles de productividad, y se puede apreciar que las líneas de

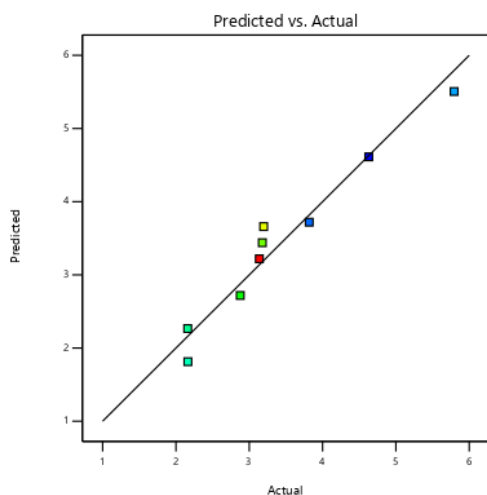
mayor intensidad (color más intenso) se encuentran en las cercanías de los puntos donde la temperatura es de 25 °C y pH de 5. Estos puntos indican las condiciones óptimas que maximizan la productividad AE (actividad enzimática) según la superficie evaluada. En resumen, tanto en la Figura 6.a como en la Figura 6.b, se confirma que los valores máximos de productividad se alcanzan en condiciones de 25 °C de temperatura y 5 de pH.

Sin embargo, el resultado obtenido representa un máximo local debido a que, dentro del rango de valores analizados para los parámetros de estudio, se ha encontrado una posición donde la función alcanza su valor más alto en esa vecindad particular. Es decir, puede haber valores más altos fuera de esta vecindad que no han sido explorados. Es fundamental comprender que un máximo local no garantiza que sea el mejor resultado posible en el conjunto completo de datos, ya que podría haber otros puntos aún más altos en la función en diferentes regiones no consideradas. Para confirmar si el resultado es un máximo global, sería necesario ampliar el rango de exploración o aplicar técnicas adicionales de optimización para buscar el punto más alto en toda la función.

Después de obtener los valores previstos por el modelo establecido para la variable de respuesta, se llevó a cabo una evaluación de la idoneidad del modelo mediante el análisis de residuos. Este análisis consistió en contrastar los valores reales observados con los valores predichos por el modelo. Los resultados de esta comparación se representaron en la figura 7, en donde se puede visualizar la calidad de ajuste del modelo y determinar si existían patrones sistemáticos de error entre los valores reales y predichos. Estos valores proporcionan información importante para evaluar la precisión y confiabilidad del modelo en la predicción de la variable de interés.

**Figura 7.**

*Valores predichos vs observado de productividad AE.*



De acuerdo con la Figura 7, se puede concluir que los residuos del modelo muestran una distribución normal y una variación uniforme, lo que respalda la validez y adecuación del modelo empleado. El  $R^2$  ajustado del 91% también respalda esta afirmación, indicando que el modelo puede explicar alrededor del 91% de la variabilidad de los datos observados. Estas características son fundamentales para asegurar que el modelo utilizado es adecuado y que las predicciones realizadas son confiables y precisas en el contexto de la productividad de la actividad enzimática (AE).

Adicionalmente se obtuvo el modelo de la ecuación (1) donde se puede estimar la producción enzimática.

$$P \text{ AE} = -13,62170 + 0,755758A + 12,84887B - 0,335850 A*B \quad (1)$$

\*P (AE)= Productividad de la actividad enzimática (UI/g\*d)

### **3.3.2 Optimización para la Productividad de Formación de Esporas de *Aspergillus* sp.**

Para determinar la productividad del crecimiento (formación de esporas) del *Aspergillus* sp. se aplicó una regresión no lineal utilizando el método de mínimos cuadrados. Este enfoque permitió

ajustar una curva a los datos experimentales y obtener los valores óptimos de temperatura y pH que maximizan la variable de interés.

El resultado de la regresión proporcionó rangos específicos de temperaturas y pH en los que se encuentra la máxima productividad del crecimiento. Estos rangos óptimos son de gran importancia para optimizar las condiciones de cultivo de *Aspergillus sp.* y maximizar la producción de esporas.

