



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES CARRERA DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

OBTENCIÓN DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS MEDIANTE FERMENTACIÓN SÓLIDA CON *Aspergillus niger* A PARTIR DE DESECHOS DE CAFÉ

TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL

Autor: Chávez Arias Brayan Santiago

Director: Ing. Jimmy Núñez MSc.

Ibarra – Ecuador

2021



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

OBTENCIÓN DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS MEDIANTE FERMENTACIÓN
SÓLIDA CON *Aspergillus niger* A PARTIR DE DESECHOS DE CAFÉ

Tesis revisada por los miembros del tribunal, por lo cual se autoriza su
presentación como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

APROBADA

Ing. Jimmy Nuñez, MSc.

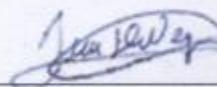
DIRECTOR DE TESIS



FIRMA

Ing. Juan Carlos de la Vega, MSc.

OPOSITOR



FIRMA

Ing. Santiago Zarate, MSc.

OPOSITOR



FIRMA



**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:

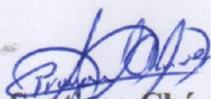
DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	172767345-9		
APELLIDOS Y NOMBRES:	Chávez Arias Brayan Santiago		
DIRECCIÓN:	Calle Isidro Ayora, Barrio América, Parroquia Juan Montalvo – Cayambe		
EMAIL:	bschavez@utn.edu.ec		
TELÉFONO FIJO:	022127416	CELULAR:	0981960393

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	Obtención de enzimas pectinolíticas mediante fermentación sólida con <i>Aspergillus niger</i> a partir de desechos de café
AUTOR:	Chávez Arias Brayan Santiago
FECHA:	22/07/2021
PROGRAMA:	<input checked="" type="checkbox"/> PREGRADO () POSGRADO
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniero Agroindustrial
ASESOR/DIRECTOR:	Ing. Jimmy Núñez, MSc.

2. CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, 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 en caso de reclamación por parte de terceros. Ibarra, a los veintiséis días del mes de julio de 2021

EL AUTOR:


Brayan Santiago Chávez Arias

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado por el Sr. Brayan Santiago Chávez Arias, bajo supervisión.



.....
Ing. Jimmy Núñez, MSc.
DIRECTOR DE TESIS

DEDICATORIA

Mi tesis se la dedico con todo el amor del mundo a mis padres y hermanos, que sin su apoyo no habría sido posible que hoy esté terminando una etapa más de mi vida, ya que su apoyo y aliento me impulsaron a seguir adelante y no rendirme, que entre altos y bajos jamás me dejaron solo y me incentivaron a continuar persiguiendo mis sueños y anhelos.

A mis amigos que estuvieron para mí en toda situación, por más buena o adversa que esta sea y que me dieron ánimos durante este largo camino.

A mis maestros que dieron de su tiempo y paciencia para enseñarme, no solo lo necesario para la vida profesional, sino también lo necesario para lo que me espera en la vida como tal.

A mi familia que me apoyo durante toda esta etapa y me alentaron para seguir adelante.

A mis compañeros de Aula con quienes compartí experiencias y aprendimos mutuamente unos de los otros.

Santiago

AGRADECIMIENTOS

Quiero empezar agradeciendo a mi mamá Anita y a mi papá Santiago por haberme dado la oportunidad de seguir mi carrera universitaria, al esfuerzo y sacrificio que hicieron para que yo, hoy día esté recibiendo mi título y sobre a todo por el amor que me han brindado siempre. Así también a mis hermanos Kandy y Tony que estuvieron para mí siempre que lo necesité, pues todos ellos siempre estuvieron apoyándome a cumplir mis sueños, y me apoyaron en todas y cada una de las locuras que pasaban por mi cabeza, siempre viendo por mi bienestar y mi felicidad.

A mis amigos con quienes compartí todo tipo de experiencias y de los cuales aprendí que, en efecto, los amigos son la familia que uno escoge, y agradezco a todos y cada uno de ellos por ser parte de mi vida, en especial a mi mejor amiga Naty, que, pese a cualquier situación, decisión o momento nunca me dejó solo y me impulsó seguir adelante y a Anne a quien conocí por coincidencias de la vida, y que hoy en día es una de las personas más importantes para mí, pues ella también ha sido unas de las personas quien más me ha alentado a perseguir mis sueños y a nunca rendirme.

A mis maestros de la Universidad Técnica del Norte por haberme enseñado todo lo necesario para desenvolverme en la vida profesional y en la vida como tal, en especial a mi director el Ingeniero Jimmy Núñez que desde el principio se comprometió con mi trabajo y estuvo ahí para guiarme, agradezco infinitamente toda su paciencia para conmigo así también al Ingeniero Juan Carlos de la Vega y al Ingeniero Santiago Zarate quienes en calidad de asesores también me supieron guiar para terminar con mi trabajo.

Agradezco a la Dra. María Echeverría, a la Ingeniera Karina Garzón y al Ingeniero Adrián Torres por haberme abierto las puertas de los laboratorios de su carrera para que yo pudiese terminar mi trabajo de titulación, así como las guías que me supieron brindar en su momento.

Para ser sincero, no existen palabras que puedan expresar todo lo agradecido que estoy con todas y cada una de las personas que me han ayudado a seguir adelante y a nunca rendirme para alcanzar mis sueños, sin embargo, me llevo una grata experiencia y muchos amigos en el camino a quienes quiero y agradezco de corazón que sean parte de mi vida.

Santiago

Contenido

INDICE DE TABLAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ÍNDICE DE ECUACIONES	iii
Resumen	iv
Summary.....	v
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. PROBLEMA.....	1
1.2. JUSTIFICACIÓN.....	2
1.3. OBJETIVOS.....	3
1.3.1. OBJETIVO GENERAL.....	3
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
1.4. HIPÓTESIS.....	3
1.4.1. ALTERNATIVA.....	3
1.4.2. NULA.....	3
CAPÍTULO II.....	4
MARCO TEÓRICO	4
2.1. CAFÉ.....	4
2.1.1. DESECHOS DE CAFÉ.....	4
2.1.2. USOS Y APLICACIONES.....	5
2.2. FERMENTACIÓN SÓLIDA.....	6
2.2.1. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN EL PROCESO FES.....	6
2.2.2. INFLUENCIA DE LA HUMEDAD SOBRE EL PROCESO FES.....	7
2.2.3. PARÁMETROS PARA FES CON HONGOS.....	7
2.3. <i>Aspergillus niger</i>	7

2.3.1.	USOS Y APLICACIONES.	8
2.4.	ENZIMAS.....	8
2.4.1.	ENZIMAS PECTINOLÍTICAS.	9
2.4.2.	CLASIFICACIÓN DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS.	9
2.4.3.	USOS Y APLICACIONES.	10
2.4.4.	ESTABILIDAD ENZIMÁTICA.....	11
2.5.	PRODUCTIVIDAD.....	11
CAPÍTULO III		13
MATERIALES Y MÉTODOS.....		13
3.1.	Localización del experimento.....	13
3.2.	MATERIALES Y EQUIPOS.	13
3.2.1.	MATERIA PRIMA E INSUMOS.....	13
3.2.2.	Materiales y equipos de laboratorio.....	14
3.2.3.	SOFTWARE.....	14
3.3.	Métodos.....	14
3.3.1.	CARACTERIZAR LOS DESECHOS DE CAFÉ MEDIANTE ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS.....	14
3.3.2.	DETERMINAR LOS PARÁMETROS DE TEMPERATURA Y HUMEDAD EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN SÓLIDA.....	15
3.3.3.	OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES DEL PROCESO PARA MAXIMIZAR LA PRODUCTIVIDAD DE LAS ENZIMAS PECTINOLÍTICAS...	17
3.4.	MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO.....	18
3.4.1.	DIAGRAMA DE FLUJO.....	18
3.4.2.	DESCRIPCIÓN DEL PROCESO.	20
CAPÍTULO IV.....		24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		24

4.1. CARACTERIZAR LOS DESECHOS DE CAFÉ MEDIANTE ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS.....	24
4.1.1. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS.....	24
4.2. DETERMINAR LOS PARÁMETROS DE TEMPERATURA Y HUMEDAD EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN SÓLIDA.	26
4.2.1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.	26
4.2.2. PRODUCTIVIDAD PARA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	28
4.2.3. FORMACIÓN DE ESPORAS.	30
4.2.4. PRODUCTIVIDAD PARA LA FORMACIÓN DE ESPORAS.	32
4.3. OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES DEL PROCESO PARA MAXIMIZAR LA PRODUCTIVIDAD DE LAS ENZIMAS PECTINOLÍTICAS.	35
4.3.1. OPTIMIZACIÓN PARA LA PRODUCTIVIDAD DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.	35
4.3.2. OPTIMIZACIÓN PARA LA PRODUCTIVIDAD DE FORMACIÓN DE ESPORAS DEL <i>Aspergillus niger</i>	37
CAPÍTULO V.....	40
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.	40
5.1. CONCLUSIONES.....	40
5.2. RECOMENDACIONES.....	41
BIBLIOGRAFÍA.....	42
ANEXOS.....	50

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros para fermentación Sólida	7
Tabla 2. Ubicación y datos meteorológicos del área de experimentación.....	13
Tabla 3. Variables Cuantitativas del Análisis Físico Químico.	14
Tabla 4. Factores en estudio.	15
Tabla 5. Combinación de factores en estudio.....	16
Tabla 6. Aleatorización de tratamientos de tratamientos.....	16
Tabla 7. Características del experimento.....	17
Tabla 8. Análisis fisicoquímicos de pulpa deshidratada.....	24
Tabla 9. Análisis de Varianza para AE.....	27
Tabla 10. Análisis de Varianza para Productividad.....	29
Tabla 11. Análisis de Varianza para el log de esporas	31
Tabla 12. Análisis de Varianza para Productividad del crecimiento logarítmico de esporas.	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curva de calibración de azúcares reductores	23
Figura 2. Interacción Temperatura*Humedad vs Actividad Enzimática	28
Figura 3. Interacción de la productividad para Temperatura vs Humedad.	30
Figura 4. Interacción Temperatura * Humedad del crecimiento y log de esporas.	32
Figura 5. Interacción de la productividad del crecimiento logarítmico de esporas para Temperatura vs Humedad.....	34
Figura 6. a) Superficie de respuesta estimada, b) gráfico de contorno.....	35
Figura 7. Valores predichos vs observado de productividad AE.	36
Figura 8. Valores óptimos de productividad de esporas a) Superficie de respuesta b) Contorno.....	37
Figura 9. Valores de productividad de esporas.	39

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación (1). Productividad de la actividad enzimática.....	36
Ecuación (2). Productividad de la formación de esporas.....	38

Resumen.

En la industria cafetera cerca del 90% de la fruta del café no tiene uso comercial, convirtiéndose en una fuente importante de contaminación ya que contiene importantes cantidades de azúcares. Por otro lado, se ha demostrado que el uso de enzimas pectinolíticas mejora el proceso de fermentación del café, las cuales actualmente son importadas en el Ecuador. El objetivo de la presente investigación es aprovechar el residuo del café por vía biotecnológica utilizando el hongo *Aspergillus niger* para la producción de enzimas. En la búsqueda de la mejor condición del proceso de obtención de enzimas, se llevó a cabo un proceso de fermentación en estado sólido, se controlaron los parámetros de temperatura y la humedad a tres niveles cada uno (25 °C, 35 °C y 45 °C) y (40%, 60% y 80% de humedad) a través de un arreglo factorial 3^2 con tres replicas, para el análisis de resultados se utilizó el programa estadístico *Design Expert* 11.0. Teniendo como resultados que los tratamientos con 40% de humedad fueron favorables para una mayor actividad enzimática, no siendo así para la formación de esporas que fueron a mayores valores de humedad (80%), la temperatura tuvo menor impacto para estas dos variables. Concluyendo que los valores de humedad 40% son cercanos a los reportados en la bibliografía para la mayor actividad enzimática y se demostró que este residual de la pulpa de café tiene gran potencial para ser usado como sustrato en los procesos de fermentación sólida.

Summary.

In the coffee industry, close to 90% of the coffee fruit has no commercial use, becoming an important source of contamination since it contains important quantities of sugars. On the other hand, it has been demonstrated that the use of pectinolytic enzymes improves the coffee fermentation process, which are currently imported into Ecuador. The objective of the present research is to take advantage of the coffee residue by biotechnological means using the fungus *Aspergillus niger* for the production of enzymes. In the search for the best conditions for the process of obtaining enzymes, a solid-state fermentation process was carried out, the temperature and humidity parameters were controlled at three levels each (25 °C, 35 °C and 45 °C) and (40%, 60% and 80% humidity) through a 3² factorial arrangement with three replicates, for the analysis of results the statistical program Design Expert 11.0 was used. The results showed that the treatments with 40% humidity were favorable for a higher enzymatic activity, but not for spore formation, which occurred at higher humidity values (80%). It was concluded that the 40% humidity values are close to those reported in the literature for the highest enzymatic activity and it was demonstrated that this coffee pulp residual has great potential to be used as a substrate in solid fermentation processes.

CAPÍTULO I.

INTRODUCCIÓN.

1.1. PROBLEMA.

La producción de café representa un pilar importante dentro de la economía de varios países que se dedican a esta industria. Llegando de esta manera a tener una producción anual a nivel mundial en el 2020 de un poco más de 10 millones de toneladas (Romero C. A., 2020). En Ecuador la producción anual supera las 1400 toneladas anuales solo en producto de exportación que representa cerca del 82% de la producción total (Sánchez, Vayas, Mayorga, & Freire, 2020). En la industrialización de este atractivo producto solo se aprovecha cerca del 10% del fruto, dejando de esta manera más de un 90% de residuos (cascarillas, pulpa y mucílago), los cuales al no ser tratados adecuadamente se convierten al instante en un foco de contaminación ambiental.

Los desechos de esta industria podrían ser empleados para elaboración de subproductos de alto impacto para la agroindustria como productos concentrados para animales, obtención de enzimas, etc. Sin embargo, se limita a ser empleado como abono en el mejor de los casos.

