



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

**“PRODUCCIÓN DE UN CRUDO ENZIMÁTICO (CELULASA,
XILANASA) POR *Aspergillus niger* VAN TIEGHEM (ATCC® 6275™),
UTILIZANDO RESIDUOS AGROINDUSTRIALES”**

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Presentado para optar el grado académico de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTOR: CENTENO SÁNCHEZ CRISTIAN IVÁN

TUTOR: ING. BYRON DÍAZ MONROY, PhD

Riobamba–Ecuador

2018

©2018, Cristian Iván Centeno Sánchez.

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

El Tribunal de Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: “Producción de un crudo enzimático (Celulasa, Xilanasa) por *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™), utilizando residuos agroindustriales”, de responsabilidad del señor Cristian Iván Centeno Sánchez, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

ING. BYRON DÍAZ, PhD.

DIRECTOR DE TRABAJO

DE TITULACIÓN

DRA. IRENE GAVILANEZ.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

“Yo, **Cristian Iván Centeno Sánchez**, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este trabajo de titulación y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación y el patrimonio intelectual del Trabajo de Grado pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO”

Riobamba, 7 de febrero del 2018.

Cristian Iván Centeno Sánchez

060409499-5

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación está dedicado primero a Dios, por darme la oportunidad de alcanzar un logro más en mi vida, también a mis padres Luis Centeno, Nancy Sánchez y padrinos Ernesto Machado, Gladys Domínguez, por ser incondicionales y brindarme su apoyo sincero durante todo el trayecto de mi vida de igual manera a mis hermanas que me apoyaron en todo momento. A mis amigos, profesores que me estuvieron ahí durante mi formación académica.

Cristian.

AGRADECIMIENTO

Un agradecimiento personal a la persona que me dio la oportunidad de realizar conjuntamente con la su tesis doctoral, Ing. Raúl Guapi por su apoyo y confianza durante la investigación.

Quiero agradecer a los laboratorios de Biotecnología y Microbiología Ambiental LABIMA, Facultad de Ciencias Pecuarias, laboratorio de Biotecnología, laboratorio de Análisis Instrumental de la Facultad de Ciencias y laboratorio de suelos de la Facultad de Recursos Naturales.

Además, agradezco a las personas que directamente e indirectamente me colaboraron durante la investigación e hicieron posible este gran proyecto de investigación.

Dr. Byron Diaz

Ing. Paola Chiluiza

Ing. Carla Haro

Lic. Fausto Tapia

Ing. Rafaela Pacurucu

Cristian.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

FES	Fermentación Estado Sólido
CMC	Carboximetil Celulasa
Fpasa	Papel filtro
DNS	Acido Di- Nitro Salicilico

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	xvii
ABSTRACT	xviii
INTRODUCCIÓN	1

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO	4
Antecedentes de la Investigación	4
1.1. Biotecnología	5
1.2. Hongos productores de enzimas	5
1.2.1. Hongos filamentosos	8
1.2.1.1. Aspergillus	8
1.2.1.1.1. <i>Aspergillus niger</i>	8
1.3. Enzimas	9
1.3.1. Definición	9
1.3.2. Mecanismo de acción de las enzimas	10
1.3.2.1. Energía de activación	10
1.3.2.2. El catalizador.....	10
1.3.2.3. Reacciones enzimáticas.....	11
1.3.2.4. La constante de equilibrio	11
1.3.3. Clasificación de las enzimas	12
1.3.4. Enzimas lignocelulolíticas	13
1.3.4.1. Celulasas	13
1.3.4.2. Xilanasas	14
1.4. Factores que afectan la producción de enzimas	15
1.4.1. Sustrato	15
1.4.2. Tamaño de partícula	16
1.4.3. Humedad y actividad del agua	16
1.4.4. pH	16
1.4.5. Temperatura	17

1.5. Residuos agroindustriales en el Ecuador	18
1.5.1. Afrecho cervecero	18
1.5.1.1. Características	18
1.5.2. Salvado de trigo	19
1.5.2.1. Características	19
1.5.3. Salvado de soya	19
1.5.3.1. Características	20
1.6. Aplicación tecnológica	21
1.6.1. Celulasas	21
1.6.2. Xilanasas	22

CAPITULO II

2. METODOLOGÍA	24
2.1. Tipo y Diseño de investigación	24
2.2. Unidad de análisis	25
2.3. Tamaño de la muestra	25
2.4. Selección de la muestra	25
2.5. Técnicas de recolección de datos	25
2.5.1. Evaluación bioquímica	25
2.5.2. Evaluación microbiológica	25
2.6. Procedimiento experimental	26
2.6.1. Equipos de laboratorio	26
2.6.1. Microorganismo	28
2.6.2. Activación de la cepa Aspergillus niger van Tieghem (ATCC® 6275™)	28
2.6.2.1. Procedimiento para microorganismos KWIK-STIK™ y KWIK-STIK Plus™	29
2.6.3. Preparación del medio de cultivo y siembra de la cepa Aspergillus niger	30
2.6.4. Preparación del inóculo y conteo en cámara de Newbauer	30
2.6.5. Pretratamiento del sustrato en medio ácido	31
2.6.6. Determinación de Humedad del sustrato	32
2.6.7. Crecimiento de A. niger van Tieghem (ATCC® 6275™) sobre residuos agroindustriales.	32
2.6.8. Obtención del extracto enzimático crudo	34
2.6.9. Determinación del mejor sustrato y del efecto del tiempo de incubación para la FES	34

2.6.9.1. Determinación de la actividad sobre papel filtro.....	35
2.9.1.1. Cálculo de las UPF de la solución enzimática:	36
2.6.9.2. Determinación de la actividad sobre CMC	37
2.9.2.1. El cálculo de la actividad en la solución de enzima problema se realizan según se detalla a continuación:.....	38
2.6.9.3. Determinación de la actividad sobre xilanasas	38
2.6.9.4. Determinación de proteína	39
2.7.Determinación de Coliformes en extracto enzimático.....	40

CAPITULO III

3. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	42
3.1. Evaluación de los residuos agroindustriales abundantes y de bajo costo como sustratos para la producción de un crudo enzimático utilizando una cepa de <i>Aspergillus niger</i> van Tieghem (ATCC® 6275™).....	42
3.2. Caracterización del proceso de fermentación extractiva de <i>Aspergillus niger</i> van Tieghem (ATCC® 6275™) aplicando indicadores bioquímicos y microbiológicos.	43
3.2.1. Determinación de concentración de las enzimas Celulasas, Xilanasas por <i>Aspergillus niger</i> van Tieghem (ATCC 6275) y proteínas.	43
3.2.1. Proteínas	43
3.2.1.1. Curva de calibración	43
3.2.1.2. Datos de la concentración de proteínas bajo FES de <i>A. niger</i>	43
3.2.2. Celulasas	45
3.2.2.1. Endoglucanasa.....	45
3.2.2.1.1. Curva de calibración	45
3.2.2.1.2.Datos de la concentración de endoglucanasa bajo FES de <i>A. niger</i> van Tieghem (ATCC® 6275™)	45
3.2.2.2. Exoglucanasas	46
3.2.2.2.1. Curva de calibración	46
3.2.2.2.2. Datos de la concentración de exoglucanasa bajo FES de <i>Aspergillus niger</i> van Tieghem (ATCC® 6275™)	47
3.2.3. Xilanasas.....	48
3.2.3.1. Curva de calibración	48
3.2.3.2. Datos de la concentración de exoglucanasas bajo FES de <i>A. niger</i> van Tieghem (ATCC® 6275™)	49
3.3. Determinación de los costos y aplicaciones de los productos de esta tecnología.	50
3.3.1. Relación Beneficio/Costo	50