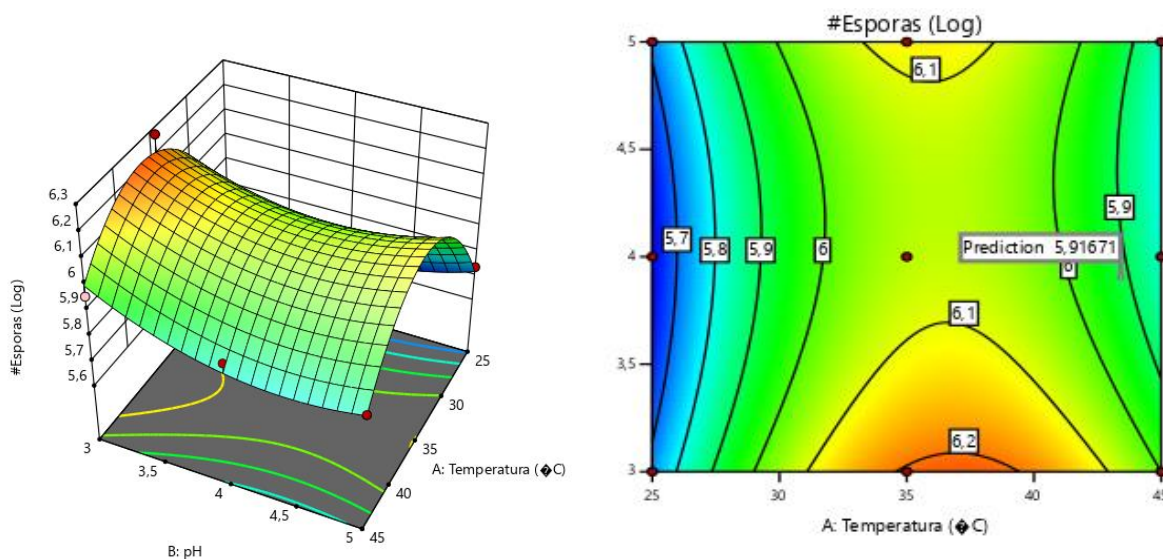
En la Figura 8a se muestra una representación tridimensional de la superficie de respuesta, la cual ilustra cómo varía la variable de interés en este caso la productividad del crecimiento del *Aspergillus sp.* en función de dos variables independientes, como la temperatura y el pH

Los puntos que se encuentran en esta superficie de respuesta corresponden a las combinaciones específicas de temperatura y pH que arrojaron los mejores resultados durante la ejecución del experimento. Estas combinaciones representan las condiciones óptimas para maximizar la productividad del crecimiento. Para evaluar la calidad del ajuste del modelo, se utilizan dos coeficientes de determinación,  $R^2$  y  $R^2$  ajustado. El coeficiente de determinación  $R^2$ , en este caso, tiene un valor del 94%, lo que indica que aproximadamente el 94% de la variabilidad en la productividad del crecimiento puede explicarse por las variables independientes, es decir, la temperatura y el pH

En resumen, los valores de  $R^2=0.94$  y  $R^2$  ajustado=0.93 sugieren que el modelo utilizado para predecir la productividad del crecimiento del *Aspergillus sp.* es adecuado y tiene una alta capacidad de explicar y predecir los resultados observados en el experimento. Además, el hecho de que la replicación del experimento sea viable en un 93% indica que los resultados son consistentes y reproducibles, lo cual es fundamental para la validez y confiabilidad de la investigación.

**Figura 8.**

Valores óptimos de productividad de esporas a) Superficie de respuesta b) Contorno.