Dentro de la industria cafetera es frecuente encontrar el término fermentación dentro de su proceso productivo, el cual se lo realiza con la finalidad de remover el mucilago de la fruta, para lo cual es necesario el uso de enzimas pectinolíticas, las cuales aceleran el proceso fermentativo, sin embargo, la mayoría de estas son importadas a altos precios para su empleo lo cual deja un gran vacío en esta industria pues no se aprovecha al máximo el potencial que tienen estos residuales dentro de la propia industria, como es la obtención de estas enzimas por medio de fermentación sólida al utilizar dichos residuos como sustrato.

1.2. JUSTIFICACIÓN.

Los residuos de la industria de café son altamente aprovechables por lo cual la industrialización de estos o la obtención de subproductos son una respuesta para reducir los altos índices de contaminación.

La presente investigación pretende obtener enzimas pectinolíticas a partir del uso de los desechos de la industria cafetera sometidos a una fermentación en estado sólido (FES) inoculándolos previamente con un hongo (*Aspergillus niger*) capaz de producir este metabolito al mismo tiempo que se encarga de degradar la pulpa, y de esta manera no solo se aprovecharán los desechos, sino que a su vez se obtendrá un catalizador capaz de acelerar el proceso de desprendimiento del mucilago y así formando a su vez un ciclo cerrado en la producción.

Esto dará como resultado la disminución en la tasa de contaminación por residuos producidos por la agroindustria y a su vez fortalece a la misma ya que dicha enzima acelera el proceso productivo de esta industria es decir aumentará la productividad haciéndola más rentable y obteniendo productos de calidad en menor tiempo de lo estimado. Además, el uso de estas no se limita solamente a lo mencionado anteriormente, pues su aplicación se extiende aún más, un ejemplo de esto es el uso de estas enzimas en procesos de clarificación de productos concentrados, vinos, etc.

1.3. OBJETIVOS.

1.3.1. OBJETIVO GENERAL.

Obtener enzimas pectinolíticas mediante fermentación sólida con *Aspergillus niger* a partir de desechos de café.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Caracterizar los desechos de café mediante análisis fisicoquímicos
- Determinar los parámetros de temperatura y humedad en el proceso de fermentación sólida.
- Optimizar las variables del proceso para maximizar la productividad de las enzimas pectinolíticas

1.4. HIPÓTESIS.

1.4.1. ALTERNATIVA.

Los desechos producidos en la industria cafetera pueden ser empleados como sustrato en la obtención de enzimas mediante fermentación sólida con *Aspergillus niger*.

1.4.2. NULA.

Los desechos producidos en la industria cafetera no pueden ser empleados como sustrato en la obtención de enzimas mediante fermentación sólida con *Aspergillus niger*.

CAPÍTULO II.

MARCO TEÓRICO.

2.1. CAFÉ.

La economía ecuatoriana se destaca por ser productora de materias primas, su sector agrícola es uno de los más representativo y uno de los que más ingresos de divisas genera al año a la economía del país, beneficiándose de estas actividades jornaleros, familias y unidades productoras agrícolas que la conforman, entre los productos del sector agrícola que se producen y comercializan dentro y fuera del país, que más destacan tenemos el plátano, cacao, arroz, caña de azúcar, maíz, papas, abacá, café, entre otros, este sector representa el 14% del PIB y junto con la pesca es responsable de emplear un 30% de todos trabajadores (Asencio, 2019).

Su producción está acotada por límites geográficos comprendidos por los Trópicos de Cáncer y de Capricornio. A nivel mundial, se cultiva en más de 70 países ubicados en esta franja, destacando de manera importante Brasil, Colombia, Ecuador, Indonesia, India y más recientemente Vietnam (Paladines, 2020).

En el Ecuador, es un cultivo de gran importancia económica, ya que cuenta con 199215 ha cultivadas (Venegas, Orellana, & Pérez, 2018).

El café tiene relevante importancia en los órdenes: económico, social, ambiental y salud humana. En lo económico, es una fuente de divisas para el país e ingresos para productores y otros actores de la cadena que en el 2015 representó ingresos por USD 145354370.31 (Venegas, Orellana, & Pérez, 2018).

2.1.1. DESECHOS DE CAFÉ

En el proceso de cultivo e industrialización del café, solamente se aprovecha el 5% del peso del fruto fresco en la preparación de la bebida, el 95% restante está representado por residuos (Fernández, Sotto, & Vargas, 2020).

El alto volumen de residuos puede constituir un problema ambiental, teniendo en cuenta que en muchos casos se vierte a cuerpos de agua, por lo cual los microorganismos presentes van a hacer una demanda mayor de oxígeno para su descomposición, y generan de esta manera asfixia de la biota acuática. En otros casos los residuos se dejan descomponer sobre el suelo

de manera no controlada, y pueden producir problemas fitosanitarios y contaminación cruzada (Serna, Torres, Martínez, & Hernández, 2018).

2.1.2. USOS Y APLICACIONES.

En el cultivo del café se produce gran cantidad de residuos como la pulpa, la cual es generadora de altos niveles de contaminación en el mundo. El procesamiento adecuado de los desechos generados, para ser transformados en productos de valor agregado, puede mejorar la calidad de vida de los caficultores (Restrepo & Villa, 2020).

Es un material que contiene proteínas, carbohidratos y minerales además de altos niveles de potasio, taninos, polifenoles y cafeína que la hace una materia orgánica de amplio potencial (Restrepo & Villa, 2020).

La obtención de abono orgánico a partir de la pulpa es una de las formas más comunes utilizadas para el manejo de este residuo, puesto que no requiere de procesos complejos y permite a los caficultores cumplir con los parámetros exigidos por las cooperativas, ahorrar costos de insumos y obtener unas mayores ganancias por sus cultivos (Restrepo & Villa, 2020).

La pulpa del café puede reemplazar hasta un 20 % de los concentrados comerciales en la alimentación del ganado, sin efectos perjudiciales y con un ahorro del 30% (Encalada, Fernández, Jumbo, & Quichimbo, 2017).

Esta también puede emplearse para la obtención de bebidas por ejemplo, infusiones; esto gracias a la alta cantidad de antioxidantes que posee y puesto que los mismos han adquirido gran importancia y valor en el mercado por sus características funcionales y los beneficios que estos otorgan a los consumidores; al igual que ayuda en los procesos de prevención de diversas enfermedades asociadas a problemas cardiovasculares, cáncer, obesidad y diabetes (Serna, Torres, Martínez, & Hernández, 2018).

La pulpa de café puede al igual que en el alimento animal sustituir en cierto porcentaje las harinas tradicionales empleadas para el consumo humano, pues se puede convertir esta en un polvo fino con textura similar a las mismas, con altos niveles de fibra y proteína y sin la presencia de gluten (Murillo, Otárola, Torres, Rodríguez, & Buendía, 2018).

Así también debido a su composición esta puede ser empleada como sustrato dentro de diversos procesos biotecnológicos con el fin de obtener nuevos productos tales como

enzimas, proteínas, etc. Esto después de ser sometidos a procesos de Fermentación en estado sólido (FES) conjuntamente con algún microorganismo (Giraldo, 2020).

2.2. FERMENTACIÓN SÓLIDA.

La fermentación en estado sólido presenta un gran potencial para nuevas aplicaciones mediante el uso de residuos agroindustriales, cuya generación se encuentra en aumento debido al crecimiento de la industria. La utilización de estos residuos como sustratos y su posterior conversión en productos de valor agregado genera la necesidad de modelar y simular procesos de fermentación sólida (Giraldo, 2020).

La fermentación en estado sólido (FES) tiene como principal objetivo la valorización de residuos orgánicos, este proceso se ejecuta debido a sus bajos costos, sencillez, menor energía, mayor rendimiento de producción, productos más puros y en concentraciones más altas con facilidades para su extracción, además, este proceso se realiza con un estricto control en la humedad que beneficie el crecimiento y reproducción de microorganismos, así mismo, se estipula que es importante utilizar microorganismos adecuados (Prieto & Torres, 2020).

Los cultivos en estado sólido se caracterizan por contener el sustrato transformado por el microorganismo en estado sólido y no en solución o suspensión como ocurre en una fermentación líquida (Fonseca, Fernández, & López, 2020).

Existen dos tipos de fermentación sólida. El primer tipo es aquel donde el material sólido actúa como principal fuente de nutrientes y como soporte físico del microorganismo al mismo tiempo. El segundo tipo, es en el que el material sólido actúa únicamente como soporte o anclaje del microorganismo y para su cultivo se adiciona una solución nutritiva (Fonseca, Fernández, & López, 2020).

2.2.1. 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).

Así también esta afecta la movilidad de las moléculas de agua y el equilibrio entre fases de vapor y adsorbente. Un aumento de la temperatura, para actividad de agua constante, provoca un descenso de la cantidad de agua absorbida (García, 2016).

2.2.2. INFLUENCIA DE LA HUMEDAD SOBRE EL PROCESO FES.

La humedad influye significativamente en el desarrollo microbiano en donde se establece que un alto nivel de humedad da como resultado una baja porosidad del sustrato que a su vez impide la penetración y circulación de aire en la matriz, mientras que un bajo contenido de humedad conduce a una mala difusión de los nutrientes que obstaculizarán el crecimiento microbiano (Prieto & Torres, 2020).

Ensayos con diferentes tipos de hongos en diferentes condiciones de humedad y determinaron que existe desarrollo de los mismos en ambientes que van desde el 40% al 90% de humedad (Ramos & Meza, 2017), determinando que a mayor concentración de humedad existe un mayor crecimiento estos microorganismos.

La humedad afecta el producto de interés en la fermentación pues el control de este parámetro podría ser usado para modificar la producción metabólica o el crecimiento de un microorganismo (García, 2016).

2.2.3. PARÁMETROS PARA FES CON HONGOS.

Dentro de los parámetros más importantes que se deben tomar en cuenta cuando se trabaja con hongos, se encuentran la temperatura, humedad y pH pues todas estas se encuentran ampliamente relacionadas, en la tabla 1 se muestra los rangos de los parámetros FES para hongos.

Tabla 1. Parámetros para fermentación Sólida

Parámetro	Unidad
Temperatura	20-45 °C
pH	3-4.5
Humedad	30%-80%

Fuente: (Aguilar, 2017)

2.3. *Aspergillus niger*.

El *Aspergillus niger* es un hongo filamentoso de coloración negra el cual se presenta principalmente en frutos cítricos como en vegetales como la lechuga, cuando estos llegan a un estado de descomposición (Greice Sandri & Moura da Silveira, 2018).

Este hongo al desarrollarse condiciones óptimas tanto de nutrientes como de condiciones ambientales son capaces de producir metabolitos que son muy empleados dentro de la industria, principalmente la alimentaria, un ejemplo de esto son las enzimas pectinolíticas que son empleadas principalmente en la industria de vinos y néctares para la clarificación, 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 (Greice Sandri & Moura da Silveira, 2018).

2.3.1. USOS Y APLICACIONES.

La producción de ácido cítrico a gran escala es el principal uso que se le da a este microorganismo, sin embargo, empiezan a desarrollarse nuevas líneas en las que se maximiza la producción de macronutrientes, enzimas y otros metabolitos de amplio interés industrial (Fonseca, Fernández, & López, 2020).

La importancia biotecnológica de este hongo y su capacidad de aprovechar material vegetal para su crecimiento, lo convierte en una alternativa de interés económico y ambiental, a fin de promover la recirculación de material orgánico dentro de los sistemas productivos, favoreciendo el desarrollo sostenible con miras hacia una agricultura sustentable (Noguera, Sánchez, Soto, Ojeada, & Rodríguez, 2020).

2.4. ENZIMAS.

Las enzimas son especializadas en intervenir como catalizadoras dentro de procesos que suceden en la célula por lo cual estas tienen una función importante dentro de los organismos. Son muy eficaces como catalizadores ya que son capaces de aumentar la velocidad de las reacciones químicas mucho más que cualquier catalizador artificial conocido, y además son altamente específicos ya que cada uno de ellos induce la transformación de un sólo tipo de sustancia y no de otras que se puedan encontrar en el medio de reacción (Ramírez, 2014).

Las enzimas pueden desempeñar su función en un rango de condiciones muy variables dependiendo del organismo del que provienen y de su función primordial. La mayoría son sustratos específicos y dan origen a un único producto propio de cada enzima (Salazar, Hinojoza, Acosta, Escobar, & Scrich, 2020).

Tanto la composición de la enzima, como las condiciones empleadas para su procesamiento, pueden ser determinantes en las propiedades catalíticas de la misma y en los diversos resultados que se puedan obtener (Salazar, Hinojoza, Acosta, Escobar, & Scrich, 2020).

La utilización de enzimas se desarrolló a partir de la década de los 70 y actualmente, la mayor parte de los preparados enzimáticos comerciales que se emplean en la industria provienen de cultivos del hongo *Aspergillus niger* (Román, 2020).

2.4.1. ENZIMAS PECTINOLÍTICAS.

Las pectinasas son enzimas hidrolasas que poseen la capacidad de degradar la celulosa, la hemicelulosa y la pectina que son los polisacáridos constituyentes de la pared celular de los tejidos vegetales que en la actualidad captan la atención en la industria alimenticia (Román, 2020).

Numerosos microorganismos producen pectinasas, que son enzimas que degradan la pectina. (Hurtado & Otálvaro, 2020). Las enzimas pectinasas son muy útiles en diversos campos principalmente para la degradación de la pared celular de las células vegetales (Román, 2020).

2.4.1.1.FES y pectinasas.

La producción de moléculas biológicamente activas, proporcionan un alto potencial para aplicaciones biotecnológicas. La importancia de las pectinasas ha hecho que su comercialización aumente aceleradamente en el mercado (Salazar, y otros, 2020).

Por otro lado, el empleo del proceso FES para la obtención de enzimas pécticas ha tenido éxito para la producción de las mismas pues se ha realizado ensayos con diferentes tipos de sustratos como bagazo de caña, maíz, etc. con excelentes resultados, puesto a que hay una alta rendimiento en cuanto a la producción y se puede evaluar el comportamiento del hongo durante la fermentación (Arroyo, 2002).

2.4.2. CLASIFICACIÓN DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS.

2.4.2.1.Pectinesterasas.

Es una enzima que se encuentra en la pared celular vegetal de forma natural. Participa en el metabolismo de las plantas y está relacionada con el proceso de crecimiento y maduración del fruto (García M. , 2015).

Catalizan la desesterificación del grupo metoxilo de la pectina que forma el ácido péctico, en frutas y vegetales durante las fases de maduración, procesamiento y reserva; además, se involucran en los cambios de la sustancia péctica (Garcia & Cely, 2020).