CONCLUSIONES.....	53
RECOMENDACIONES.....	54
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Aplicaciones de enzimas en alimentos.....	6 – 7
Tabla 2-1:	Clasificación de las enzimas según el mecanismo de reacción.....	12
Tabla 3-1:	Composición nutricional del afrecho seco de cervecería.....	18
Tabla 4-1:	Componentes del salvado de trigo.....	19
Tabla 5-1:	Componentes del salvado de soya.....	20
Tabla 1-2:	Esquema para la determinación del mejor sustrato y tiempo óptimo....	24
Tabla 2-2:	Suplemento de nutrientes.....	33
Tabla 3-2:	Actividad sobre papel filtro.....	35
Tabla 4-2:	Actividad sobre CMC.....	36
Tabla 5-2:	Preparación de la curva de calibración	39
Tabla 6-2:	Protocolo tipo para la cuantificación de proteínas por el método de Biuret.....	40
Tabla 1-3:	Resultados de pH y fibra de los residuos agroindustriales.....	42
Tabla 2-3:	Curva de calibración para la cuantificación de proteínas.....	43
Tabla 3-3:	Evolución en el tiempo de la producción de proteínas bajo FES de <i>A. niger</i> ATCC 6275 en diferentes fuentes de carbono.....	44
Tabla 4-3:	Curva de calibración para la cuantificación de endoglucanasas.....	45
Tabla 5-3:	Evolución en el tiempo de producción de endoglucanasa bajo FES de <i>A. niger</i> ATCC 6275 en diferentes fuentes de carbono.....	45
Tabla 6-3:	Curva de calibración para la cuantificación de exoglucanasa.....	46
Tabla 7-3:	Evolución en el tiempo de la producción exoglucanasa bajo FES de <i>A. niger</i> ATCC 6275 en diferentes fuentes de carbono.....	47
Tabla 8-3:	Curva de calibración para la cuantificación de xilanasa.....	48
Tabla 9-3:	Evolución en el tiempo de la producción xilanasa bajo SSF de <i>A. niger</i> ATCC 6275 en diferentes fuentes de carbono.....	49
Tabla10-3:	Análisis económico mediante el indicador beneficio costo de la obtención del crudo enzimático por <i>Aspergillus niger</i> ATCC 6275	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1:	Mecanismo de reacción enzimática.....	10
Figura 2-1:	Reacción química de las enzimas.....	11
Figura 3-1:	Mecanismo de reacción enzimática.....	14
Figura 4-1:	Representación esquemática de la molécula de xilano.....	15
Figura 5-1:	Efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de una reacción enzimática.....	15
Figura 6-1:	Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática en una enzima típica humana y una bacteria termófila.....	17
Figura 1-3:	Gráfico de la evolución en el tiempo de la producción de proteínas bajo FES de <i>A. niger</i> ATCC 6275 en diferentes fuentes de carbono.	44
Figura 2-3:	Grafico de la evolución en el tiempo de la producción endoglucanasas bajo FES de <i>A. niger</i> ATCC 6275 en diferentes fuentes de carbono.....	46
Figura 3-3:	Gráfico de la evolución en el tiempo de la producción exoglucanasa bajo FES de <i>A. niger</i> ATCC 6275 en diferentes fuentes de carbono..	47
Figura 4-3:	Grafico de la evolución en el tiempo de la producción xilanasa bajo SSF de <i>A. niger</i> ATCC 6275 en diferentes fuentes de carbono.....	49

INDICE DE ECUACIONES

Ecuación N° 1-2	Fórmula para la determinación de esporas por ml. ...	31
Ecuación N° 2-2	Determinación de la humedad.....	32
Ecuación N° 3-2	Determinación de las UPF.....	36
Ecuación N° 4-2	Determinación de CMC.....	38

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A** Protocolo para la obtención del crudo enzimático.
- ANEXO B** Procedimiento para la obtención del crudo enzimático.

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1-2:	<i>Aspergillus niger</i> (ATCC® 6275™).....	28
Fotografía 2-2:	Activación de <i>Aspergillus niger</i> (ATCC® 6275™).....	29
Fotografía 3-2:	Propagación de <i>Aspergillus niger</i> (ATCC® 6275™).....	30
Fotografía 4-2:	Preparación del inóculo de <i>Aspergillus niger</i> (ATCC® 6275™)....	31
Fotografía 5-2:	Lavado de los sustratos.....	31
Fotografía 6-2:	Pesaje para la determinación de humedad.....	32
Fotografía 7-2:	Crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> (ATCC® 6275™) sobre residuos agroindustriales.....	33
Fotografía 8-2:	Centrifugación del crudo enzimático.....	34
Fotografía 9-2:	Determinación de la actividad de celulasa sobre el papel filtro.....	36
Fotografía 9-2:	Determinación de la actividad de CMC.....	38
Fotografía10-2:	Determinación de presencia de coliformes totales, E. coli.....	41

RESUMEN

En la presente investigación se evaluó la producción de un crudo enzimático (celulasa, xilanas) por *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™), utilizando tres residuos agroindustriales: salvado de trigo, salvado de soya y afrecho cervecero, mediante fermentación en estado sólido (FES). Los tres residuos agroindustriales tuvieron un tamaño de partícula de 0.05mm, los dos primeros se sometieron a un pre tratamiento ácido con H₂SO₄, en tanto que el afrecho cervecero al pasar por un proceso de malteado no necesitó de un pre tratamiento químico. Posteriormente se les añadió un suplemento de nutrientes para generar mayor producción de enzimas extracelulares. Entonces se inóculo una concentración de 6,49x10⁹ esporas.ml⁻¹ de *A. niger* a cada sustrato evaluando a las 72, 120, 168, 216 horas de fermentación, utilizaron 3 repeticiones, los sustratos fueron incubados a una temperatura de 27 °C con una humedad del 80%. Los residuos agroindustriales más el suplemento de nutriente, favorecieron el crecimiento y producción enzimas (celulasa, xilanas) por *A. niger*, el mejor sustrato resultó el Afrecho cervecero. Los grupos de celulosas analizadas fueron: Endoglucanasa con un tiempo de 216 h de incubación se obtuvo una concentración de 2,843 UI.ml⁻¹, para su determinación se usó el método de Carboximetil Celulosa, por otro lado también se determinó la exoglucanasa obteniendo una concentración máxima de 6.103 UI.ml⁻¹ a un tiempo de incubación de 120 h, esta enzima en cambio fue analizada por el método de Papel Filtro. También se obtuvo la concentración de xilanas siendo 7.570 mg/ml en el lapso de 72 h de incubación.

Palabras clave: <BIOTECNOLOGIA>, <MICROBIOLOGÍA>, <HONGO (*Aspergillus niger*)>, <CRUDO ENZIMÁTICO>, <FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO>, <EXOGLUCANASA>, <ENDOGLUCANASA>.