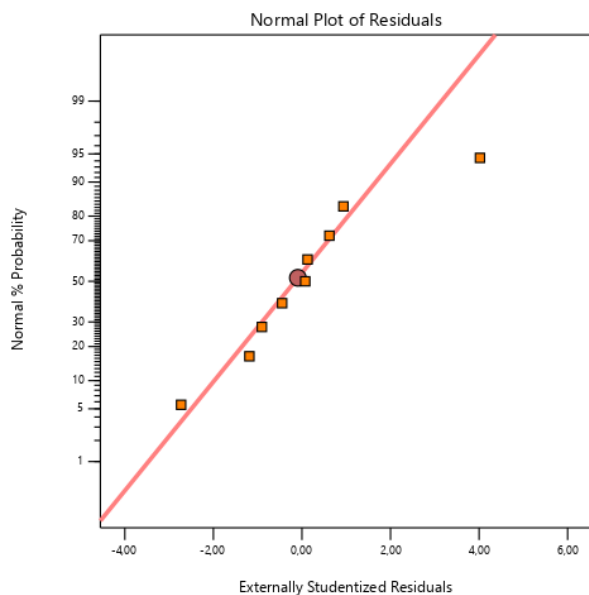
En la figura 11a de la superficie de respuesta, se muestra cómo varía la productividad de esporas del *Aspergillus sp.* en función de las interacciones entre la temperatura y el pH. Al analizar la figura, se puede identificar un óptimo, es decir, una combinación específica de temperatura y pH que resulta en valores máximos de log 5.77 esporas/g\*d. Según la información proporcionada, el óptimo se encuentra dentro de los rangos de temperatura de 35 °C y 37 °C, y pH de 3.8. Esto significa que la productividad de esporas del *Aspergillus sp.* alcanza su punto máximo cuando se cultiva en estas condiciones específicas.

Según reportes de (Núñez Pérez et al., 2022) la temperatura de desarrollo óptimo para las esporas del *Aspergillus niger* se encuentra en un rango de entre 35 a 37 °C. Así también (Yaillet et al., 2018) reporta que la temperatura óptima de crecimiento de *Aspergillus* se encuentra en el rango de 30 °C a 37° C, siendo 35 °C una temperatura comúnmente registrada como óptima en varias cepas de *Aspergillus*.

Pese a, lo antes mencionado el resultado obtenido muestra un máximo local en lugar de un máximo global. Esto implica que dentro del rango de valores específicos que hemos examinado para las variables independientes, hemos alcanzado el valor más alto en la función. Sin embargo, es importante tener en cuenta que fuera de este rango, puede haber otros puntos más altos que representen máximos globales. Por tanto, este resultado es válido dentro del contexto de los valores de las variables que hemos explorado, pero se puede considerar posibles valores adicionales para obtener una imagen completa de la función. En el análisis de residuos, se llevó a cabo una comparación entre los valores reales observados y los valores predichos, como se muestra en la Figura 9.

**Figura 9.**

*Valores de normalidad de esporas.*



Los resultados del análisis indican que el residuo sigue una distribución normal y muestra una varianza homogénea. El valor del  $R^2$  ajustado, que alcanza el 94%, respalda aún más la idoneidad del modelo utilizado. Estas determinaciones aseguran que el modelo es capaz de explicar

aproximadamente el 94% de la frecuencia observada en los datos y que las predicciones realizadas son altamente confiables. Además, la distribución normal y la homogeneidad de la varianza del residual garantizan que el modelo puede ser replicado con consistencia y precisión en futuros estudios o aplicaciones similares. En consecuencia, se confirma la robustez y validez del modelo, lo que proporciona una base sólida para su uso y aplicación en distintos contextos.

De igual manera como en la producción enzimática se obtuvo el modelo de la ecuación (2) donde se puede estimar el crecimiento de esporas.

$$PE = 3,39053 + 0,247657A - 0,849879 B - 0,001922 A*B - 0,003307 A^2 + 0,107600 B^2 \quad (2)$$

\*PE= Productividad de logaritmo de formación de esporas.

A partir de lo expuesto anteriormente, se puede afirmar que la actividad enzimática (AE) alcanza su punto máximo en condiciones de estrés a las que el hongo fue sometido, posiblemente como un mecanismo de defensa activado por el organismo. De acuerdo (Vital López & Larralde Corona, 2016) los microorganismos enfrentan cambios fisiológicos y de composición cuando se someten a condiciones estresantes de cultivo, como presión osmótica, temperatura, pH o humedad. Estos cambios inducen una amplia gama de respuestas en su metabolismo para hacer frente a estas situaciones desafiantes. Es probable que el hongo haya desarrollado una mayor actividad enzimática como parte de su respuesta adaptativa a las condiciones estresantes, lo que podría haber influido en los resultados observados. Por lo tanto, el análisis de la AE bajo condiciones de estrés proporciona información valiosa sobre la capacidad de los microorganismos para adaptarse y sobrevivir en ambientes desfavorables.