2.4.2.2. Poligalacturonasas.

Estas dividen enlaces α -(1, 4)-glucosídico en ácido péctico en medio de las moléculas simples de ácido galacturónico por hidrólisis (hidrolasas) de sustancias pécticas o por β -eliminación (liasas) (Garcia & Cely, 2020).

Se subdivide en dos tipos: Endopoligalacturonasa que catalizan la hidrólisis aleatoria de enlaces glucosídicos α -(1, 4)-ácido y la poligalacturonasa que cataliza el hidrólisis en forma secuencial de α -(1, 4)-glucosídico en enlaces sobre ácido péctico (Garcia & Cely, 2020).

2.4.2.3. Protopectinasas.

Son enzimas que solubilizan la protopectina, y se clasifican en dos tipos. El tipo A degrada el ácido poligalacturónico de la protopectina, mientras que el tipo B degrada las cadenas de polisacáridos que conectan el ácido poligalacturónico con otros constituyentes de la pared celular. En este tipo de enzimas se incluirían las hidrolasas y liasas que degradan el ramnogalacturonano (polisacárido pequeño de estructura muy compleja) (Sadkaoui, 2017).

2.4.3. USOS Y APLICACIONES.

La comunidad científica ha mostrado un gran interés por estas enzimas (pectinasas) por su aplicación industrial en la producción de alimentos, en la fermentación alcohólica de granos, en la extracción de zumos de frutas y verduras, en la industria de la pulpa y el papel, en las industrias textil, alimentaria, química, de combustible, entre otras (Hurtado & Otálvaro, 2020).

Dentro de las aplicaciones más usuales tenemos:

- Su principal aplicación es en maximizar el rendimiento al producir jugos naturales, especialmente de frutos tropicales, manzanas y peras.
- Para la extracción de pigmentos y colorantes naturales de plantas.
- Tienen un importante rol en la fabricación de vino, ayudando a limpiar las uvas recién prensadas y aumentar la consistencia general del vino.
- Aumentar las características organolépticas del jugo

- Extracción, clarificación y concentración de jugos de frutas.
- Clarificación de vinos.
- Extracción de aceites esenciales, sabores y pigmentos a partir de material vegetal.
- Tratamiento de fibras en la industria textil.
- Producción de papel.
- Fermentación de café y té.
- Tratamiento de aguas residuales con contenido de pectina.

En la industria del café y cacao también se han utilizado estas enzimas, especialmente para la preparación de concentrados líquidos de café, reducción de la viscosidad y degradación del mucílago del café o cacao despulpado, buscando disminuir el tiempo del proceso de fermentación (Martínez, 2011).

2.4.4. ESTABILIDAD ENZIMÁTICA.

La estabilidad enzimática es la medida en que una enzima mantiene su actividad o conformación estructural cuando es sometida al almacenamiento, aislamiento y purificación o varias otras manipulaciones físicas o químicas incluyendo enzimas proteolíticas y calor (Ávila, García, Laureano, Sánchez, & Zamorano, 2020).

La estabilidad enzimática tiene tanto aspectos termodinámicos como aspectos cinéticos. La estabilidad cinética es un concepto que está ligado al tiempo promedio en que una enzima mantiene su estructura y su función bajo ciertas condiciones. Cuando una enzima permanece en el estado nativo funcional por un período de tiempo largo que le permite llevar a cabo su función, se dice que es cinéticamente estable. Por otra parte, la estabilidad termodinámica se refiere a las condiciones a las cuales un proceso cumple con el criterio termodinámico de espontaneidad, es decir que tiene una tendencia natural a producirse sin tener que ser realizado por una influencia externa (Romero, Fernández, & Costas, 2018).

2.5. PRODUCTIVIDAD.

Se denomina productividad al indicador que muestra que tan bien se están usando los recursos para la obtención de un producto. Se la puede definir como relación entre recursos utilizados y productos obtenidos en relación al tiempo (Felsinger, 2002).

Se tomó en consideración este tipo de fermentación pues este proceso es capaz de dar altos rendimientos de conversión de sustrato a producto, con menores costos de inversión y producción, cuando se compara con el proceso de fermentación sumergida tradicional (sustratos con alto contenido de agua). Adicionalmente, es una alternativa para el aprovechamiento y agregado de valor de desperdicios o subproductos de la agroindustria, ya que la mayoría de los sustratos usados para la FES surgen de allí (Parzanese, 2016).

CAPÍTULO III.

MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Localización del experimento.

Los experimentos se realizaron en el laboratorio de Biotecnología Aplicada, se encuentran ubicados en el campus San Vicente de Paúl de la Universidad Técnica del norte.

En la tabla 2 se puede visualizar la ubicación del establecimiento, así como sus datos meteorológicos.

Tabla 2. Ubicación y datos meteorológicos del área de experimentación.

Características	Detalle
Provincia	Imbabura
Cantón	Ibarra
Ciudad	Ibarra
Temperatura media anual	13°C - 24°C
Altura	2220 msnm

Fuente: (Weather Spark, 2020)

3.2. MATERIALES Y EQUIPOS.

3.2.1. MATERIA PRIMA E 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

3.2.2. Materiales y equipos de laboratorio.

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.

3.2.3. SOFTWARE.

Se hizo empleo de programas estadísticos y de cálculo para el respectivo análisis de los datos obtenidos en el experimento, tales como:

- Excel 2016
- Design-Expert 11 (versión libre)

3.3. Métodos.

3.3.1. CARACTERIZAR LOS DESECHOS DE CAFÉ MEDIANTE ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS.

Los análisis realizados a la pulpa de café fueron de pH, humedad, materia seca y cenizas los cuales fueron llevados a cabo con las normativas detalladas en la tabla 3, así como también el proceso de secado que al que se sometió la pulpa de café para su conservación.

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)

3.3.2. DETERMINAR LOS PARÁMETROS DE TEMPERATURA Y HUMEDAD EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN SÓLIDA.

Obtención y manejo de las cepas de *Aspergillus niger*

Se trabajó con cepas de *Aspergillus niger* obtenidas en el laboratorio de biotecnología Aplicada, El crecimiento del hongo se llevó a cabo tomando en cuenta el método presentado por Trejo Hernandez (1991).

Se seleccionaron las cepas que colonizaron por completo la placa, permitiendo de esta manera comenzar la experimentación, llevándose a cabo los 3 primeros tratamientos en el laboratorio de Biotecnología de la Carrera de Agroindustrias ubicado en las Unidades Educativas de la UTN y los 6 restantes en el laboratorio de biotecnología aplicada del Campus San Vicente de Paúl.

Factores en estudio.

Se realizó un diseño experimental 3^2 , siendo los *factores la temperatura* (T°) expresada en grados Celsius ($^\circ\text{C}$) y *humedad* (H) expresada en porcentaje (%) con tres niveles cada uno. Estos factores se encuentran representados en la tabla 4.

Tabla 4. Factores en estudio.

Temperatura	<ul style="list-style-type: none">• $T^{\circ}1=25\text{ }^\circ\text{C}$• $T^{\circ}2=35\text{ }^\circ\text{C}$• $T^{\circ}3=45\text{ }^\circ\text{C}$
Humedad	<ul style="list-style-type: none">• H1=40%• H2=60%• H3=80%

Tratamientos en estudio.

En la tabla 5 se presenta la distribución de los 9 tratamientos con los que se trabajó en este experimento.

Tabla 5. Combinación de factores en estudio.

N° tratamientos	Factor A (Temperatura)	Factor B (Humedad)	Combinación	Descripción
1	T° 1	H1	T1H1	25 °C;40
2	T° 2	H1	T2H1	35 °C;40
3	T° 3	H1	T3H1	45 °C;40
4	T° 1	H2	T1H2	25 °C;60
5	T° 2	H2	T2H2	35 °C;60
6	T° 3	H2	T3H2	45 °C;60
7	T° 1	H3	T1H3	25 °C;80
8	T° 2	H3	T2H3	35 °C;80
9	T° 3	H3	T3H3	45 °C;80

Descripción de los tratamientos.

Los tratamientos fueron aleatorizados y se ejecutaron como se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Aleatorización de tratamientos de tratamientos.

Tratamientos	Temperatura, °C	Humedad, %
T1	25	80
T2	25	60
T3	35	60
T4	35	80
T5	45	80
T6	45	60
T7	45	40
T8	35	40
T9	25	40

Características de experimento.

Se realizó 3 repeticiones a los 9 tratamientos, obteniendo de esta manera 27 unidades experimentales las cuales fueron sometidas a un análisis DCA con arreglo factorial AxB, cada unidad experimental está conformada por 75 g de sustrato previamente esterilizado e inoculado con 1% m/m de biomasa de hongo (*Aspergillus niger*). En la tabla 7 se presentan las características del experimento.

Tabla 7. Características del experimento

Tratamientos	9
Repeticiones	3
Unidades experimentales	27

Descripción de las variables del experimento.

Temperatura y Humedad: Fueron medidas a través de un sensor DHT11 programado a un Arduino nano, cuya lectura se proyectaba en una pantalla led también programada al dispositivo, cuyo margen de error en el caso de la temperatura era de ± 1 °C y en la humedad de $\pm 5\%$.

Inóculo: Se empleó 1% m/m de biomasa del hongo, esto se realizó mediante diferencia de peso, midiendo el peso de la placa en el momento de ser inoculado para ser replicado y se le restó al peso final que esta tuvo una vez el hongo colonizó la placa por completo.

Biomasa: Se determinó con el empleo de cámara de Neubauer y de Fuchs-Rosenthal lo cual permitió determinar la cantidad de esporas presentes por ml de muestra diluida, las fórmulas para determinar la concentración de esporas finales se encuentran expresadas en el anexo 1. (Yépez, 2019)

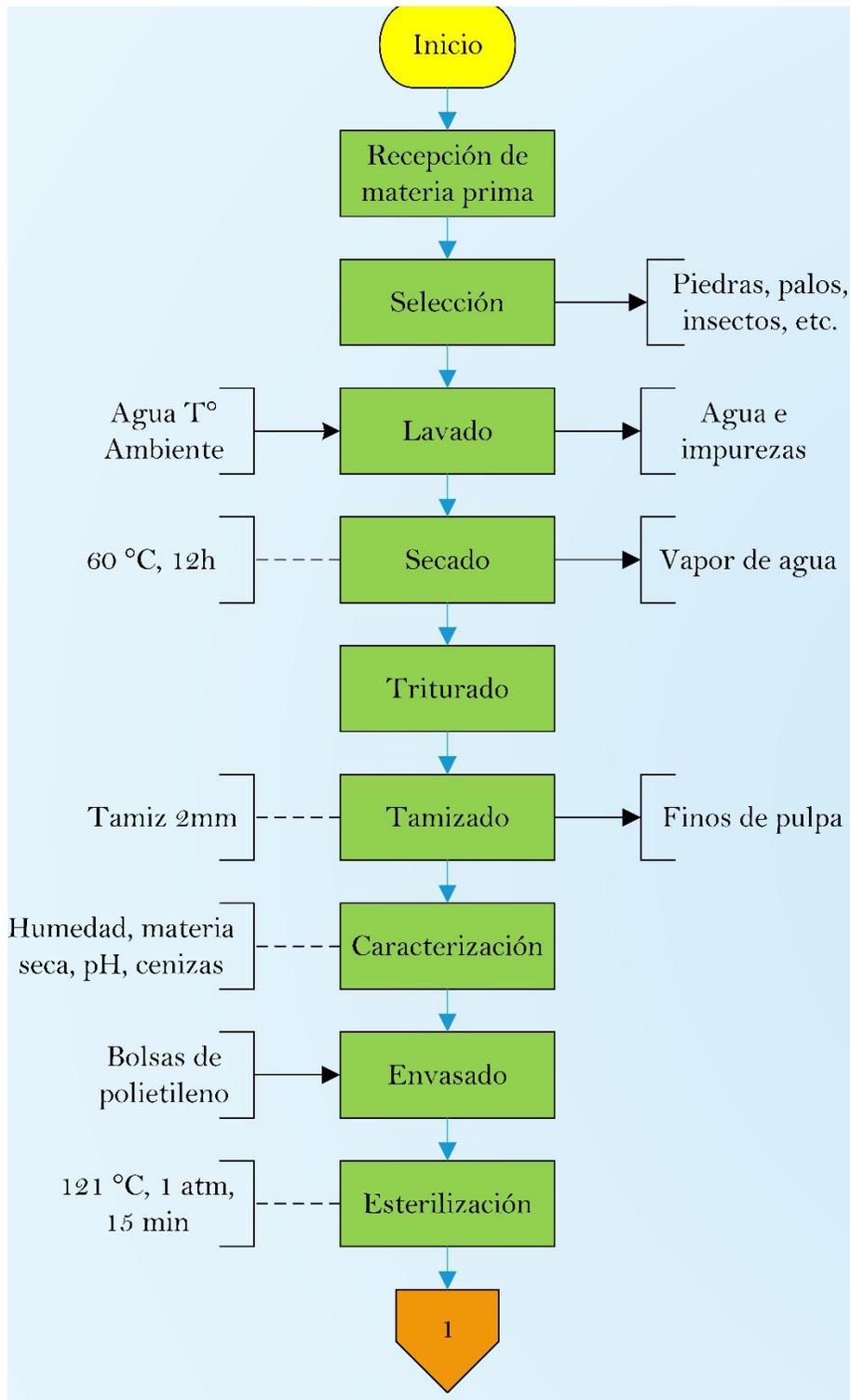
Actividad enzimática: Se expresa en Unidades Internacionales (UI), esto determinado por un factor de conversión, en donde se transforma los azúcares reductores a unidades de actividad enzimática en donde 1 mg de glucosa liberada equivale a 0.185 UI/ml (Jaen, Álvarez, Angulo, & Moreno, 1986).