ABSTRACT

In the current research was evaluated the production of an enzymatic crude (cellulase, xylanase) by *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™) using three agro industrial residues; wheat bran, soy bran and brewing draff, through fermentation in a solid state (FES). The three-agro industrial residuess had a particle size of 0.05mm, the both first was submitted to an acid pre-treatment with H₂SO₄, while the brewing draff to pass by a malting process did not need of a chemical pre-treatment. Later a supplement was added a nutrients supplement in order to generate greater extra cells enzymes. Then it was inoculated a concentration of $6,49 \times 10^9$ spores.ml⁻¹ of *A. niger* to each substrate, evaluating to the 72,120,168, 216 hours of fermentation, 3 repetitions were used, the substrates were incubated to a temperature of 27°C with a humidity of 80 % . The agro industrial residues more the nutrient supplement favoured the growth and the production of enzymes (cellulase, xylanase) by *A. niger* the best substrate was the brewing bran. The cellulase groups analysed were Endoglucanase with a time of 216 h incubation, was obtained a concentration of 2,843 UI.ml⁻¹, for its determination was used the method of Carboxymethyl Cellulase, on the other hand, exuglucanase was also determined to obtain a maximum concentration of 6103 UI.ml⁻¹, an incubation time of 120 h, this enzyme was analysed by the filter paper method and also the concentration of xylanase was obtained, being 7,570 mg/ml within 72 h of incubation.

Key Words: <BIOTECHNOLOGY>, <MICROBIOLOGY>, <FUNGUS (*Aspergillus niger*) >, <ENZYMATIC CRUDE>, <FERMENTATION IN SOLID STATE>, <EXOGLUCANASE>, <ENDOGLUCANASE>.

INTRODUCCIÓN

Identificación del problema

El desarrollo de las actividades del hombre, es uno de los factores que ha contribuido en el deterioro del equilibrio medio ambiental, los diferentes procesos industriales, agrícolas y agroindustriales, han generado la transformación y aparición de diferentes compuestos residuales y contaminantes que afectan directa o indirectamente los recursos naturales (FAO, 2013).

Los residuos generados en las transformaciones agroindustriales y por pérdidas postcosecha en Ecuador, aún no son aprovechados eficientemente, en parte, porque su valor aún desconocido y, sobretodo, por la falta de métodos apropiados para la preparación y caracterización de sustancias de mayor valor agregado con la suficiente calidad e inocuidad como para ser usadas en procesos alimenticios. En la actualidad, esta ingente biomasa de subproductos representa un importante problema ambiental para los productores, con doble incidencia tanto en la sanidad ambiental como en la economía local, lo que genera considerables gastos económicos en vista a minimizar los efectos (Peñañiel; et al, 2015). Son pocos los estudios realizados sobre la identificación de microorganismos degradadores de residuos lignocelulósicos asociados al *Aspergillus niger*, su caracterización y potenciales aplicaciones en bioprocesos es muy promisorio para nuestro país, además de ser un recurso viable para el sector económico y especialmente para la parte ambiental de la agricultura sostenible (Cortez, 2015).

Justificación de la investigación

Existe un gran interés de ganaderos y profesionales del sector pecuario en incorporar desechos y/o residuos agroindustriales en la alimentación animal. Su utilización se ha visto estimulada en los últimos años debido al elevado costo de los insumos empleados tradicionalmente, como también por la modernización de los sistemas de producción de carne (Peñañiel; et al, 2015).

Por esta razón muchas investigaciones se han orientado a la producción de enzimas hidrolíticas del tipo hemicelulasas y celulasas a partir de subproductos agrícolas, que tienen como finalidad las

industrias de mayor demanda que son la de alimentos y farmacéutica. Dada la disponibilidad de residuos lignocelulósicos en Ecuador, se plantea la posibilidad de dar un mayor valor agregado a estos residuos, utilizándolos en la Fermentación en Estado Sólido (FES) como soporte y fuente de carbono para inducir la producción de enzimas fibrolíticas (hemicelulasas y celulasas) (Giraldo, L A; et al, 2007).

La presente investigación busca aprovechar los residuos agroindustriales por su valor nutritivo y sus propiedades particulares, las enzimas celulasa y xilanasas han sido previamente comprobadas por mejorar la degradabilidad ruminal in vitro de forrajes y sustratos a base de forraje (Giraldo, L A; et al, 2004). Se evaluará la mayor producción de celulasa y xilanasas mediante cultivo de *Aspergillus niger* en fermentación sólida con el uso de estos residuos agroindustriales: salvado de trigo, salvado de soya y afrecho cervicero. Al adicionar estas enzimas a las pajas lignocelulósicas se espera una significativa degradación de la fibra, que puede aumentar la energía metabolizable al ser usado este residuo agroindustrial como ingrediente en la alimentación de vacas lecheras.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

- Producir un crudo enzimático (celulasa, xilanasas) por *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™), utilizando residuos agroindustriales mediante FES.

Objetivos Específicos

- Evaluar los residuos salvado de soya, salvado de trigo y afrecho cervecero, de bajo costo como sustratos para la producción de un crudo enzimático utilizando una cepa de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™).
- Caracterizar el proceso de fermentación extractiva de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™) mediante indicadores bioquímicos y microbiológicos.
- Determinar costos y posibles aplicaciones de los productos de esta tecnología.

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO

Antecedentes de la Investigación

Nuestro país, dispone de grandes zonas tropicales y subtropicales, en donde se generan productos residuales agrícolas; como la paja de arroz y la paja de caña, que son compuestos lignocelulósicos y no se degradan fácilmente en el ambiente, constituyendo un problema residual (Ramón, 2012). Residuos que tratados físicoquímica o biológicamente pueden ser empleados en la alimentación de ganado bovino pues estos poseen un sistema digestivo que tiene la capacidad de aprovechar y convertir material fibroso con altos contenidos de carbohidratos estructurales, en alimentos de alta calidad nutritiva como la carne y la leche (Carmona, 2005).

Las mejoras en la producción de rumiantes con enzimas fibrolíticas suplementarias se atribuyen generalmente a un aumento de la digestión ruminal de la fibra, pero el mecanismo por el cual se produce este incremento no se entiende. Se han propuesto numerosos mecanismos potenciales incluyendo efectos ruminales y de pre alimentación tales como hidrólisis directa, los cambios estructurales en la fibra, el aumento de la fijación microbiana ruminal, la estimulación de las poblaciones microbianas ruminales y el sinergismo con las enzimas microbianas ruminales. Las diferencias en el nivel de fibra, composición y estructura entre los forrajes son razones probables para la especificidad ampliamente reconocido entre las enzimas fibrolíticas exógenas y composición de la alimentación. La mayor evidencia de la especificidad entre la actividad de la enzima y la composición de la alimentación proviene de estudios que compararon las características de digestión *in vitro* de diversos forrajes (Giraldo, L A; et al, 2007).

1.1. Biotecnología

De acuerdo al convenio referente a Diversidad Biológica de 1992, la biotecnología se define como “Toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos” (Morales Bran, 2012).

La Biotecnología cumple con un papel muy importante rol basado en el cuidado del medio ambiente desde sus posibilidades de prevenir y remediar los problemas ambientales derivados de las actividades productivas.

Tecnologías más limpias, también conocidas como tecnologías blancas buscan reemplazar las tecnologías contaminantes en procesos industriales disminuyendo a la vez la emisión de residuos. Ejemplo, las tecnologías enzimáticas permiten reemplazar o reducir la utilización de sustancias químicas agresivas con el medio ambiente en procesos más limpios y seguros.

La biorremediación se basa en la utilización de microorganismos, enzimas, hongos o plantas especializados para la degradación de desechos peligrosos. Se pueden utilizar para remover los contaminantes orgánicos y gaseosos del medio ambiente. A partir de la modificación genética de estos organismos es posible incrementar su capacidad de degradación de contaminantes, optimizando el proceso (Instituto Nacional de Tecnología, 2011).