Por otro lado (PATINO et al., 2020) sostiene que hay una mayor producción de estos metabolitos cuando el hongo alcanza su fase estacionaria, caracterizada por un crecimiento lento y constante. Asimismo, se observa un aumento en los niveles de estos metabolitos cuando el microorganismo enfrenta situaciones de estrés nutricional o ambiental, lo que actúa como un mecanismo de



supervivencia. La importancia de la Actividad Enzimática (AE) radica en que sirve como un indicador de la calidad de las enzimas producidas por el hongo.

## CAPÍTULO IV.

### 4.1 Conclusiones

- La pulpa de café proporciona los nutrientes necesarios para el desarrollo y la actividad metabólica del hongo lo que lo convierte un sustrato adecuado.
- La fermentación sólida se ve fuertemente influenciada por los factores de temperatura y pH del sustrato.
- Los puntos óptimos en cuanto al pH, para la actividad enzimática se encontraron en un extremo superior del rango estudiado, sin embargo, para la formación de esporas se obtuvo al extremo inferior, no siendo así para la temperatura donde se encontraron máximos en los dos términos a temperaturas similares.

### 4.2 Recomendaciones

- Realizar una evaluación del comportamiento tanto de la actividad enzimática como del crecimiento de esporas a  $\text{pH} > 5$ .
- Utilizar otros métodos para medir la actividad enzimática, ya que se ha observado que existen técnicas más precisas que el método DNS (3,5-dinitrosalicílico).

## Referencias

- Aguilar-Navarro, B., Camacho-Pozo, M., & Serrat-Díaz, M. de J. (2014). Enriquecimiento proteico de residuales agroindustriales mediante fermentación sólida con el hongo filamentoso *Aspergillus niger*. *Proteic Enrichment of Agroindustrial Wastes by Means of the Solid Fermentation with the Filamentous Fungus Aspergillus Niger.*, 26(1), 17–25.
- Asencio, J. D. (2019). *Análisis del sector cafetalero y su aporte a la economía ecuatoriana, periodo 2012 - 2016*. Guayaquil: Universidad de Guayaquil.
- Antonio, C., Cuamani, T., Soto Sánchez, A., Mayo, M. M., Loera Corral, O., Paquini, C. M., & Ramírez Bribiesca, E. (n.d.). *EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL FERMENTADO DE PAJA DE CEBADA Y RAICILLA OBTENIDO POR FERMENTACIÓN SÓLIDA (FES) CON EL HONGO *Pleurotus sapidus**.
- Bello, D., Carrera, E., & Díaz, Y. (2006). Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3, 5 dinitrosalicílico. *ICIDCA. Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, 40(2).
- Bonilla Ospina, N. (2020). *Optimización de la producción de celulasa a partir de *Fusarium sp.* Optimization of cellulase production by *Fusarium sp.**
- Carrillo, M., Zavala, D., Alvarado, B., Morales, K., & Bautista, P. (2011). OBTENCIÓN DE BIOMASA A PARTIR DE CÁSCARA DE CAFÉ. *Revista Académica de Investigación*, 6, 1–13.  
[https://www.researchgate.net/publication/227433215\\_OBTENCION\\_DE\\_BIOMASA\\_A\\_PARTIR\\_DE\\_CASCARA\\_DE\\_CAFE](https://www.researchgate.net/publication/227433215_OBTENCION_DE_BIOMASA_A_PARTIR_DE_CASCARA_DE_CAFE)
- Celulasa en el tratamiento de fitobezoares*. (n.d.). Retrieved January 8, 2024, from [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0212-16112011000600042](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112011000600042)
- Dary, L., Pineda, C., Alfonso, L., Mesa, C., Arturo, C., & Riascos, M. (2012). Ingeniería y Ciencia Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: una revisión 307|. *Ing. Cienc*, 8(16), 307–335. <http://www.eafit.edu.co/ingciencia>
- De, C., Veterinaria, M., Zootecnia, Y., Lucia, D., & Abad, G. (2016). *ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES AUTORA: Tesis de grado previa a la obtención del título de Médica Veterinaria Zootecnista*. Universidad Nacional De Loja.
- Efecto del ph en la producción de celulasas de aspergillus niger en fermentación sólida*. (n.d.-a). Retrieved November 18, 2023, from [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2223-48612017000200004](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2223-48612017000200004)
- Efecto del ph en la producción de celulasas de aspergillus niger en fermentación sólida*. (n.d.-b). Retrieved January 8, 2024, from [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2223-48612017000200004](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2223-48612017000200004)
- Efecto del ph en la producción de celulasas de aspergillus niger en fermentación sólida*. (n.d.-c). Retrieved July 5, 2023, from [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2223-48612017000200004](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2223-48612017000200004)
- Fernández, S. (2020). *DISEÑO DE EXPERIMENTOS: DISEÑO FACTORIAL Memoria y Anexos*. Universitat Politècnica de Catalunya BarcelonaTech.
- Fierro Cabrales, N., Contreras Oliva, A., González Ríos, O., Rosas Mendoza, E., & Morales Ramos, V. (2018). CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y NUTRIMENTAL DE LA PULPA DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) CHEMICAL AND NUTRITIONAL