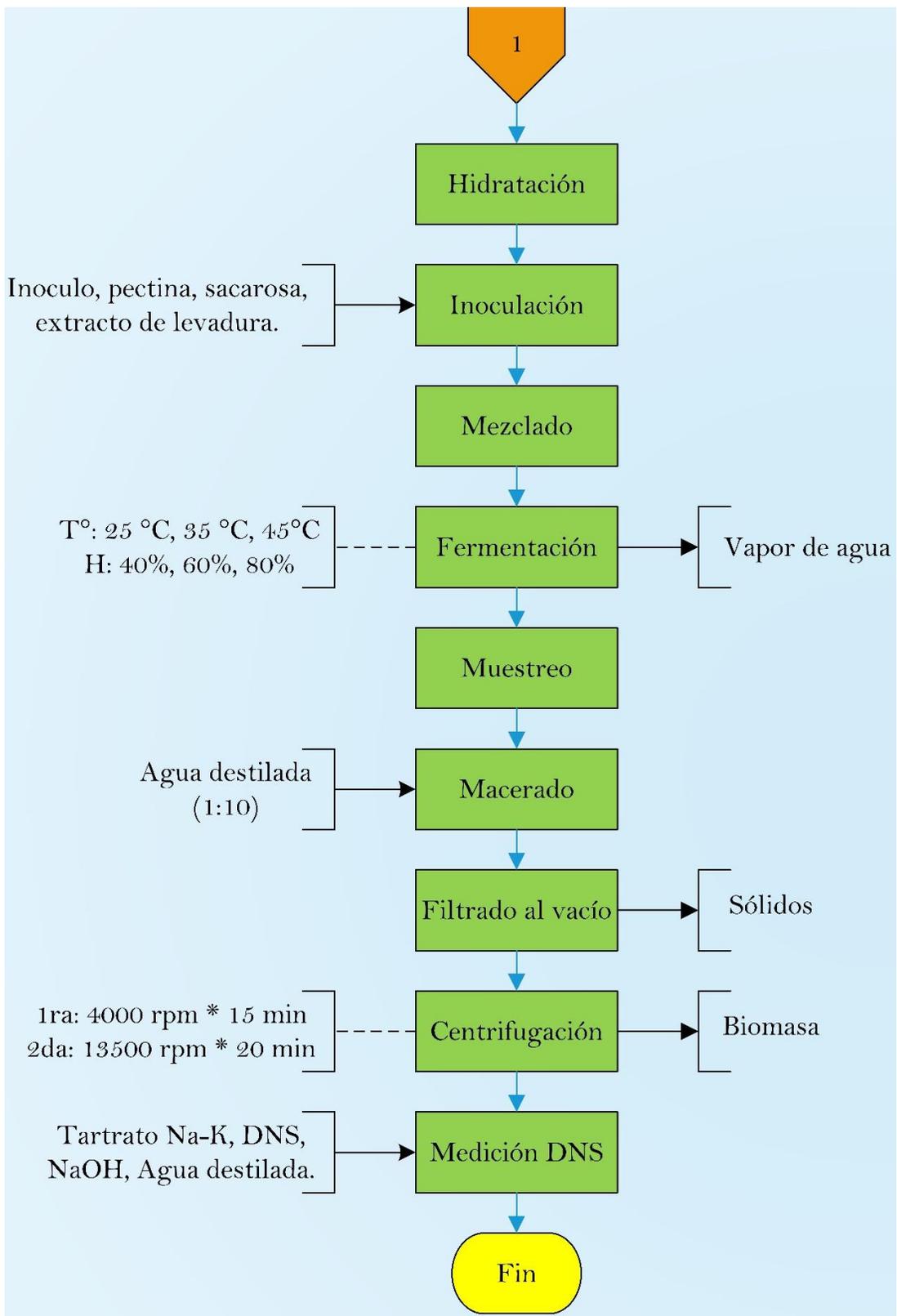
3.3.3. OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES DEL PROCESO PARA MAXIMIZAR LA PRODUCTIVIDAD DE LAS ENZIMAS PECTINOLÍTICAS.

Se realizó la optimización para las dos variables de productividad correspondientes al crecimiento del hongo y a la actividad enzimática, esto mediante el empleo del programa Design-Expert 11 versión libre, aplicando el método de varios factores con regresiones no lineales para ambos casos con un 95% de confiabilidad, esto con la finalidad de obtener los intervalos óptimos para la actividad enzimática de las enzimas pectinolíticas, así como la formación de esporas.

3.4. MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO.

3.4.1. DIAGRAMA DE FLUJO.





3.4.2. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO.

Selección y toma de muestras.

La materia prima (sustrato) fue obtenida de la Asociación Agroartesanal de Caficultores "Río Intag" AACRI.

La materia utilizada no presentaba deterioro o inicios de procesos fermentativos, estos desechos fueron recolectados en bolsas de polietileno, selladas y preparadas para transportarlas.

Lavado y selección.

Se realizó con la finalidad de retirar cualquier impureza capaz de alterar los resultados del experimento, en donde se empleó agua a temperatura ambiente para realizar un lavado constante de 2 a 3 minutos,

Secado.

El proceso de secado se realizó con el fin de tener un punto de partida para la materia prima con respecto a la humedad, así también del hecho de conservarla,

Este proceso se realizó con el empleo de un secador de bandejas, Programado a para trabajar a una temperatura de 60 °C, por 12 horas, para facilitar el proceso de triturado.

Triturado.

Se realizó un proceso de triturado para reducir y homogenizar el tamaño de las partículas, con el fin de que el hongo pueda fijarse rápidamente al sustrato y de esta manera colonizarlo por completo mientras se desarrolla, dejando únicamente las partículas de 2 mm aproximadamente.

Caracterización.

Se realizaron análisis fisicoquímicos (pH, humedad, materia seca, Azúcares reductores y cenizas) con el fin de conocer si se requiere una estandarización de la materia prima como es el caso de la humedad empleando los métodos antes descritos en la tabla 3.

Envasado.

Se envasó en bolsas transparentes de polietileno con 200 g de sustrato cada uno, se las selló y se procedió a almacenarlas en contenedores de espuma.

Esterilización.

Se sometió al sustrato a un proceso de esterilización en autoclave a 121°C y 1 atm durante 15 minutos.

Pesado del sustrato.

La masa del sustrato a emplear en cada bandeja fue de 75 g por cada repetición, para no sobrepasar del centímetro de altura en cuanto al sustrato según recomienda Villalpando (2010).

Hidratación de muestras.

La hidratación se la realizó mediante diferencia de pesos, tomando en cuenta la humedad inicial del sustrato, garantizando que todos los experimentos inicien con la humedad requerida y una vez dentro del biorreactor se mantiene constante inyectando aire húmedo cada vez que se requiera.

Inoculación.

Se Inoculó 1% m/m de biomasa según lo recomienda Villalpando (2010). Una vez inoculado el sustrato se procedió a repartirlo en las bandejas de los diferentes ambientes para comenzar con el proceso de fermentación.

Mezclado.

Se realizó el mezclado con el fin de homogenizar la muestra y de esta manera permitir que el proceso de fermentación sea uniforme.

Fermentación.

La etapa de fermentación consistió en controlar las variables de temperatura (25 °C, 35 °C y 45 °C) y humedad (40%, 60%, y 80%), en donde se procedió a tomar una muestra de cada replica cada 72 horas para determinar la actividad enzimática y la producción de esporas.

Para establecer el tiempo de finalización de la fermentación, es cuando alcanza la fase estacionaria según el conteo de esporas (medida de crecimiento) y se determinó cuando los valores obtenidos se mantuvieron constantes o disminuyen por 3 muestras consecutivas, seleccionando de los 3 valores la de menor tiempo, el cual indica limitación de nutrientes o cambio en la composición del medio, característico de esta fase.

El biorreactor utilizado en este punto permitió controlar los diferentes ambientes propuestos para el desarrollo del experimento, por lo cual antes de poner a incubar las unidades experimentales se procedió a estabilizar el equipo.

Filtrado.

Este proceso permitió la separación de sólidos de mayor tamaño (sustrato y biomasa) del sobrenadante, esto mediante un sistema de filtrado al vacío para posteriormente pasar al proceso de centrifugación.

Centrifugación 1 y 2.

Esta se realizó en dos etapas:

La etapa 1 se realizó a 4000 rpm durante 15 minutos a temperatura de 20 °C mientras que la etapa 2 se manejó por 20 minutos a 13500 rpm esto con el fin de provocar una lisis celular en esporas que pudiesen haber pasado la primera centrifugación, permitiendo de esta manera tener un extracto libre de impurezas.

Medición DNS.

Este consiste en un método colorimétrico para determinar la cantidad de azúcares reductores presentes en la muestra tras hacerlos reaccionar con el ácido 3, 5 Dinitrosalicílico, método que se empleó tanto para el análisis inicial de las muestras y para la mayor parte de los experimentos, en donde se obtuvo una curva de calibración que permitió determinar los azúcares presentes en cada etapa de la investigación.

Por tanto, para realizar la medición de los azúcares reductores presentes en la muestra se procedió a realizar una curva de calibración de glucosa, con el fin de estimar los valores de las muestras a emplear, dicha curva se presenta en la figura 1.

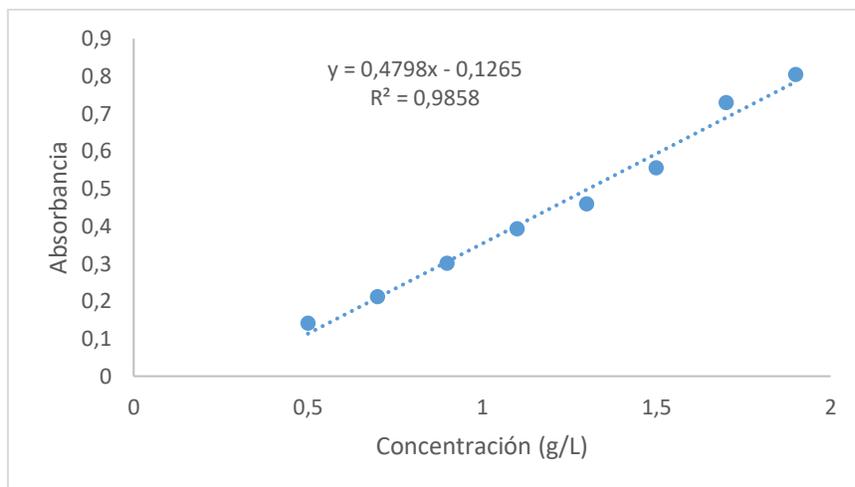


Figura 1. Curva de calibración de azúcares reductores

Según el método descrito por Miller (1959), la curva de calibración se realizó con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm, en donde se realizaron diluciones de glucosa (0.5 g/ml, 0.7 g/ml, 0.9 g/ml, 1.1 g/ml, 1.3 g/ml, 1.5 g/ml, 1.7 g/ml y 1.9 g/ml), cada una de estas fue llevada a tubos de ensayo en una concentración 50:50 con el reactivo DNS (250 μ L de muestras y 250 μ L de reactivo), posteriormente llevadas a ebullición durante 10 min y enfriadas inmediatamente hasta temperatura ambiente para finalmente colocar 1 ml de muestra en las cubetas del espectrofotómetro y proceder con la lectura, formando de esta manera la curva de calibración teniendo en cuenta la concentración (g/l) en el eje X y la absorbancia obtenida en el eje y.

Por último, se realizó un tratamiento previo a las muestras el cual consiste en hacer reaccionar la enzima con una solución de pectina al 1% (p/v) (250 μ L de muestras y 250 μ L de solución) con el fin de determinar el desdoblamiento de dicha sustancia, por tanto, se procedió a llevar esta mezcla a baño maría por 30 minutos a una temperatura de 45 °C una vez finalizado este proceso de desdoblamiento se procedió a colocar 500 μ L de reactivo DNS y se midió el valor de absorbancia, obteniendo la concentración a través de la curva obtenida con el patrón de glucosa.

CAPÍTULO IV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. CARACTERIZAR LOS DESECHOS DE CAFÉ MEDIANTE ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS.

La caracterización fisicoquímica de la materia prima (pulpa de café) permitió determinar la composición de esta con el fin de establecer un punto de partida en el proceso de fermentación con el hongo, esta se realizó después de haber sometido al material a un proceso de conservación por secado y un posterior envasado hasta que llegue al momento de estandarizarlo e inocularlo con el microorganismo.

El proceso se realizó por triplicado tomando las muestras del material (pulpa de café) de un proveedor único de manera aleatoria con el fin de que los resultados sean representativos y a su vez la estandarización de la materia prima sea sencilla de realizar.

Una vez adquirida y realizados los procesos de conservación que se le aplicó a la pulpa de café se procedió a realizar los análisis fisicoquímicos necesarios, con el fin de determinar si la materia prima es apta o se necesita de estandarización con el objetivo que todos los experimentos partan de las mismas condiciones.

4.1.1. ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS.

En la tabla 8 se puede visualizar los análisis proximales que se realizaron a las muestras permitiendo determinar el punto de partida del experimento, en donde se pudo evidenciar que la misma es apta para continuar con el proceso de obtención de las enzimas.

Tabla 8. Análisis fisicoquímicos de pulpa deshidratada.

	pH Adimensional	Humedad %	Materia seca %	Cenizas %	Azúcares reductores mg/ml
Promedio	4.39 ± 0.14	8.83 ± 1.34	91.17 ± 1.34	9.69 ± 0.23	0.40 ± 0.02

*Promedio ± desviación estándar

pH.

El valor obtenido de 4.39 ± 0.14 entra en la escala de ácido, se encuentra entre los valores reportados, donde se puede desarrollar el hongo y producción de las enzimas, según Villalpando (2010). Reportes de Fierro, Contreras, Gonzales, Rosas, & Morales (2018), afirman que el pH de la pulpa de café se encuentra a 4.21 esto es debido a la presencia de ácido de gálico, acético principalmente, otros estudios de Reyes & Solís (2019), reportan que un sustrato con pH superiores a 5.0 reflejan una disminución en la producción de pectinasas.

Humedad.

La humedad de la materia prima después del proceso de secado fue de $8.83 \pm 1.34\%$ esto con el objetivo de conservar el sustrato hasta el momento de ser empleado, según Ortiz, Anaya, Vizcarra, & Pineda (2019) mantiene niveles de humedad en la pulpa de café en valores de entre 5% y 8% mientras que Torres, Martínez, Serna, & Hernández (2019) recomiendan mantener la humedad de la misma por debajo del 14%.

Materia seca.

La materia seca después del proceso de deshidratación fue de $91.17 \pm 1.34\%$, esto permitió determinar las diferentes concentraciones de los agentes fijadores a emplear en el momento de la inoculación, pues estos fueron pesados en relación con la base seca del sustrato, siendo una técnica empleada por Villalpando (2010), para enriquecimiento del mismo. Reportes de Granda (2016), afirma que esta disminuye con forme avanza el proceso de fermentación, y hace empleo de una pulpa de café con 85.33% de materia seca, de esta manera la pulpa de café empleada en este experimento pudiera prolongar el proceso fermentativo.