1.2. Hongos productores de enzimas

Los hongos filamentosos tienen una gran importancia económica, a más de sus aplicaciones benéficas también por el daño que pueden causar. Los hongos son los responsables de la degradación de la mayor parte de la materia orgánica de la tierra, una actividad enormemente beneficiosa ya que permite el reciclaje de la materia viva. Por otra parte, existen efectos perjudiciales de los hongos lo cual estos son contrarrestados por su utilización industrial. Los hongos son principales causante de las fermentaciones como la combinación de soja, habichuelas, arroz y cebada que dan lugar a los alimentos orientales miso, shoyu. Además, son la fuente principal de muchas enzimas comerciales tales como: amilasas, proteasas, pectinas, celulasas (Bran Morales, 2012).

Tabla 1-1: Aplicaciones de enzimas en alimentos.

Enzima	Acción enzimática y aplicación tecnológica	Fuente
α -Acetolactato descarboxilasa	Conversión de acetolactato a acetoína. Reducción del tiempo de maduración del vino	<i>B. subtilis</i>
Amiloglucosidasa	Hidrólisis de dextrina a glucosa. Producción de jarabes fructosados y de cerveza tipo “lite”	<i>A. niger, Rhizopus spp.</i>
Bromelina, ficina y papaína	Hidrólisis de proteínas del tejido conectivo y muscular. Tenderización de la carne	Piña, látex de higo y de papaya inmadura.
Catalasa	Conversión del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Junto con glucosa oxidasa, remueve el oxígeno	<i>A. niger, M. luteus</i>
Celulasa	Hidrólisis de celulosa. Ablandamiento de la fruta en la producción de jugos	<i>A. niger, Trichoderma spp.</i>
Dismutasa lactoperoxidasa	Oxida compuestos en presencia de agua y peróxido de hidrógeno. Combinada con tiocianato oxidado y peróxido de hidrógeno da origen a compuestos antibacterianos	Saliva y leche de mamíferos
β -Glucanasa	Hidrólisis de β -glucanos. Evita la turbidez en la cerveza.	<i>Aspergillus spp., Bacillus subtilis</i>
Glucosa isomerasa	Conversión de glucosa a fructosa. Producción de jarabes fructosados a partir de jarabes de almidón.	<i>A. missouriensis, B. coagulans, S. lividans, S. rubiginosus</i>
Glucosa oxidasa	Oxidación de glucosa a ácido glucónico. Evita el pardeamiento de la clara del huevo.	<i>A. niger, P. chrysogenum</i>

Hemicelulasa y xilanasas	Hidrólisis de hemicelulosa. Mejora la textura del pan	<i>Aspergillus spp.</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>T. reesei</i>
Lacasa	Reducción del oxígeno a agua con la oxidación de sustrato como diaminas aromáticas y polifenoles. gelatiniza la pectina de la remolacha en la fabricación de azúcar	<i>T. versicolor</i> <i>T. hirsuta</i>
Lipasa y esterasa	Hidrólisis de triacilgliceroles en ácidos grasos y glicerol. Sintetiza ésteres con sabor.	<i>Aspergillus spp.</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Rhizopus spp.</i> , garganta de caprino/ovino, abomaso de ternero, páncreas de cerdo
Lipoxigenasa	Oxidación de ácidos grasos insaturados.	Soya
Lisozima	Hidrólisis de la pared celular bacteriana. Bacteriostático.	Huevo blanco
Pectinesterasa	Remoción de grupos metilo de las unidades de galactona en la pectina. Con pectinasa, útil en la despectinización.	<i>Aspergillus spp</i>
Pentosanasas	Hidrólisis de pentosano. Mejora la calidad y textura de la masa de panificación	<i>H. insolens</i> , <i>T. reesei</i>
Pululanasa	Hidrólisis de enlaces $\alpha(1-6)$ del almidón. Mejora la eficiencia de la sacarificación del almidón	<i>Bacillus spp.</i> , <i>Klebsiella spp.</i>
Proteasas (Aminopeptidasa y proteínasa, tripsina)	Hidrólisis de proteínas. Producción de hidrolizados para sopas y saborizantes, mejora la textura de la masa de panificación.	<i>Aspergillus spp.</i> , <i>R. miehei</i> , <i>C. parasitica</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>Rhizopus spp.</i> , <i>Bacillus spp.</i> , <i>A. awamori</i> , <i>K. lactis</i> , abomaso de ternero, páncreasbovino/porcino
Transglutaminasa	Reacción de transferencia entre grupos carboxiamida y acil. Producción de embutidos, mejora la textura del yogur.	<i>Aspergillus spp.</i> , <i>S. mobaraense</i> , Maíz

Fuente: Moral, 2015

1.2.1. Hongos filamentosos

Los hongos son organismos eucariotas que se caracterizan por ser inmóviles, presentar talo, poseen estructuras ramificadas conocidas como micelios. Los hongos no realizan la fotosíntesis puesto que son heterótrofos que viven a partir de la materia orgánica producida por otros tipos de microorganismos, pueden reproducirse por medio de esporas o por medio de las hifas, además pueden tener septos que son paredes internas que presentan poros para permitir el paso del citoplasma. Las hifas pueden crecer por extensión apical o de las puntas y se multiplican por ramificación, lo cual en estos extremos se lleva a cabo la asimilación de nutrientes del medio y la excreción de las hidrolasas que son enzimas extracelulares necesarias para la degradación de una gran variedad de sustratos complejos (Vásquez, 2013, p.11).

1.2.1.1. *Aspergillus*

Aspectos generales del género *Aspergillus* y su ciclo de vida.

Los *Aspergillus* son hongos pertenecientes a la división *Deuteromycota*, que corresponde a los hongos filamentosos a los cuales no se les conoce una forma sexuada para su reproducción. El mismo que pertenece a la clase Hyphomycetes, que son los hongos que forman micelios, pero carecen de esporocarpio, en particular el género *Aspergillus* se caracteriza por tener conidióforos con las esporas organizadas en rosarios largos que tienen un arreglo similar a una regadera, es por eso que viene su nombre (Viniegra, 2003).

1.2.1.1.1. *Aspergillus niger*

El hongo *Aspergillus niger* produce diversos compuestos de gran interés para las industrias farmacéuticas y de alimentos (enzimas, ácidos orgánicos), y es el principal productor de ácido medio cítrico (Ocampo, 2013). Este hongo es la especie más abundante en la naturaleza, ya que se encuentra destruyendo alimentos y materiales vegetales de fácil fermentación ya que contienen cantidades considerables de azúcares, almidones o gomas. Su micelio produce esporas negras. Es muy usado el *Aspergillus niger* en la industria de fermentación para producir varias enzimas.

El *Aspergillus niger* se encuentra en el grupo de los aspergilos negros, el cual se clasifica dentro de la familia moniliaceae, orden moniliales, clase hyphomicetes, filum deuteromycota. Las características del grupo de *Aspergillus niger* para su identificación, las cuales son: cabezas conidiales de tonos negro a negro grisáceo, negro café, negro púrpura o negro carbón, son globosas, radiadas o divididas formando columnas de cadenas de conidios irregulares o bien definidas. Los conidióforos son de color hialino a café, típicamente lisos o en pocas especies ligeramente granulares, de paredes robustas, quebradizas, dividiéndose longitudinalmente al ser trituradas. Vesículas globosas o casi globosas, hialinas o de color café claro a oscuro. Esterigmata en una o dos series dependiendo de las especies, con frecuencia profundamente coloreadas. Los conidios son globosos o subglobosos, elípticos o achatados horizontalmente, lisos o casi lisos, espinosos, o con estriaciones longitudinales marcadas. Esclerotia globosa o subglobosa, de coloración crema cuando es joven, tornándose rosada, gris o café (Sáez, 2002).