- CHARACTERIZATION OF COFFEE PULP (*Coffea arabica* L.). *AGRO PRODUCTIVIDAD*, 11(4), 9–13.
- Fonseca, B., Fernández, D., & López, D. (2020). Enriquecimiento proteico de *Solanum tuberosum* mediante fermentación en estado sólido utilizando *Aspergillus niger*. *Bionatura Vol. 5, N°3*, 1189-1194.
- Gallardo, C. (2017). *Optimización de parámetros de fermentación de Aspergillus niger para la producción de glucoamilasas con aplicación en la clarificación de jugo de manzana*. Universidad de Cuenca.
- Giraldo, G. M. (2020). *Aprovechamiento de la pulpa de café mediante procesos biotecnológicos para la obtención de nuevos productos*. Medellín: Universidad Nacional Abierta y a Distancia.
- Greice Sandri, I., & Moura da Silveira, M. (2018). Production and Application of Pectinases from *Aspergillus niger* Obtained in Solid State Cultivation. *Beverages*, 1-10.
- Hidalgo, D., Antolín, G., Del Carpio, M., Meza, N. Y., Martín, J. M., Corona, F., Díez, D., Urueña, A., Aguilar, Ó., Sandoval, G., Bolaños, R. E., Dávila, G., Godofredo Peña, J., Salazar, I., Jiménez, H. G., Tancredi, N. A., Amaya, A., Posso, F. R., Mantilla, N. M., ... Chaim, G. (2020). *Producción de biometano para combustible de transporte a partir de residuos de biomasa*.
- Hoyos Salazar Kevin Hincapie Velásquez Diagramación, G., & del Rosario Rodríguez, M. L. (n.d.). *Edición: Sandra Milena Marín López Fotografías*. Retrieved November 9, 2021, from [www.cenicafe.org](http://www.cenicafe.org)
- INIAP. (2015). *PLAN DE INVESTIGACION Y DESARROLLO TECNOLÓGICO CAFERALERO CON ENFOQUE PRODUCTIVO*. 2015.  
<https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/1721/1/plan%20de%20investigaci%20c3%20b3n%20y%20desarrollo%20tecnologico%20cafetalero.PDF>
- Leon-Revelo, G. (22 de Junio de 2017). *Efecto del ph en la producción de celulasas de aspergillus niger en fermentación sólida*. Obtenido de Effect of the initial ph in the cellulase of aspergillus niger production in solid-state fermentation:  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2223-48612017000200004](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2223-48612017000200004)
- López., C. V. (29 de Noviembre de 2011). *Celulasa en el tratamiento de fitobezoares*. Obtenido de Cellulase in the treatment of phytobezoars:  
[https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0212-16112011000600042#bajo](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112011000600042#bajo)
- Medellín, U. d. (2020). *Producción de Celulasas*. Obtenido de Producción de Celulasas.
- Núñez Pérez, J., Chávez Arias, B. S., de la Vega Quintero, J. C., Zárate Baca, S., & Pais-Chanfrau, J. M. (2022). Multi-Objective Statistical Optimization of Pectinolytic Enzymes Production by an *Aspergillus* sp. on Dehydrated Coffee Residues in Solid-State Fermentation. *Fermentation 2022, Vol. 8, Page 170*, 8(4), 170.  
<https://doi.org/10.3390/FERMENTATION8040170>
- Noguera, N., Sánchez, V., Soto, J., Ojeada, L., & Rodríguez, C. (2020). Aislamiento de *Aspergillus niger* con actividad lignocelulítica a partir de *Brachiaria* spp. *Revista de Ciencia y Tecnología Agrollanía Vol.19*, 1-6.
- Ortiz, A., Sosa, I., Vizcarra, M., & Pineda, T. (2019). *Estudio de la deshidratación de la pulpa de café en un equipo de lecho fluidizado*. Estudio de La Deshidratación de La Pulpa de Café En Un Equipo de Lecho Fluidizado.