Azúcares reductores.

La cantidad de azúcares reductores presentes en el sustrato fue de 0.40 ± 0.02 mg/ml, reportes de Fierro, Contreras, Gonzales, Rosas, & Morales (2018), afirman que la cantidad de azúcares reductores presentes en la pulpa de café es de 0.45 mg/ml aproximadamente, los cuales son propios de la fruta y depende del manejo del cultivo, este valor permite determinar un punto de partida para evitar errores en la lectura de los resultados obtenidos después del proceso fermentativo, es decir para evitar confundirlos con los azúcares reductores producidos por la acción enzimática.

Según reportes de Velásquez, Beltrán, Padilla, & Giraldo (2010), al existir una mayor cantidad de azúcares reductores en el sustrato existe mayor disponibilidad de fuente de carbono y hay una mayor obtención de metabolitos producidos por el *Aspergillus niger*, estos trabajaron con 3 niveles de azúcares reductores siendo su mejor tratamiento el mayor de 0.15 mg/ml, por tanto, al tener un valor mayor se tiene mayor disponibilidad de fuente de carbono y se podrían esperar mejores resultados en cuanto a crecimiento del hongo.

Ceniza.

Molina, Lechuga, & Bressani (1990), trabajaron con pulpa de café sometida a fermentación sólida con *Aspergillus niger*, en donde el nivel de ceniza fue de 5.97%, el cual es bajo en comparación al obtenido en este experimento ($9.69\% \pm 0.23$). Sin embargo, Granda (2016), quien obtuvo un 10,5%, afirma que mantener el sustrato en este nivel favorece al proceso fermentativo, por tanto, los niveles obtenidos son aceptables para su posterior empleo.

Por otro lado, estudios realizados con anterioridad por Tlachi, y otros (2007), establecieron que los niveles óptimos de ceniza para un buen proceso FES deben mantenerse en un margen de 7% a 8%, pues valores inferiores a este pueden causar deficiencia y un bajo desarrollo del microorganismo, por otro lado, reportes de Caridad & Ramos (2007) afirman que valores de ceniza por encima del 18% generan toxicidad en el sustrato y haciendo casi imposible el desarrollo de microorganismos.

4.2. DETERMINAR LOS PARÁMETROS DE TEMPERATURA Y HUMEDAD EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN SÓLIDA.

Se trabajó con diferentes niveles de temperatura y humedad, con el fin de determinar el mejor ambiente de actividad enzimática, cantidad de esporas y productividad total de ambas variables. A los valores obtenidos se determinó normalidad, análisis de varianza e interacción entre las variables.

4.2.1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

La actividad enzimática del extracto se obtuvo mediante la transformación de los azúcares reductores obtenidos en la muestra por un factor de conversión.

Análisis de varianza.

La actividad enzimática presentó una distribución normal representados en el anexo 2.

Los valores-P obtenidos en el análisis de varianza prueban la significancia estadística de cada uno de los factores (temperatura y humedad). Puesto que 3 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la actividad enzimática con un 95.0% de nivel de confianza, como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Análisis de Varianza para AE

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	F-value	p-value
Modelo	97.82	8	12.23	13.42	< 0.0001 *
A-Temperatura	25.78	2	12.89	14.15	0.0002
B-Humedad	41.53	2	20.76	22.80	< 0.0001
AB	30.51	4	7.63	8.38	0.0005
Error	16.40	18	0.9109		
Total	114.21	26			

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

Esto indica que tanto el factor temperatura con $p=0.0002$, humedad con $p=0.00001$ y su interacción con $p=0.005$ son significativos dentro del proceso fermentativo en cuanto a la producción de enzimas.

Los valores obtenidos de $R^2 = 0.86$ y ajustado $R^2 = 0.79$ determinando que la combinación de ambos factores puede ser replicados y obtener valores casi idénticos en un 79%.

Interacción entre temperatura y humedad para actividad enzimática.

En la figura 2 se encuentra la influencia de los factores relacionados y la diferencia entre las medias de cada tratamiento realizadas por la prueba de Tukey al 5%.

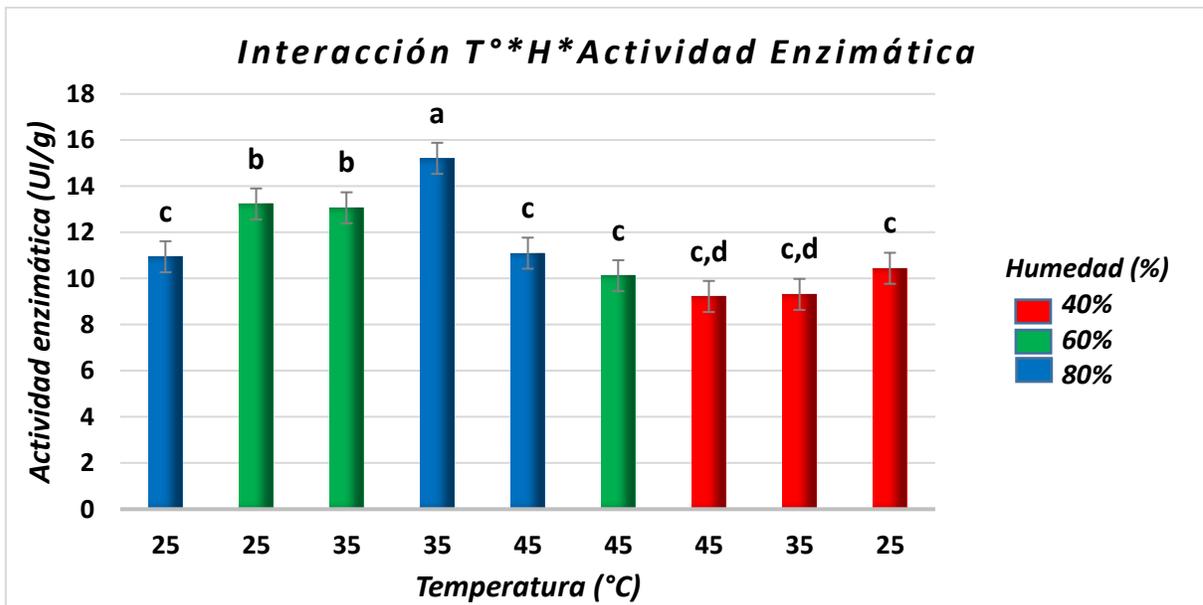


Figura 2. Interacción Temperatura*Humedad vs Actividad Enzimática

Se demuestra que a valores de temperatura de 35 °C y humedad de 80% correspondiente al tratamiento T4, la actividad enzimática alcanza el mayor valor de 15.21 UI/g, siendo diferente para el resto de tratamientos para un 95% de confianza.

Comparando con estudios de Rojas (2009), que realizó la extracción de este tipo de enzimas mediante fermentación semisólida, en donde el sustrato fue sumergido en un medio enriquecido para proceder con la fermentación y la temperatura que se empleó fue de 30 °C, obtuvieron valores de 10.26 UI/g. También Villapando, y colaboradores (2010), en un proceso FES, a temperatura de 30 °C y 75% de humedad en el sustrato, alcanzaron 14.96 UI/g, en los dos casos la actividad enzimática es menor a la obtenida en T4 (15.21 UI/g), lo que pudiera estar marcada por el contenido de humedad.

4.2.2. PRODUCTIVIDAD PARA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

Se obtuvieron los valores de productividad para la actividad enzimática y se realizaron los análisis estadísticos para determinar las mejores combinaciones entre tratamientos.

Análisis de varianza

Se puede evidenciar en el anexo 3 que los datos provienen de una distribución normal.

En la tabla 10 se encuentra el resultado del análisis de varianza correspondiente a la productividad, la cual muestra que existe diferencia significativa entre los datos, mediante los valores-P se ha comprobado la significancia estadística de cada uno de los factores.

Tabla 10. Análisis de Varianza para Productividad

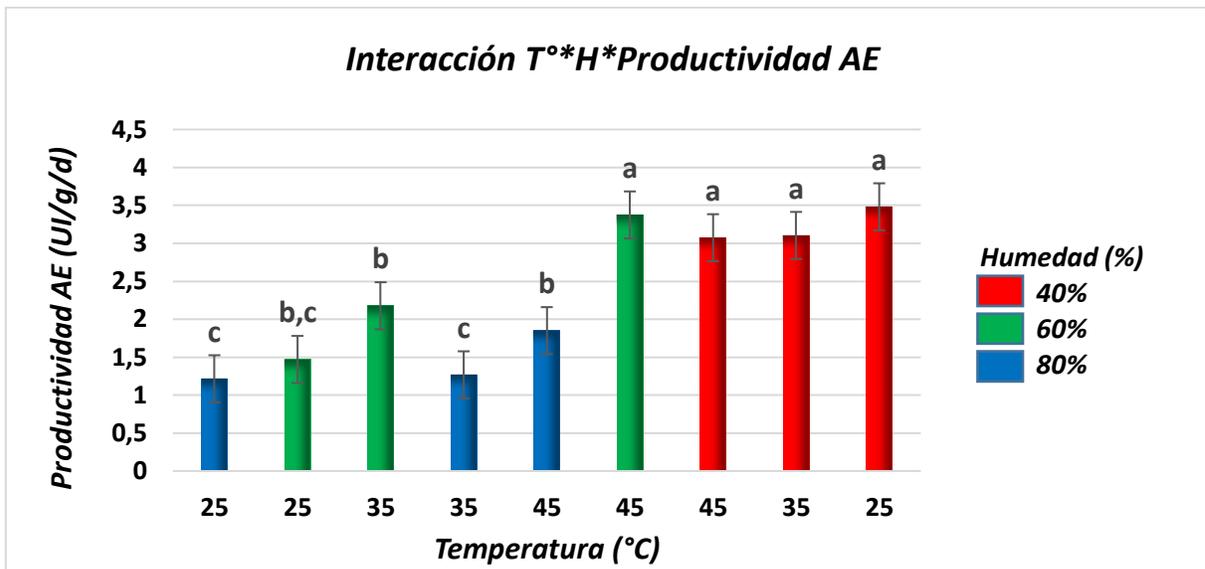
Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F-value	p-value
Modelo	20.79	8	2.60	70.96	< 0.0001 *
A-Temperatura	2.58	2	1.29	35.24	< 0.0001
B-Humedad	14.18	2	7.09	193.63	< 0.0001
AB	4.03	4	1.01	27.49	< 0.0001
Error	0.6591	18	0.0366		
Total	21.45	26			

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

Los factores estudiados tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la productividad con un 95.0% de nivel de confianza puesto que 3 valores-P son menores que 0.05. El valor de $R^2 = 0.96$ y a R^2 ajustado = 0.95 determinó que la combinación de ambos factores poder ser replicados y obtener valores casi idénticos en un 95%.

Interacción para la productividad.

En la figura 3 se encuentran los resultados obtenidos de productividad AE, para determinar diferencias entre tratamientos se realizó prueba de Tukey para un 95% de confianza, las diferencias entre tratamientos están representados con diferentes letras.



*AE: Actividad enzimática.

Figura 3. Interacción de la productividad para Temperatura vs Humedad.

La Prueba Tukey demostró que T6 (45 °C y 60% de humedad), T7 (45 °C y 40% de humedad), T8 (35 °C y 40% de humedad) y T9 (25 °C y 40% de humedad) son estadísticamente iguales para la variable productividad, se puede establecer estos como los mejores tratamientos donde se obtiene el valor más alto promedio de 3.481 UI/g*d. Comparando los resultados obtenidos en los ensayos realizados por Rojas (2009), y Villalpando (2010) quienes obtuvieron una productividad de 2.565 y 2.992 UI/g*d respectivamente, se puede afirmar que el control de los parámetros de temperatura y humedad permite obtener mejores resultados para la obtención actividad enzimática. 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.

4.2.3. FORMACIÓN DE ESPORAS.

Esta variable muestra cómo se desarrolla el microorganismo y define las fases de crecimiento durante el proceso FES. Se realizó una transformación de los valores a log (número de esporas) para los análisis estadísticos.

Análisis de varianza.

El análisis de normalidad de los datos de log (número de esporas) demostró que provienen de una distribución normal para el 95% de confianza como se muestra en el anexo 4.

Los valores-P obtenidos en el análisis de varianza prueban la significancia estadística de cada uno de los factores como se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11. Análisis de Varianza para el log de esporas

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F-value	p-value
Modelo	35.40	8	4.43	217.99	< 0.0001*
A-Temperatura	8.88	2	4.44	218.68	< 0.0001
B-Humedad	25.01	2	12.50	615.99	< 0.0001
AB	1.51	4	0.3786	18.65	< 0.0001
Error	0.3654	18	0.0203		
Total	35.77	26			

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

Los 3 valores-P son menores que 0.05, los que demuestra que los factores estudiados tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la formación de esporas (log (número de esporas)). Esto indica que tanto el factor Temperatura, Humedad, así como su interacción son determinantes dentro del proceso FES para la obtención de esporas.

Los valores obtenidos de $R^2 = 0.98$ y a R^2 ajustado =0.98 determinó que las combinaciones de ambos factores pueden ser replicados y obtener valores casi idénticos en un 98% cuando se realiza el respectivo control de los parámetros de fermentación.

Interacción para la formación de esporas.

Entre las interacciones de los factores presentadas en la figura 4 se encuentran los valores de log de esporas y la prueba de Tukey al 5% marcó las diferencias estadísticas entre tratamientos.