1.3. Enzimas

Las enzimas están presentes en todos los seres vivos porque son moléculas fundamentales para su funcionamiento. Una de las características más sobresalientes de las enzimas es su elevada especificidad por lo que tienen una amplia aplicación en diversos sectores industriales.

El uso de las enzimas para la producción de alimentos data desde el año 2000 A.C, en productos fermentados como cerveza, vino, pan y queso, aunque fue hasta finales del siglo XIX que se acuñó el término enzima. En los años 80's del siglo XX se incorporaron por primera vez a nivel industrial preparaciones enzimáticas comerciales para incrementar el contenido nutritivo y la digestibilidad de alimento para ganado. En la década de los 90's se produjeron y aprobó el uso de enzimas recombinantes para queso (EUA) y pan (Reino Unido).

En la actualidad, las enzimas se consideran como aditivos en la industria de los alimentos que pueden modificar la apariencia, textura, valor nutricional, generar aromas y sabores, además de disminuir el tiempo de proceso. Su utilización se ha extendido a otras aplicaciones relacionadas con la industria alimentaria como el desarrollo de envases activos y biosensores (Moral, 2015).

1.3.1. Definición

Las enzimas son moléculas de naturaleza proteica que su función es catalizar reacciones químicas energéticamente posibles, pero que transcurren a una velocidad muy baja. La enzima hace que la reacción transcurra a mayor velocidad que sin la presencia de la misma.

En estas reacciones, las enzimas actúan sobre unas moléculas denominadas sustratos, las cuales se convierten en moléculas diferentes denominadas productos. Casi todos los procesos en las células necesitan enzimas para que ocurran en las cantidades necesarias. A las reacciones mediadas por enzimas se las denomina reacciones enzimáticas (Cortez, 2015).

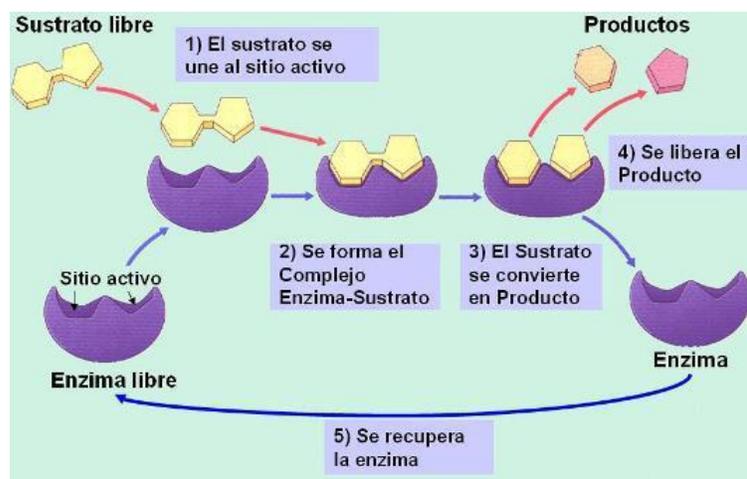


Figura 1-1: Mecanismo de reacción enzimática

Fuente: Cortez, 2015

1.3.2. Mecanismo de acción de las enzimas.

1.3.2.1. Energía de activación

En toda reacción química se produce la transformación de unas moléculas iniciales denominadas sustratos (S) en las reacciones bioquímicas, en unas sustancias finales o productos (P). Esta transformación necesita, en la mayoría de las reacciones, un aporte inicial de energía que aumenta la energía cinética de las moléculas y éstas, reaccionan permitiendo que un mayor número de ellas, choquen con suficiente fuerza para superar su repulsión mutua y debilitar los enlaces químicos que poseen. La energía que deben poseer las moléculas para iniciar la reacción se conoce con el nombre de energía de activación (Castillo, 2005).

1.3.2.2. El catalizador

Un catalizador disminuye la energía de activación necesaria para una reacción, porque forma una asociación pasajera con las moléculas que reaccionan. Esta asociación aproxima a las moléculas que reaccionan y, favorece tanto la ruptura de enlaces existentes, como la formación de otros nuevos. Cuando existe un catalizador en la energía de activación, esta reacción puede suceder rápidamente sin o con poca adición de energía. El catalizador no sufre ninguna alteración permanente en el proceso y puede volver a utilizarse. Debido a las enzimas, las células son capaces de desarrollar reacciones químicas a gran velocidad y a temperaturas relativamente bajas (Castillo, 2005).

1.3.2.3. Reacciones enzimáticas

En estas reacciones, la enzima (E) se une al sustrato (S) para formar el complejo enzima-sustrato (ES). Después tiene lugar la transformación del sustrato (S) en producto (P), liberándose el producto (P) y quedando libre la enzima (E) para una nueva unión con el sustrato.

Las enzimas, como los demás catalizadores, aceleran la reacción sin alterar la posición de equilibrio.

En una reacción con enzimas: Sustrato \rightarrow Producto

En una reacción sin enzimas: Sustrato \rightarrow Estado de transición \rightarrow Producto (Castillo, 2005).

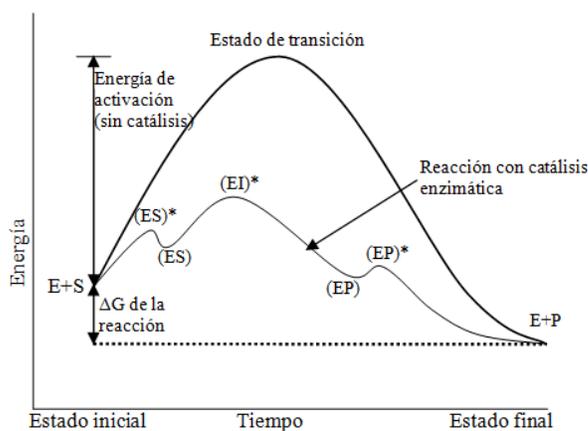


Figura 2-1: Reacción química de las enzimas

Fuente: Castillo, 2005.

1.3.2.4. La constante de equilibrio

La constante de equilibrio K , se produce en las reacciones enzimáticas y siempre tiene un valor constante fijado por la relación entre las velocidades en uno u otro sentido, independientemente de que el catalizador esté o no presente. La catálisis hace disminuir considerablemente el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio.

$K = \frac{[P]}{[S]}$ K = constante de equilibrio

[P] = concentración de producto

[S] = concentración de sustrato (Castillo, 2005).

1.3.3. Clasificación de las enzimas

Las enzimas se clasifican en seis grandes grupos principales según su mecanismo de acción sobre su sustrato.

Tabla 2-1: Clasificación de las enzimas según el mecanismo de reacción.