- [https://smbb.mx/congresos%20smbb/veracruz01/TRABAJOS/AREA\\_XIII/CXIII-29.pdf](https://smbb.mx/congresos%20smbb/veracruz01/TRABAJOS/AREA_XIII/CXIII-29.pdf)
- Parzanese, M. (2016). *Tecnologías para la industria de alimentos FERMENTACIÓN EN SUSTRATO SÓLIDO: APROVECHAMIENTO DE SUBPRODUCTOS DE LA AGROINDUSTRIA FICHA N° 27.*
- Pastrana, L. (1996). CYTA-Journal of Food FUNDAMENTOS DE LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO Y APLICACIÓN A LA INDUSTRIA ALIMENTARIA. *Alimentaria, ; Fundamentos De La Fermentación En Estado Sólido Y Aplicación A La Industria CYTA-Journal of Food, 1(3), 4–12.*  
<https://doi.org/10.1080/11358129609487556>
- PATINO, M., NIETO-RAMIREZ, I. J., CHEGWIN-ANGARITA, C., TORRES-ROJAS, E., PATINO, M., NIETO-RAMIREZ, I. J., CHEGWIN-ANGARITA, C., & TORRES-ROJAS, E. (2020). ACTIVIDAD BIOCONTROLADORA IN VITRO DE MACROHONGOS CONTRA DIFERENTES HONGOS FITOPATÓGENOS. *Acta Biológica Colombiana, 25(2), 265–279.* <https://doi.org/10.15446/ABC.V25N2.75303>
- ¿Qué es la Celulasa? Beneficios y propiedades | NutriTienda. (n.d.). Retrieved December 6, 2021, from <https://blog.nutritienda.com/celulasa/>
- Rathinavelu, R., & Graziosi, G. (2005). Posibles usos alternativos de los residuos y subproductos del café. *International Coffe Organization, 5, 1–5.*
- Restrepo, L. F., & Villa, G. (2020). *Estrategias para el aprovechamiento de la pulpa de café en las fincas cafeteras del municipio de Andes, Antioquia.* Medellín: Tecnológico de Antioquia.
- Sánchez, A. M., Vayas, T., Mayorga, F., & Freire, C. (2020). *SECTOR CAFETERO ECUATORIANO.* Observatorio Económico y Social de Tungurahua Universidad Técnica de Ambato.
- Sandri, I. G., & da Silveira, M. M. (2018). Production and application of pectinases from *aspergillus niger* obtained in solid state cultivation. *Beverages, 4(3).*  
<https://doi.org/10.3390/BEVERAGES4030048>
- Serna, J. A., Torres, L. S., Martínez, K., & Hernández, M. C. (2018). Aprovechamiento de la pulpa de café como alternativa de valorización de subproductos. *ION Vol. 31, N°1, 37-42.*
- Tingo Proaño, E., & Acosta, R. (2011). Utilización de Residuos de Café Tostado y Molido como Bioadsorbente para la Remoción de Arsénico (V) en Agua. *Química Central, 2(1), 49–59.* <https://doi.org/10.29166/QUIMICA.V2I1.571>
- Torres-Valenzuela, L. S., Martínez, K. G., Serna-Jimenez, J. A., & Hernández, M. C. (2019). Secado de Pulpa de Café: Condiciones de Proceso, Modelación Matemática y Efecto sobre Propiedades Fisicoquímicas. *Información Tecnológica, 30(2), 189–200.*  
<https://doi.org/10.4067/S0718-07642019000200189>
- Ubalde, M., Villadóniga, C., Giacomini, C., & Grazú, V. (2002). Capítulo 1 “GENERALIDADES DE ENZIMAS” Autores. In *Naturaleza y clasificación de enzimas* (pp. 1–34). Universidad Politécnica de Madrid.
- Velásquez, J. A., Beltrán, F. D., Padilla, L., & Giraldo, G. (2010). Obtención de ácido cítrico por fermentación con *aspergillus niger* utilizando sustrato de plátano dominico hartón (musa aab simmonds) maduro. *Tumbaga, ISSN-e 1909-4841, Vol. 1, N° 5, 2010, Págs. 135-147, 1(5), 135–147.*