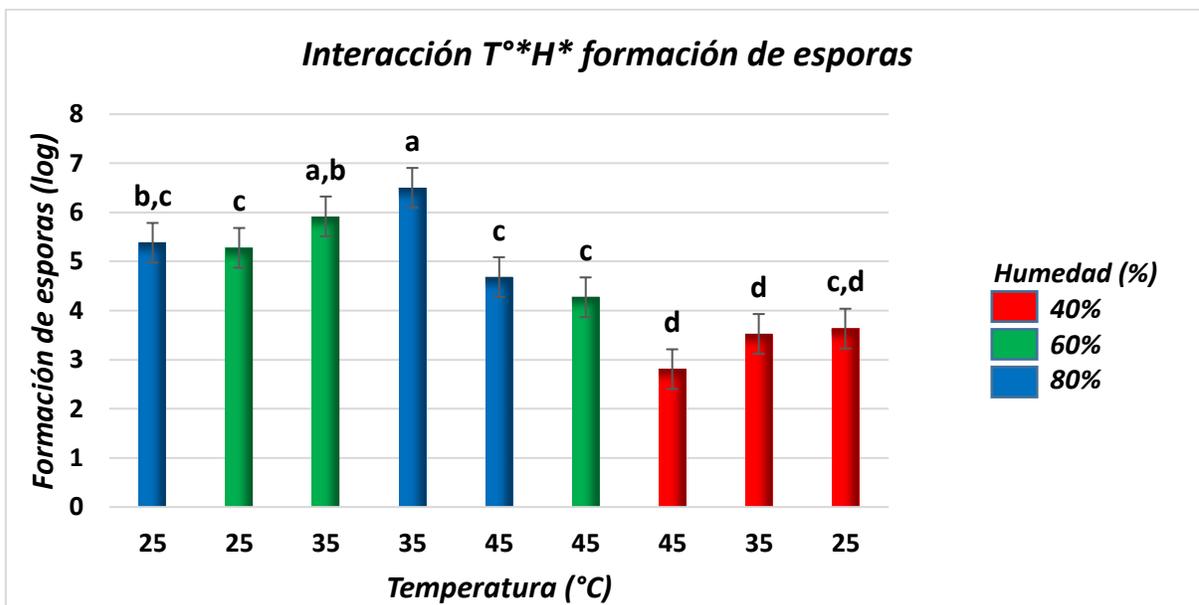


Figura 4. Interacción Temperatura * Humedad del crecimiento y log de esporas.

Se evidencia que el valor medio más alto alcanzado fue de log 6.511 esporas/g (T4) corresponde a temperaturas de 35 °C y humedad de 80%, sin embargo, también se puede apreciar que T3 (35 °C y humedad de 60%) es estadísticamente igual, con valor medio de log 5.92 esporas/g, lo que se puede asegurar que a temperatura de 35 °C y entre 60-80% de humedad en el sustrato se logra mayor formación de esporas.

Resultados similares lo obtuvo Chávez (2015), en donde presenta un log 6.39 esporas/g, trabajando a una temperatura de 35 °C, pero sin control de humedad, siendo este valor ligeramente superado por el obtenido en el tratamiento 4 de este estudio.

4.2.4. PRODUCTIVIDAD PARA LA FORMACIÓN DE ESPORAS.

Obtenido los valores de cantidad esporas anteriormente, se calculó la productividad conociendo que esta variable es de gran importancia para la industria ya que relaciona la cantidad que se produce en el tiempo.

Análisis de varianza.

En el anexo 5 se encuentra el comportamiento de los valores de productividad total los cuales presentaron una distribución normal.

En la tabla 12 se encuentran los resultados del análisis de varianza los cuales muestra que existe diferencia significativa entre los factores. Mediante los valores-P se ha comprobado la significancia estadística de cada uno, así como sus interacciones.

Tabla 12. Análisis de Varianza para Productividad del crecimiento logarítmico de esporas.

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F-value	p-value
Modelo	24.13	8	3.02	148.61	< 0.0001 *
A-Temperatura	6.42	2	3.21	158.08	< 0.0001
B-Humedad	16.60	2	8.30	408.89	< 0.0001
AB	1.12	4	0.2788	13.73	< 0.0001
Error	0.3654	18	0.0203		
Total	24.50	26			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual.

Los 3 valores-P son menores que 0.05, demostrado que las variables de temperatura, humedad y sus interacciones son influyentes dentro del proceso FES, teniendo un impacto significativo sobre la productividad con un 95.0% de confianza. En el valor de $R^2=0.98$ y a R^2 ajustado =0.97 determinando que la combinación de ambos factores poder ser replicados y obtener valores casi idénticos en un 97%.

Interacción para productividad de esporas.

En la figura 5 se muestran los resultados alcanzados para la variable de productividad de esporas, las cuales presentaron diferencias significativas en algunos de los tratamientos aplicados para un 95% de confianza.

Las letras diferentes representan estas diferencias notables en cuanto a la productividad de esporas con respecto a la formación de esporas del hongo *Aspergillus niger*, pues se puede apreciar que existen dos puntos altos diferentes estadísticamente del resto. Siendo estos T3 (35°C, 60% de humedad) y T4 (35 °C, 80% de humedad).

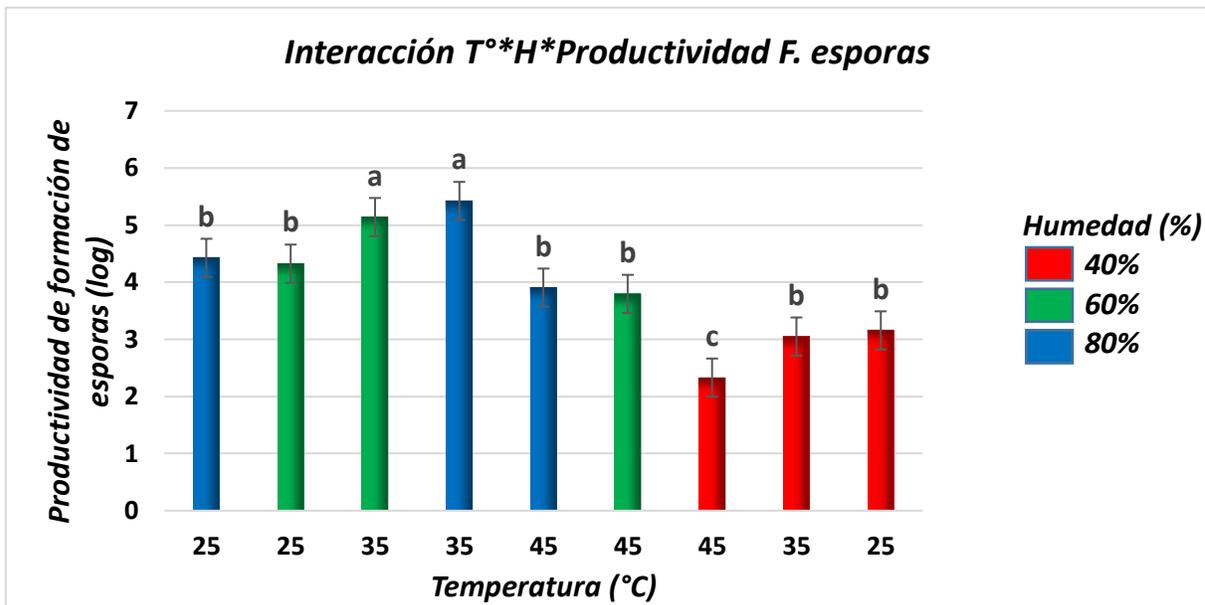


Figura 5. Interacción de la productividad del crecimiento logarítmico de esporas para Temperatura vs Humedad.

Los valores muestran que a temperaturas de 35 °C y humedad de 60% y 80%, se encontraron los mayores valores promedio de productividad con log 5,411 esporas/g*d y log 5.422 esporas/g*d de *Aspergillus niger*, las cuales corresponden a los tratamientos T3 y T4, estos son estadísticamente iguales.

Chávez (2015), obtuvo una productividad de log 5.252 esporas/g*d siendo este valor menor a los obtenidos en los tratamientos 3 y 4, la diferencia puede darse a que los autores antes mencionados utilizaron temperatura ambiente (25 °C) sin control de humedad y fermentación sumergida.

Teniendo en cuenta lo analizado en este objetivo se puede concluir parcialmente que la formación de esporas es inversamente proporcional a la actividad enzimática. Las dos variables respuestas son importantes para la industria, puesto que la formación de esporas corresponde a la reproducción del hongo teniendo en cuenta que es un antagónico dentro de la industria cafetera mientras que la actividad enzimática que es el objetivo de la presente investigación nos muestra la calidad de enzima.

4.3. OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES DEL PROCESO PARA MAXIMIZAR LA PRODUCTIVIDAD DE LAS ENZIMAS PECTINOLÍTICAS.

Teniendo en cuenta los valores reportados anteriormente, se procedió a la optimización de estas variables por métodos numéricos para obtener los máximos en la productividad, tanto de la actividad enzimática como la de cantidad de esporas

4.3.1. OPTIMIZACIÓN PARA LA PRODUCTIVIDAD DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

En la figura 6 se muestran los gráficos que reflejan el área explorada, donde la interacción entre los factores en estudio (temperatura y humedad) con la variable respuesta (Productividad EA) se puede definir el punto de mayor productividad.

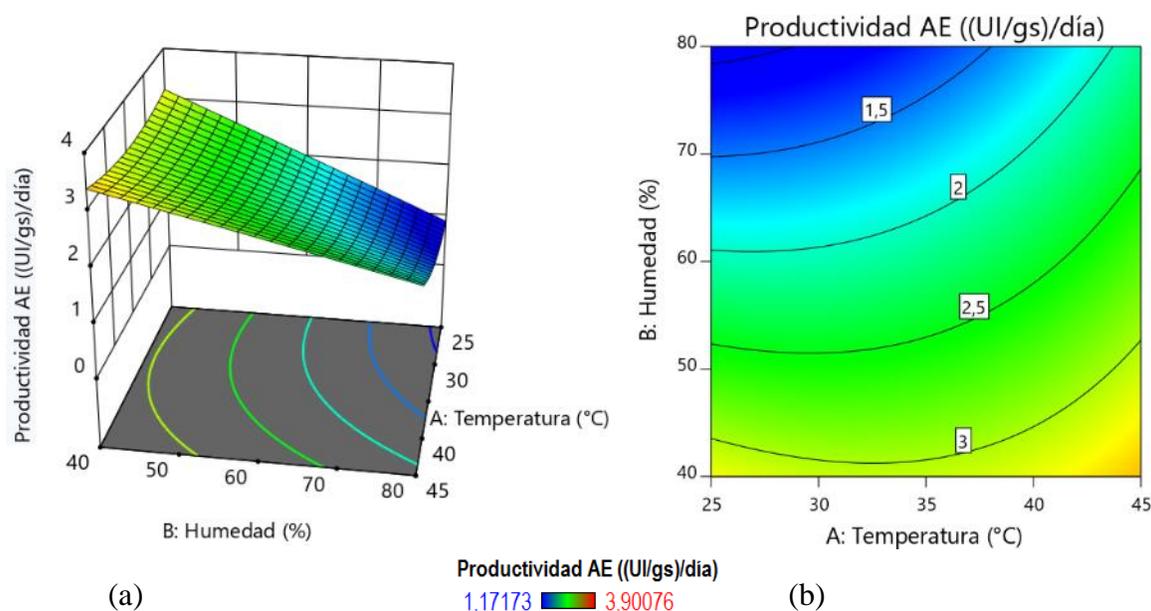


Figura 6. a) Superficie de respuesta estimada, b) gráfico de contorno.

Para la superficie estimada la Figura 6.a refleja un mínimo de productividad AE en uno de los extremos derechos (27 °C y 80% de humedad) mientras que el valor máximo queda a lado

izquierdo de la figura. Se puede establecer que, para la superficie evaluada, el valor máximo se encuentra en puntos de 25 °C y 40% de humedad y en la Figura 6.b en el gráfico de contornos se puede corroborar, donde las líneas de colores representan la productividad.

Taragano (2000), Chóez y Pilco (2020) realizaron estudios para la obtención de pectinasas en donde manejaron rangos de temperaturas de entre 25 y 30° C esto debido a que facilitaba la producción de este tipo de enzimas con una actividad enzimática alta, rango que se encuentra relacionado con el presente estudio.

Adicionalmente se obtuvo la ecuación 1 donde se podría estimar la productividad de la AE.

$$P (AE) = 2.19 + (0,3551 * T) - (0.8876 * H) + (0.2602 * T * H) + (0.2278 * T^2) - (0.0085 * H^2) \quad (1)$$

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

Una vez obtenido los valores predichos que arroja el modelo establecido respectivamente para la variable de respuesta, se pudo determinar la adecuación de dicho modelo mediante el análisis de residuos realizando una comparación entre los valores observados (reales) y predichos Figura 7.

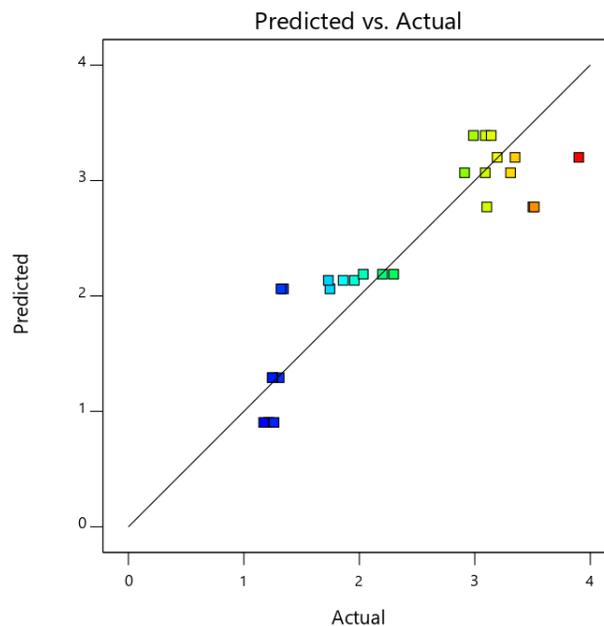


Figura 7. Valores predichos vs observado de productividad AE.

Esto permite determinar que el residual tiene una distribución normal y mantienen una varianza homogénea, lo que concuerda con la adecuación del modelo para un R^2 ajustado= 78%, asegurando que el modelo utilizado es adecuado.

4.3.2. OPTIMIZACIÓN PARA LA PRODUCTIVIDAD DE FORMACIÓN DE ESPORAS DEL *Aspergillus niger*.

Se tomó en cuenta la productividad del crecimiento (formación de esporas) del *Aspergillus niger*, aplicando a estos una regresión no lineal con el método de mínimos cuadrados obteniéndose de esta manera rangos en donde se encuentran las temperaturas y humedades que maximizan esta variable.

En la figura 8a se puede apreciar la superficie de respuesta tridimensional en donde se encuentran los puntos con los que se puede obtener mejores resultados a los obtenidos durante la ejecución de este experimento. De esta manera se llegó a obtener un $R^2=0.94\%$ y un R^2 ajustado=0.93% lo cual demuestra que la replicación de este es viable en un 93%.