Grupo	Acción	Ejemplo
Oxidoreductas as	Catalizan reacciones de oxidorreducción. Tras la acción catalítica quedan modificados en su grado de oxidación por lo que deben ser transformados antes de volver a actuar de nuevo.	Dehidrogenasas Aminooxidasa Deaminasas Catalasas
Transferasas	Transfieren grupos activos (obtenidos de la ruptura de ciertas moléculas) a otras sustancias receptoras. Suelen actuar en procesos de interconversiones de azúcares, de aminoácidos, etc.	Transaldolasas Transcetolasas Transaminasas
Hidrolasas	Verifican reacciones de hidrólisis con la consiguiente obtención de monómeros a partir de polímeros. Suele ser de tipo digestivo, por lo que normalmente actúan en primer lugar antes que cualquier otra.	Glucosidasas Lipasas Peptidasas Esterasas Fosfatasas
Isomerasas	Actúan sobre determinadas moléculas obteniendo de ellas sus isómeros de función o de posición. Suelen actuar en procesos de interconversión.	Isomerasas de azúcar Epimerasas Mutasas
Liasas	Realizan la degradación o síntesis (entonces se llaman sintetetasas) de los enlaces denominados fuertes sin ir acoplados a sustancias de alto valor energético.	Aldolasas Decarboxilasas

Ligasas	Realizan la degradación o síntesis de los enlaces fuertes mediante el acoplamiento a sustancias ricas en energía como los nucleosidos del ATP.	Carboxilasas Peptidosintetasas
---------	--	-----------------------------------

Fuente: Izarral, 2009

1.3.4. Enzimas lignocelulolíticas

Desde el inicio de 1950, las enzimas lignocelulolíticas han ido incrementado su importancia en diferentes industrias, así como en la producción de alimentos, industria textil, industria papelera, agricultura, esto se fue dando principalmente debido a las ventajas que otorgan en la optimización de procesos. Por otro debido a sus varias características como:

- Su especificidad de sustrato
- El requerimiento de condiciones suaves de pH
- Temperatura
- Presión para su actividad (comparando con procesos químicos)
- Su contribución al cuidado del medioambiente haciendo los procesos más limpios
- Su posibilidad de inmovilización, evitando la presencia de éstas en los productos finales (Izarral, 2009).

1.3.4.1. Celulasas

En los últimos años ha incrementado el estudio de las celulasas, debido a su aplicación en la hidrólisis de la celulosa, el más abundante biopolímero y fuente potencial de azúcares utilizables, que sirven como materia prima en la producción microbiana para una amplia variedad de químicos, alimentos y combustibles. La bioconversión de la celulosa contenida en las materias primas es un problema importante para la biotecnología, debido a las crecientes necesidades de alimento (Arce, 2012).

Nombre genérico que reciben un complejo de enzimas capaces de degradar celulosa, un polisacárido formado por moléculas de glucosa unidas entre sí por enlaces β - 1,4.

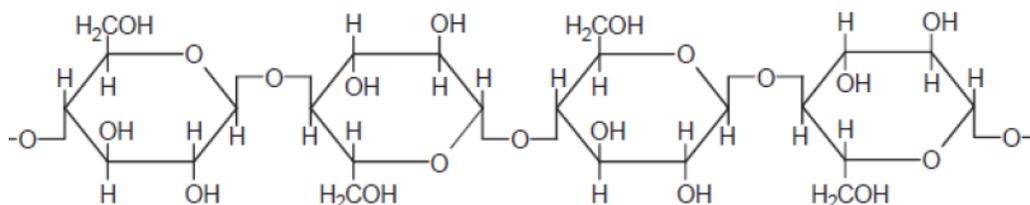


Figura 3-1: Mecanismo de reacción enzimática

Fuente: Torres, 2009

Este complejo enzimático está conformado por la endo - 1,4 - β - D - glucanasa, cuya función es hidrolizar los enlaces β - 1,4 de la celulosa para producir glucooligosacáridos, la exo - 1,4 - β - D - glucanasa (celobiohidrolasa), que produce celobiosa a partir de celulosa y la β - D - glucosidasa que degrada los glucooligosacáridos a glucosa (Torres, 2009).

Debido a la gran demanda creciente de estas enzimas, se ha impulsado la investigación y el estudio de diferentes microorganismos lignocelulolíticos, lo cual es uso de hongos filamentosos son la fuente principal de hidrolasas, incluyendo celulasas y xilanasas, debido a su fácil manejo y costos reducidos.

Los principales géneros incluyen de gran importancia para la producción de estas enzimas son *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Penicillium*. Lo cual *Aspergillus niger* es uno de los microorganismos más utilizados en la producción de enzimas industriales, principalmente por sus altos niveles de secreción de proteína, y su estatus GRAS (considerados seguros) (Izaral, 2010).

1.3.4.2. Xilanasas

El nombre xilanasas es genérico para una familia de enzimas que catalizan la ruptura de los enlaces xilosídicos internos de la molécula de heteroxilano (xilano), lo cual es un tipo de polisacárido, el cual es el mayor componente de la hemicelulosa, componente importante de la biomasa de la pared celular en vegetales. Las enzimas que participan de la biodegradación del heteroxilano son las endoxilanasas, las cuales rompen el esqueleto de xilano en pequeños oligosacáridos y las β - xilosidasas, que degradan estos oligosacáridos a moléculas de xilosa.

La estructura química del xilano presente en la pared celular de plantas difiere grandemente dependiendo de su origen, pero todas ellas contienen un esqueleto de D - xilosa unidos entre sí por enlaces β - 1,4, otras moléculas unidas a este esqueleto, dependiendo de la especie vegetal son arabinosa, galactosa, ácido ferúlico y ácido glucurónico (Torres, 2009).

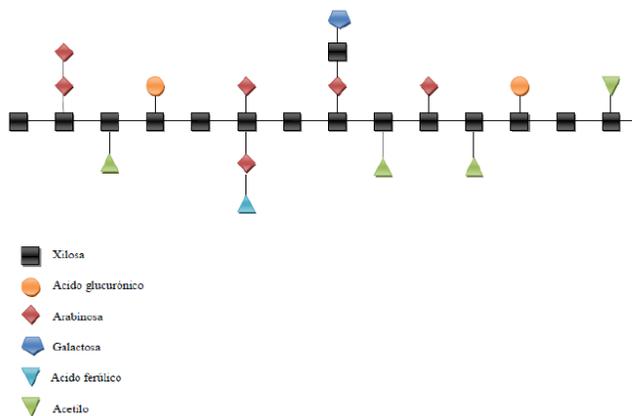


Figura 4-1: Representación esquemática de la molécula de xilano.

Fuente: Torres, 2009

1.4. Factores que afectan la producción de enzimas

1.4.1. Sustrato

La velocidad de la reacción o catálisis varía de acuerdo a la concentración del sustrato. Al aumentar la concentración de sustrato, la actividad enzimática aumenta, hasta alcanzar la velocidad máxima, punto donde la enzima se satura, debido a que las enzimas tienen todos sus sitios activos ocupados (Blog de Biología, 2017).

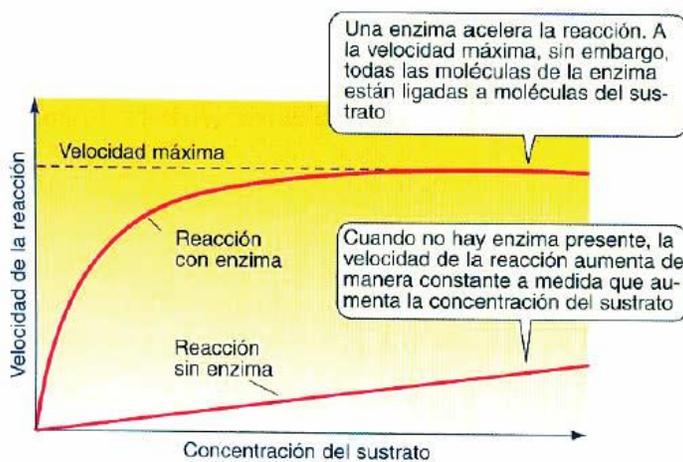


Figura 5-1: Efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de una reacción enzimática.

Fuente: Blog de Biología, 2017.

1.4.2. Tamaño de partícula

El tamaño de la partícula es una de las variables que está relacionada con la transferencia de masa entre microorganismos y sus sustratos. Con tamaños de partículas pequeños el área de contacto entre el micelio de los microorganismos y los sustratos se incrementan, pero a su vez se limita el intercambio de gases al reducirse el espacio entre las partículas. Por otra parte, cuando se tiene un tamaño de partícula grande el área de contacto entre el micelio de los microorganismos y los sustratos se reduce, pero el intercambio gaseoso mejora al incrementarse el espacio entre las partículas de los sustratos. Estos dos efectos opuestos influyen en los niveles de producción de las enzimas, por lo que es necesario seleccionar un tamaño de partícula adecuado para la producción de enzimas lignocelulolíticas (Vásquez, 2013).