- <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3628261&info=resumen&idioma=SPA>
- View of Valor nutritivo de la pulpa de café sometida a fermentación sólida usando Aspergillus niger en pollos y cerdos.* (n.d.). Retrieved July 18, 2023, from <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agromeso/article/view/25350/25596>
- Vilches, L. (2002). Determinación de la actividad de exoglucanasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaráz. *Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.*, 77.
- Villalpando, J., Jaubert, S., Cordova, J., Ibarra, D., Amaya, L., Mateos, J., Díaz, D., Rodríguez, J., Herrera, E., & Jalisco, G. (2010). PRODUCCIÓN DE PECTINASAS POR FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO RESIDUOS AGROINDUSTRIALES. *Academia Mexicana de Investigación y Docencia En Ingeniería Química*, 2592–2595.
- Vista de Biomasa: métodos de producción, potencial energético y medio ambiente.* (n.d.). Retrieved November 10, 2021, from <https://revistasdigitales.uniboyaca.edu.co/index.php/reiv3/article/view/109/108>
- Vista de Fermentación de residuos de café con Aspergillus Niger para la producción de celulasa / REVISTA DE INNOVACIÓN Y TRANSFERENCIA PRODUCTIVA.* (n.d.). Retrieved July 8, 2023, from <https://revistas.itp.gob.pe/index.php/ritp/article/view/8/24>
- Vital López, P., & Larralde Corona, C. P. (2016). Respuestas metabólicas al estrés de levaduras de importancia industrial. *Investigación y Ciencia de La Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 67, 86–91. <https://doi.org/10.33064/iycuaa2016672789>
- Yaillet, E. :, Carvajal, A., Leon-Revelo, G., César Cujilema-Quitio, M., Baryolo, L., Delgado, E. R., Córdova, J., Luis, Y., & Ramos-Sánchez, B. (2018). DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA ÓPTIMA PARA LA PRODUCCIÓN DE CELULASAS CON ASPERGILLUS NIGER EN FERMENTACIÓN SÓLIDA DETERMINATION OF THE OPTIMUM TEMPERATURE FOR THE CELLULOSE PRODUCTION BY ASPERGILLUS NIGER IN SOLID FERMENTATION. 45. <http://centrozucar.uclv.edu.cu>

## Anexos

Anexo 1: Fórmula para cámara de conteo

$$\text{Partículas por } \mu\text{l volumen} = \frac{\text{Partículas contadas}}{\text{superf. cont. (mm}^2\text{)} * \text{Profundidad cámara (mm)} * \text{Dilución}}$$

Anexo 2: Proceso de obtención de Celulasa



**Figura 1** Secado



**Figura 2** Trituración



**Figura 3** Tamizaje



**Figura 4** Caracterización



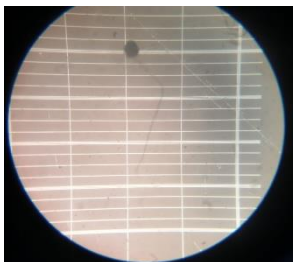
**Figura 5** Caracterización



**Figura 6** Pesaje



**Figura 7** Inoculación



**Figura 8** *Aspergillus niger*



**Figura 9** Placa colonizada



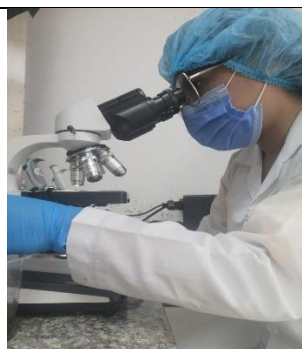
**Figura 10** Mezclado



**Figura 11** Estabilización  
Biorreactores (fermentación)



**Figura 12** Cámara de conteo



**Figura 13** Conteo



**Figura 14** Filtrado



**Figura 15** Centrifugación



**Figura 17** Muestras con Reactivo DNS