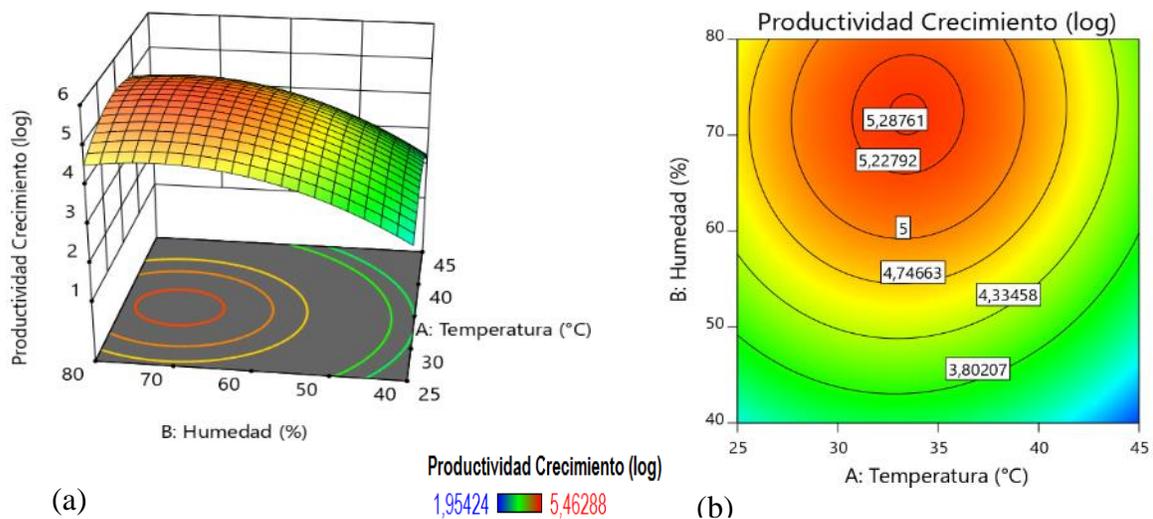


Figura 8. Valores óptimos de productividad de esporas a) Superficie de respuesta b) Contorno.

En la superficie de respuesta (figura 8a) se puede establecer un óptimo entre las interacciones para la productividad de esporas, identificándose de esta manera que entre los rangos de temperatura de 30 °C y 37 °C y humedades de entre 65% y 78% se pueden obtener valores máximos de log 5.5 esporas/g*d teniendo así un punto central en 32 °C y 72% aproximadamente según el gráfico de contorno (figura 8b).

Según reportes de Pozzo, Aschkar, Pellejero, Gil, & Roa (2008) la temperatura de desarrollo óptimo para las esporas del *Aspergillus niger* se encuentra en un rango de entre 30 °C y 37 °C y una humedad de entre el 50% y el 60%. Así también Pariente & Díaz (2007), asegura que la temperatura óptima para el crecimiento del hongo se encuentra a los 37 °C, mientras que Graü, Sánchez, Zerpa, & García (2007), afirman que la humedad óptima se encuentra alrededor del 70%, rangos que se asemejan a los obtenidos en este ensayo.

La ecuación 2 que describe el comportamiento de los datos para la maximización de la variable productividad de esporas.

$$P.L.E = 5.01 - (0.3128 * T) + (0.8698 * H) + (0.0763 * T * H) - (0.8811 * T^2) - (0.7053 * H^2) \quad (2)$$

*P.L. E= Productividad de logaritmo de formación de esporas.

Para el análisis de residuos se realizó una comparación entre los valores observados (reales) y predichos Figura 9.

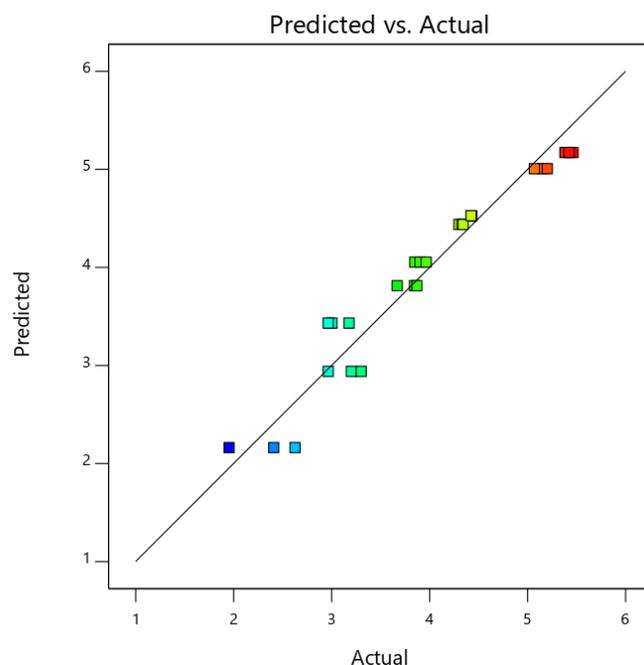


Figura 9. Valores de productividad de esporas.

Se estimó que el residual se distribuye con normalidad y mantienen una varianza homogénea, para un R^2 ajustado= 93%, lo que asegura que el modelo utilizado puede ser replicado.

Teniendo en cuenta lo anterior expuesto, se puede asegurar que la AE alcanza su punto máximo en las condiciones de estrés a las que el hongo fue sometido como mecanismo de defensa, pues según Larralde (2016), los microorganismos sujetos a condiciones estresantes de cultivo, principalmente en cuanto a presión osmótica, temperatura, pH o humedad desarrollan mecanismos para enfrentar estas situaciones, generando cambios fisiológicos, de composición y toda una gama de respuestas de su metabolismo.

Por otro lado, Cortés & Mosqueda (2013), afirman que existe una mayor producción de estos metabolitos cuando el hongo entra en su fase estacionaria es decir que su crecimiento es lento y sostenido así también que los niveles de los mismos aumentan cuando el microorganismo es sometido a situaciones de estrés nutricional o ambiental, como mecanismo de supervivencia.

Se da mayor relevancia a la AE debido a que este es un indicador de calidad de enzimas producidas, según afirma Vega (2011), ya que puede estar dado por la concentración de las mismas o su efectividad. También las enzimas pectinolíticas tienen un amplio empleo según la calidad de la misma, como aseguran Cortés & Mosqueda (2013).

CAPÍTULO V.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

5.1. CONCLUSIONES.

- La pulpa de café es un sustrato conveniente para el desarrollo de hongo *Aspergillus niger* y producción de metabolitos como enzimas ya que cuenta con elementos esenciales en forma de carbohidratos (azúcares reductores) y fibra (materia seca y cenizas).
- Los factores de temperatura y humedad del sustrato tienen influencia significativa favoreciendo el proceso de fermentación sólida, a temperaturas 25 °C y humedad de 40% para la actividad enzimática mientras que el hongo tiene un mayor desarrollo a temperatura de 35°C y humedades de entre 60% y 80%.
- Los puntos óptimos para la productividad de la actividad enzimática se encontraron en un extremo del rango estudiado, no siendo así para la formación de esporas, demostrado que la actividad enzimática no es asociada al crecimiento.
- La investigación experimental permitió generar una alternativa de valorización biológica hacia los residuos de café, para la producción del hongo *Aspergillus niger* y la generación de actividad enzimática de enzimas pectinolíticas, por lo que se acepta la hipótesis nula propuesta.

5.2. RECOMENDACIONES.

- Evaluar el comportamiento de la actividad enzimática de las enzimas a temperaturas menores a 25 °C y humedad inferiores de 40% para determinar si el obtenido es un máximo local o un máximo global.
- Realizar estudios de estabilidad de las enzimas obtenidas para futuros trabajos de escalado.
- Validar los datos obtenidos en la optimización.

BIBLIOGRAFÍA.

- Agudelo, J. M. (2012). *Aprovechamiento de los residuos sólidos provenientes del beneficio del café, en el municipio de Betania Antioquia: usos y aplicaciones*. Caldas Antioquia: Corporación Universitaria Lasallista.
- Aguilar, C. V. (2017). *Optimización de parámetros de fermentación de Aspergillus niger para la producción de glucoamilasas con aplicación en la clarificación de jugo de manzana*. Cuenca: Universidad de Cuenca.
- Arellano, J., Ilicht, S., Salazar, M., Rodríguez, I., Alarcón, W., & Gasco, F. (2014). Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad y estabilidad de pectinasas producidas por Bacillus spp. *REBIOL Vol 34, N°1*, 33-41.
- Arroyo, A. (2002). *Producción de enzimas pectinasas por actinomicetos en cultivo sumergido utilizando pectina cáscará de naranja*. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Asencio, J. D. (2019). *Análisis del sector cafetalero y su aporte a la economía ecuatoriana, periodo 2012 - 2016*. Guayaquil: Universidad de Guayaquil.
- Ávila, I., García, Y., Laureano, C., Sánchez, J., & Zamorano, D. (2020). *Protocolos de aislamiento de enzimas, protocolos para la caracterización de enzimas y métodos de espectroscopia óptica relacionados con la medición de la actividad enzimática*. Universidad Politécnica del Valle de México.
- Caridad, M., & Ramos, L. (2007). Fermentación en estado sólido (I). Producción de alimento animal. *Tecnología química Vol. XXVII, No. 3*, 17-22.
- Chávez, M. (2015). *Inactivación de esporas de Fusarium, Aspergillus, y sus metabolitos FB y AFB con solución electrolizada de superoxidación en semilla de jitomate (Solanum Lycopersicum)*. Nuevo León: Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Chóez, R. D., & Pilco, S. R. (2020). *Producción de poligalacturonasa por Aspergillus niger a partir de cascarilla de cacao CCN-51 en fermentación en estado sólido*. Guayaquil: Universidad de Guayaquil.

- Cordova, J., Roussos, S., & Gonzales, V. (1999). Influencia de la Temperatura en el desarrollo de hongos termófilos y termotolerantes. *VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería* (pág. 166). Huatulco, Oaxaca, México: Universidad de Guadalajara.
- Cortés, A., & Mosqueda, T. (2013). Una mirada a los organismos fúngicos: Fábricas versátiles de diversos metabolitos secundarios de interés biotecnológico. *Química Viva*, 64-90.
- Encalada, M., Fernández, P., Jumbo, N., & Quichimbo, A. (2017). Ensilaje de pulpa de café con la aplicación de aditivos en el catón Loja. *Bosque Latitud Cero Vol. 7, N°2*, 71-82.
- Felsing, E. (2002). *Productividad: Un Estudio de Caso en un Departamento de Siniestros*. Buenos Aires, Argentina: Universidad del CEMA.
- Fernandez, J. (2014). *Ingeniería de Procesos aplicada a la Biotecnología de Microalgas*. La Cañada, Almería, España: Universidad del Almería.
- Fernández, Y., Sotto, K. D., & Vargas, L. A. (2020). Impactos ambientales de la producción del café, y el aprovechamiento sustentable de los residuos generados. *Producción + Limpia Vol. 15 Núm. 1*, 93-110.
- Fierro, N., Contreras, A., Gonzales, O., Rosas, E., & Morales, V. (2018). Caracterización química y nutrimental de la pulpa de café (*Coffea arabica* L.). *Agroproductividad: Vol. 11, N° 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.
- García, A. M. (2016). *Marco conceptual sobre la influencia de la temperatura y la humedad relativa en la fermentación sólida del grano de café arábica sobre el contenido de ácido 5-0-Cafeoilquínico*. Medellín: Universidad Pontificia Bolivariana.
- García, M. (2015). *Evaluación de la actividad pectinesterasa y los cambios de las propiedades sensoriales en el jugo de manzana de la variedad Granny Smith*. Buenavista: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- García, N., & Cely, N. (2020). *Evaluación de la actividad enzimática de pectinasa obtenida de la pulpa de guanábana (*annona muricata* l.) y chirimoya (*annona cherimola* l.) y su*

- aplicación en la extracción de jugo*. Bogotá: Universidad Nacional Abierta y a Distancia.
- 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.
- Granda, D. (2016). *Estudio de la dinámica de fermentación de la pulpa de café con diferentes niveles de urea y suero de leche para uso en la alimentación de rumiantes en la provincia de Loja*. Loja: Universidad Nacional de Loja.
- Graü, C., Sánchez, D., Zerpa, A., & García, N. (2007). Influencia de la actividad de agua, pH y temperatura en el crecimiento de *Aspergillus penicillioides* y *A. terreus* aislados de la carne seca y salada de atún listado (*Katsuwonus pelamis*). *Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XVII, N° 2*, 193-199.
- Greice Sandri, I., & Moura da Silveira, M. (2018). Production and Application of Pectinases from *Aspergillus niger* Obtained in Solid State Cultivation. *Beverages*, 1-10.
- Hurtado, M., & Otálvaro, D. (2020). *Determinación de actividad pectinolítica en microbiota levaduriforme asociada a suelos y frutos del valle del Cauca*. Cali: Universidad Santiago de Cali.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización. (1979). NTE INEN 0401. *Conservas vegetales. Determinación de cenizas*. Quito, Provincia, Ecuador: Instituto Ecuatoriano de Normalización.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización. (1986). NTE INEN 0381. *Conservas vegetales. Determinación de acidez titulable. Método potenciométrico de referencia*. Quito, Pichincha, Ecuador: Instituto Ecuatoriano de Normalización.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización. (Enero de 1987). NTE INEN 1 513. *Determinación del contenido de humedad*. Ecuador: Instituto Ecuatoriano de Normalización.
- Jaen, A., Álvarez, N., Angulo, S., & Moreno, M. (1986). *Actividad enzimática del complejo celulítico producido por trichoderma reesei: Hidrólisis enzimática de la celulosa*. Madrid: Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas.