1.4.3. Humedad y actividad del agua

Los niveles de humedad que son mayores a 90% y menores a 50% tienden a reducir considerablemente la producción de las enzimas, los requerimientos de humedad pueden variar de acuerdo al tipo de sustrato, microorganismo y tipo de enzima que se desee producir. A pesar de que la humedad del sustrato es una de las variables que optimiza los sistemas de cultivo sólido para la producción de enzimas lignocelulolíticas, se reconoce que la eficiencia del proceso que se realice depende del tipo de interacciones que existen entre el agua y los sustratos. Por esta razón cuando se realiza la fermentación en estado sólido es recomendable relacionar la actividad del agua y la humedad del sustrato con el crecimiento de los microorganismos y con la producción de enzimas (Vásquez, 2013).

1.4.4. pH

La velocidad de una reacción química o actividad de la enzima, está muy influenciada por la estructura de la enzima, lo cual es un cambio en la estructura de la enzima afecta a la velocidad de reacción. Cuando se producen los cambios de pH de un medio en particular, esto conduce a la alteración en la forma de la enzima, esto no afecta solo a las enzimas sino también puede afectar a las propiedades de la carga y la forma del sustrato. Dentro de un nivel estrecho de pH, los cambios en las formas estructurales de las enzimas y los sustratos, pueden ser reversibles. Pero para un cambio significativo

en los niveles de pH, la enzima y el sustrato pueden someterse a la desnaturalización. Un pH óptimo se encuentra entre pH 6 - 8 para la mayoría de las enzimas (Salud y bienestar, 2017).

1.4.5. *Temperatura*

La velocidad de las reacciones enzimáticas aumenta, por lo general, con la temperatura, dentro del intervalo en que la enzima es estable y activa. La velocidad por lo general se duplica por cada 10°C de aumento térmico. La actividad enzimática máxima se alcanza a una temperatura óptima, luego la actividad decrece y finalmente cesa por completo a causa de la desnaturalización progresiva de la enzima por acción de la temperatura.

A bajas temperaturas, las reacciones disminuyen mucho o se detienen porque decrece la cinética molecular, pero la acción catalítica reaparece cuando la temperatura se eleva a valores normales para la enzima. No olvidar que una enzima humana típica posee su óptimo a 37 °C, en cambio otros organismos como, por ejemplo, las bacterias termófilas resistentes a altas temperaturas tienen su óptimo de actividad cercano a los 80° C (Blog de Biología, 2017).

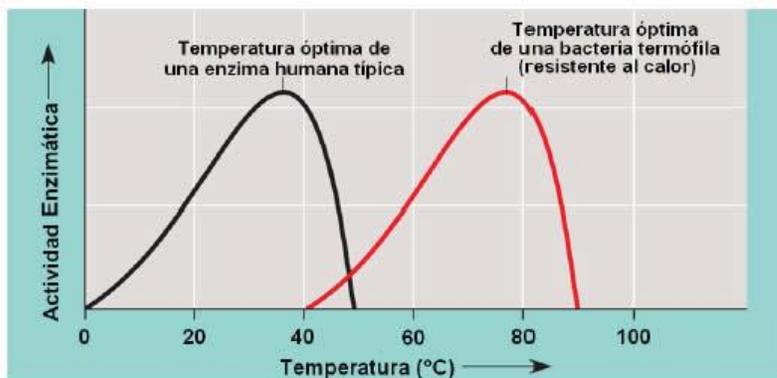


Figura 6-1: Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

Fuente: Blog de Biología, 2017

1.5. Residuos agroindustriales en el Ecuador

1.5.1. Afrecho cervecero

El afrecho seco de cervecería es un subproducto de la cervecería. Se puede utilizar en forma fresca, seca o ensilado. Se utiliza con excelentes resultados en la ganadería de leche. Cuenta con un porcentaje alto de proteína y es altamente digestible, aporta los aminoácidos esenciales para ganadería en alta concentración. En su forma fresca tiene un alto contenido de humedad.

1.5.1.1. Características

El grano de cebada está compuesto por un 3.5% de germen, un 18% de pericarpio y un 75% de endospermo. El germen es rico en azúcares (sacarosa y rafinosa y fructosanas). El pericarpio está lignificado y es abrasivo debido a la presencia de sílice en la epidermis. La capa de aleurona es rica en fibra, proteína, triglicéridos y azúcares.

El procesamiento del grano tiene un efecto pequeño sobre su valor nutritivo. El contenido de almidón y la proporción de amilosa de la cebada son inferiores a los del maíz y trigo.

La proporción de proteínas solubles (albuminas y globulinas) en la proteína total es relativamente alta (25%). El grano contiene además un 52% de prolamina y un 25% de gluteína. Tanto la calidad proteica como la degradabilidad ruminal de la proteína son relativamente altas con respecto a otros cereales (Carrión, 2014).

Tabla 3-1: Composición nutricional del afrecho seco de cervecería

Composición	%
Humedad	8.18
Ceniza	6.44
Proteína	22
Grasa	8.70
Fibra	14.89

Realizado por: Cristian Centeno, 2017

Fuente: Carrión, 2014

1.5.2. Salvado de trigo

El Salvado de trigo es el resultado de una parte de la molienda de los granos de cereal que es utilizado para alimentación animal, este es el residuo que se genera luego del proceso de producción de harina, y se denomina afrecho (Luna, 2014).

1.5.2.1. Características

El afrecho de trigo está formado por los exteriores del grano casi exclusivamente; es un alimento de los más populares para el ganado por su contenido nutricional

Tabla 4-1: Componentes del salvado de trigo.

Componentes	%
Materia Seca	92.0
Proteína Bruta	11.1
Extracto etéreo	4.61
Cenizas	8.16
Fibra Bruta	8.4
Fibra neutro detergente	36.1
Contenidos Celulares	55.9
Fibra ácido detergente	11.2
Energía Bruta (kcal/kg)	3945

Realizado por: Cristian Centeno

Fuente: Luna, 2014

1.5.3. Salvado de soya

La soja es una excelente fuente de energía y proteína, en particular lisina, conteniendo además cantidades importantes de otros nutrientes esenciales, tales como ácido linoleico y colina, cuya disponibilidad es además alta.

En el mercado se encuentra disponible la harina de soja micronizada que se obtiene al moler finamente la harina de soja previamente descascarillada, seguido de clasificación por aireación para concentrar más la fracción proteica.

En la actualidad se comercializan harinas de soja micronizadas con un tamaño de partícula que fluctúa en partículas entre 50 y 250 micras, pero sólo las de menor tamaño deberían ser consideradas harinas de soja micronizadas. Este tipo de harinas contienen más de un 50% de proteína y encuentran su mercado en lechones de primera edad.

Los productos de soja son de fácil manejo en fábrica, si bien no se aconsejan tiempos de almacenamiento largos para el haba entera por el riesgo de oxidación de la grasa. El control de calidad debe incluir las condiciones del procesado, ya que cuando éste se realiza de forma inadecuada (homogeneidad y tamaño de partícula, tiempo, temperatura, presión y humedad), hay un empeoramiento importante del valor nutritivo (Luna, 2014).

1.5.3.1. Características

El contenido mineral de la cascarilla de soja es relativamente bajo y muy variable, básicamente es pobre en fosforo, sodio y cloro.