- Larralde, C. P. (2016). Respuestas metabólicas al estrés de levaduras de importancia industrial. *Investigación y Ciencia Vol. 24, N° 67*, 86-91.
- León, G., Cujilema, M., Baryolo, L., Rosero, E., Córdova, J., & Ramos, L. (2018). Determinación de la temperatura óptima para la producción de celulasas con *Aspergillus niger* en fermentación sólida. *Centro Azúcar Vol 45, No. 3*, 1-13.
- Lozano, A., & López, E. (2001). Endopoligalacturonasa y pectinesterasa de *Aspergillus niger*. *Revista colombiana de biotecnología Vol.III No.2* , 85-91.
- Luna, M., Lozada, Y., & Trigos, Á. (2010). *Aislamiento de cepas de Aspergillus niger, productoras de ocratoxina A, en café verde*. México: Universidad Veracruzana.
- Martínez, A. P. (2011). *Enzimas: una alternativa para remover rápida y eficazmente el mucílago del café*. Chichiná: Federación Nacional Cafeterá de Colombia.
- Miller, G. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Journal of Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- Molina, M., Lechuga, O., & Bressani, R. (1990). Valor nutritivo de la pulpa de café sometida a fermentación sólida usando *Aspergillus niger* en pollos y cerdos. *AGRONOMÍA MESOAMERICANA, VOLLUMEN 1*, 80-82.
- Murillo, S. M., Otárola, A., Torres, W. J., Rodríguez, J. H., & Buendía, H. (2018). *Efecto de la sustitución parcial de la harina de trigo por harina de pulpa de café (coffea arabica) en el color, textura y contenido de minerales en galletas dulces*. Chanchamayo: Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión.
- 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., Anaya, I., Vizcarra, M., & Pineda, T. (2019). *Estudio de la deshidratación de la pulpa de café en un equipo de lecho fluidizado*. Ciudad de México: Escuela Nacional De Ciencias Biológicas.

- Paladines, S. P. (2020). *Proyecto de factibilidad para la implementación de una empresa de compra de café tostado y molido en la ciudad de Loja y su comercialización en la ciudad de Cuenca*. Loja: Universidad de Loja.
- Pariante, M., & Díaz, M. (2007). *Aspergillus y aspeergiliosis*.
- Parzanese, M. (2016). Fermentación en sustrato sólido: Aprovechamiento de subproductos de la agroindustria. *Tecnologías para la industria de alimentos, Ficha N° 27*, 1-13.
- Pastrana, L. (1996). Fundamento de la fermentación en estado sólido y aplicación a la industria alimentaria. *Ciencia y tecnología alimentaria, Vol. 1 N°3*, 4-12.
- Pozzo, M., Aschkar, G., Pellejero, G., Gil, M., & Roa, R. (2008). Efecto de temperatura, humedad relativa y fisiología de bulbos cultivares de cebolla (*Allium cepa*) en la incidencia de *Aspergillus niger* en el Valle Inferior del Río Negro, Argentina. *Revista Pilquen, Sección Agronomía , Año X, N° 9*, 1-14.
- Prieto, G. A., & Torres, Y. (2020). *Desarrollo de un proceso de fermentación en estado sólido (SSF) para la obtención de proteínas durante la valorización de residuos orgánicos en biorreactores a escala laboratorio*. Bogotá: Universidad Cooperativa de Colombia.
- Rajkumar, R., & Giorgio, G. (2005). *Posibles usos alternativos de los residuos y subproductos del café*. Italia: Universidad de Trieste.
- Ramírez, J. R. (2014). Enzimas: ¿Qué son y cómo funcionan? *RDU*, 1-13.
- Ramos, R., & Meza, V. (2017). Concentración de esporas de hongos por factores meteorológicos en Lima. *Ecología Aplicada Vol 16, N° 2*, 143-149.
- 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.
- Reyes, N., & Solís, S. (2019). Efecto del pH y temperatura en células inmovilizadas de *Aspergillus HL* productoras de pectinasas. *XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería* (pág. 1). Mérida: Instituto Tecnológico de Mérida.

- Robinson , T., Singh, D., & Nigam, P. (2002). Fermentación en estado sólido: Una tecnología microbiana promisoría para la producción de metabolitos secundarios. *VITAE*, 27-36.
- Rodríguez, O., & Serrat, M. (2008). Poligalacturonasas de levaduras: un producto biotecnológico de grandes potencialidades. *Tecnología Química Vol. XXVIII, No. 1*, 80-90.
- Rojas Muñoz, V. R. (2009). *Evaluación de métodos de extracción y purificación de enzimas pectinolíticas obtenidas por fermentación en estado semisólida del Aspegillus niger*. Medellín: Universidad EAFIT.
- Román, M. (2020). *Efecto clarificante de las enzimas pectinasas extraídas de la guayaba (Psidium guajava L.) en el jugo de tamarindo (Tamarindus indica L.)*. Milagro: Universidad Agraria del Ecuador.
- Romero, C. A. (2020). *Observatorio de Commodities: Café*. Lima: Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI).
- Romero, S., Fernández, A., & Costas, M. (2018). Estabilidad termodinámica de proteínas. *Educación química Vol. 29, N°3*, 3-17.
- Sadkaoui, A. (2017). *Influencia de las características del fruto y las condiciones de la preparación de la pasta , en el rendimiento del proceso de extracción del aceite de oliva virgen*. Universidad de Jaén.
- Salazar, I., Ramírez, H., Zuñiga, A., Yllanes, M., Naquiche, A., Castillo, D., & Castellanos, R. (2020). Selección e identificación de una nueva bacteria productora de pectinasa a partir de fuentes geotermales. *Ciencia y Desarrollo, N°27*, 143-149.
- Salazar, L. A., Hinojoza, M. M., Acosta, M. P., Escobar, A., & Scrich, A. J. (2020). Caracterización, clasificación y usos de las enzimas lipasas en la producción industrial. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 1-16.
- Sánchez, A. M., Vayas, T., Mayorga, F., & Freire, C. (2020). *Sector cafetero Ecuatoriano*. Ambato: Universidad Técnica de Ambato.

- 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.
- Soreano, M. (2004). *Análisis de sistemas pectinolíticos bacterianos*. Barcelona: Universidad de Barcelona.
- Taragano, V. (2000). *Pectinasas fúngicas : estudios comparativos de producción por fermentación sumergida y en sustrato sólido y estabilidad en sistemas deshidratados*. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires.
- Tlachi, C., Soto, A., Meneses, M., Loera, O., Montalvo, C., & Ramírez, E. (2007). *Evaluación de las características del fermentado de paja de cebada y raicilla obtenido por fermentación sólida (FES) con el hongo Pleurotus sapidus*. Puebla: Universidad Politécnica Puebla.
- Torres, L., Martínez, K., Serna, J., & Hernández, M. (2018). Secado de Pulpa de Café: Condiciones de Proceso, Modelación Matemática y Efecto sobre Propiedades Fisicoquímicas. *Información tecnológica Vol.30 no.2*, 718-764.
- Torres, L., Martínez, K., Serna, J., & Hernández, M. (2019). Secado de Pulpa de Café: Condiciones de Proceso, Modelación Matemática y Efecto sobre Propiedades Fisicoquímicas. *Inf. tecnol. vol.30 no.2*, 718-764.
- Trejo Hernandez, M. R. (1991). Producción de pectinasa de *Aspergillus niger* por fermentación sólida sobre soporte. *MICOL NELTROP*, 50-60.
- Ubalde , M., Villadóniga, C., Giacomini, C., & Grazú, V. (2002). *Generalidad de enzimas*.
- Vega, A. (2011). *Aplicaciones enzimáticas en procesos de conservación y restauración de obras de arte. Consolidación de celulosa*. Biscay: Universidad del País Vasco.
- Velásquez, J., Beltrán, 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. *Revista Tumbaga*, 135-147.
- Venegas, S., Orellana, D., & Pérez, P. (2018). La realidad Ecuatoriana en la producción de café. *Mundo de la Investigación y el Conocimiento Vol. 2, N°2*, 72-91.

Villalpando, J., Jaubert, S., Cordova, J., Ibarra, D., Amaya, L., Mateos, J. C., . . . Herrera, E. (2010). *Producción de pectinasas por fermentación en estado sólido utilizando residuos agroindustriales*. Huatulco: Universidad Autónoma de Nayarit.

Weather Spark. (2020). *Weather Spark*. Obtenido de <https://es.weatherspark.com/y/20035/Clima-promedio-en-Ibarra-Ecuador-durante-todo-el-a%C3%B1o>

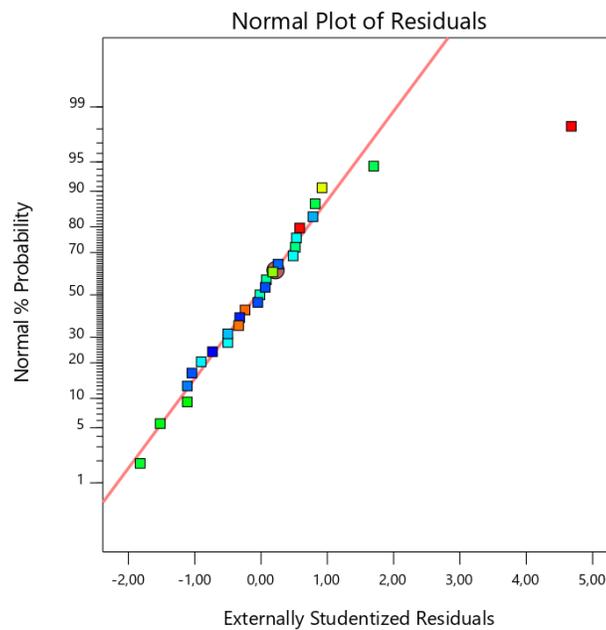
Yépez, T. (2019). *Aprovechamiento de residuos vegetales de mercado en la producción de trichoderma ssp. para uso comercial*. Ibarra: Universidad Técnica del Norte.

ANEXOS.

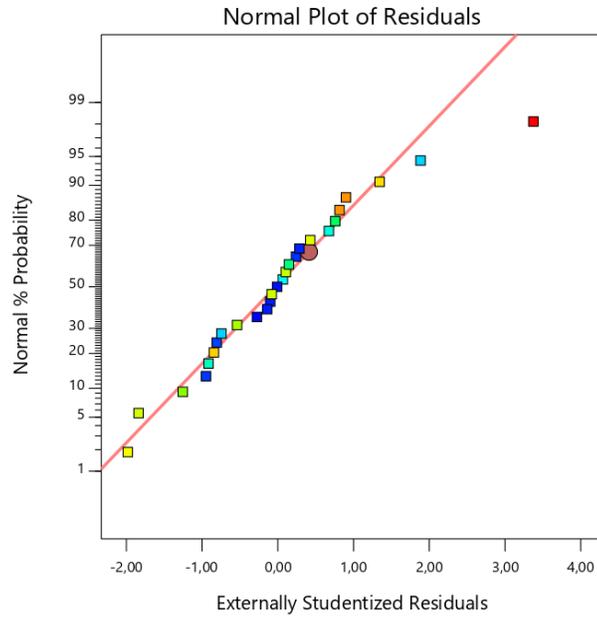
Anexo 1: Fórmula para cámara de conteo

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

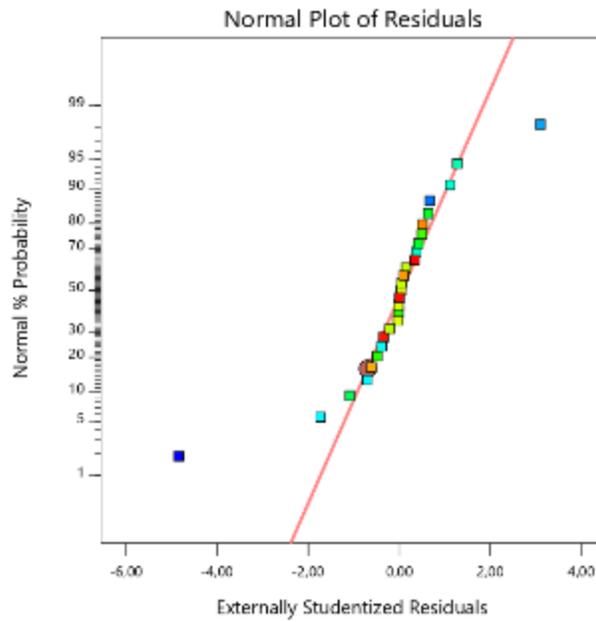
Anexo 2: Normalidad para la actividad enzimática (AE).



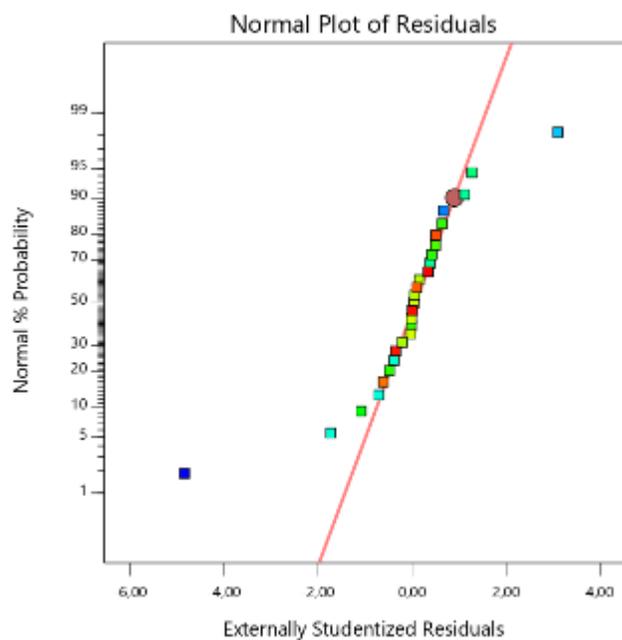
Anexo 3: Normalidad para la productividad de la actividad enzimática.



Anexo 4: Normalidad para formación de esporas.



Anexo 5: Normalidad para la productividad de formación de esporas



Anexo 6: Proceso de obtención de pectinasas

		
<p>Fotografía 1 Secado</p>	<p>Fotografía 2 Trituración</p>	<p>Fotografía 3 Tamizaje</p>

		
<p>Fotografía 4 Caracterización</p>	<p>Fotografía 5 Pesaje</p>	<p>Fotografía 6 Envasado</p>
		
<p>Fotografía 7 Inoculación</p>	<p>Fotografía 8 <i>Aspergillus niger</i></p>	<p>Fotografía 9 Placa colonizada</p>
		
<p>Fotografía 10 Mezclado</p>	<p>Fotografía 11 Biorreactores (fermentación)</p>	<p>Fotografía 12 Cámara de conteo</p>
		

<p>Fotografía 13 Conteo</p>	<p>Fotografía 14 Filtrado</p>	<p>Fotografía 15 Centrifugación 1° etapa</p>
		
<p>Fotografía 16 Centrifugación 2° etapa</p>	<p>Fotografía 17 Muestras con Reactivo DNS</p>	<p>Fotografía 18 Extracto enzimático</p>