Tabla 5-1: Componentes del salvado de soja.

Composición química	%
Humedad	11.0
Cenizas	4.7
Proteína Bruta	11.8
Extracto Etéreo	2.5
Grasa verdadera(%EE)	90
Fibra Bruta	32.7
Fibra Neutra Detergente	57.5
Fibra Acido detergente	43.3
Almidón	0.0
Azucres	1.5

Realizado por: Cristian Centeno, 2017

Fuente: Domínguez, 2014.

1.6. Aplicación tecnológica

1.6.1. Celulasas

Las celulasas y enzimas relacionadas son utilizadas en industrias alimenticias, de cervecería, de vino, alimentación animal, textil, de detergentes, del papel, así como también en la agricultura y en investigaciones. La gama de aplicaciones hace a estas enzimas muy atractivas y demuestran su enorme valor comercial en la industria biotecnológica.

Industria del papel

Las celulasas y hemicelulasas usadas en etapas de pretratamiento permiten una mejor deslignificación y ahorro en reactivos químicos en la etapa posterior de blanqueamiento. Las celulasas también mejoran la remoción de tintas de papeles de diario viejos, dando mejores resultados que cuando se utilizan químicos.

Industria del textil

Representan el mayor grupo de enzimas en esta industria, considerando el hecho que cerca del 70 % de las fibras procesadas por esta industria son de celulosa. Las aplicaciones más relevantes en esta área son: destinción de prendas para dar apariencia de gastado, tratamiento de las telas para eliminar imperfecciones de las fibras, preparación de la tela previa a tinciones o impresiones para obtener mayor afinidad con los pigmentos y desfibrilación realizada antes y después del teñido.

Industria de la comida

Se destacan en la habilidad de hidrolizar componentes de las paredes celulares, con lo que se disminuye la viscosidad y se mantiene la textura en los jugos de frutas. Además, liberan antioxidantes de la fruta, lo que ayuda a controlar enfermedades coronarias. Así mismo, se utilizan celulasas del tipo endoglucanasas junto con xilanasas para la separación de gluten y almidón de la harina, gracias a la hidrólisis de arabinoxilano y almidón.

En la industria de la cerveza y el vino las celulasas tienen diversas y atractivas aplicaciones, una de ellas es en el proceso de producción de la cerveza, en donde las celulasas del tipo endoglucanasa son utilizadas para la hidrólisis del enlace 1,4- β - glucosídicos de las semillas de cebada, lo que reduce la viscosidad y libera azúcares reducidos durante la primera fermentación. Con esto se obtiene un aumento de eficiencia en dicha etapa, y en la etapa de filtración, y un mejoramiento en la calidad de

la cerveza. En la industria del vino, celulasas del tipo β -glucosidasa son utilizadas para el mejoramiento del aroma del vino. Así mismo el uso de endoglucanasas es conocido para el mejoramiento en las eficiencias de las etapas de maceración, clarificación y filtración, así como también para a la obtención de un vino de mejor calidad y estabilidad (Marín, 1007).

En la extracción de jugo los preparados enzimáticos tienen un enorme potencial de aplicación por dos razones: por un lado, se incrementa el porcentaje de extracción de los jugos; y por otro lado, el jugo presenta un mejor sabor agradable.

Extracción de leche, mediante la degradación de los polisacáridos presentes en el coco es posible liberar la leche de coco extra, que se encuentra retenida en el residuo del fruto extraído y así permite obtener una leche de coco con un mejor sabor, debido a que le imparten mayor dulzura a la leche (Chacón, 2005).

1.6.2. Xilanasas

El uso de las xilanasas empezó a principios de los años 80, primero se aplicó en la alimentación animal. Posteriormente se aplicaron en las industrias de lavandería, textil y pulpa y papel. Últimamente su uso se ha incrementado en forma considerable y actualmente representan cerca del 20% del mercado mundial de las enzimas (Vásquez, 2013).

La industria de papel

La utilización de tecnologías enzimáticas en la industria de pulpa y papel tiene amplias perspectivas a futuro de acorde avance las investigaciones y así consigo traer importantes beneficios en cuanto a las mejoras de los productos y procesos tales como: reducción de costos y disminución del impacto ambiental.

Las aplicaciones las frecuentes se dirigen a:

- La reducción del uso de agentes químicos contaminantes en la etapa de pre blanqueo; esto se lo puede realizar mediante el uso de las enzimas xilanasas.
- Blanqueamiento de pulpa; mediante el uso de las enzimas xilanasas o celulasas.
- Reciclado de fibras (las endoglucanasas se usan para mejorar la velocidad de drenaje de fibras recicladas, las celulasas para incrementar la densidad de la hoja de papel y reducir su

rusticidad, alfa amilasas para mejorar las propiedades del drenaje y para el despintado de fibras recicladas)

- Para la disminución de residuos y contaminantes en el proceso de reciclado se utiliza las siguientes enzimas: esterasas: para el control de stickies; amilasas y proteasas: para la remoción de lodo; lipasas: para controlar la acumulación de lodo (Bran Morales, 2012).

En la industria de la panificación, la xilanasa se adicionan a la masa para mejorar su calidad, obteniéndose productos de panadería con mejor textura y sabor, El efecto que producen la xilanasa es incrementar el volumen específico de los panes, sin provocar un efecto colateral en el manejo de la masa y puede atribuirse a la distribución de agua de la fase del pentosano hacia la del gluten, ocasionado que el pan se vuelva menos seco y permanezca más tiempo fresco (Vásquez, 2013).

CAPITULO II

2. METODOLOGÍA

2.1. Tipo y Diseño de investigación

En la presente investigación se evaluó la producción de enzimas (celulasas, xilanasas), mediante la utilización de 3 tipos de residuos agroindustriales como Afrecho cervecero, Salvado de trigo, Salvado de soya con un diámetro de partícula 0.05mm y se añadió a los sustratos el suplemento de nutrientes (Tabla 2-2), posteriormente se inóculo $6,49 \times 10^9$ esporas/mL de *Aspergillus niger* y se determinó a 4 tiempos cada uno de los sustratos 72, 120, 168, 216 horas, cada muestra se realizó con 3 repeticiones.

Tabla 1-2: Esquema para la determinación del mejor sustrato y tiempo óptimo

Sustratos(g)	Código	Tiempo de Incubación (h)	Código	Codificación	Repeticiones	TUE* (ml)
Afrecho Cervecerero	S1	72	T1	S1T1	3	20
		120	T2	S1T2	3	20
		168	T3	S1T3	3	20
		216	T4	S1T4	3	20
Salvado de Trigo	S2	72	T1	S2T1	3	20
		120	T2	S2T2	3	20
		168	T3	S2T3	3	20
		216	T4	S2T4	3	20
Salvado de soya	S3	72	T1	S3T1	3	20
		120	T2	S3T2	3	20
		168	T3	S3T3	3	20
		216	T4	S3T4	3	20

Realizado por: Cristian Centeno

TUE*: El tamaño de la unidad experimental fue de 20ml (Tabla 2-2)

2.2. Unidad de análisis

Se utilizaron 3 tipos de residuos agroindustriales: Afrecho cervecero, salvado de trigo, salvado de soya utilizados como sustratos para la producción de enzimas (celulasa, xilanasa) a partir de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC®6275™), con 3 repeticiones de cada sustrato y cada tiempo evaluado con un total de 36 muestras.

2.3. Tamaño de la muestra

Se tomaron 10g por cada sustrato (Afrecho cervecero, salvado de trigo, salvado de soya) y de cada tiempo (72, 120, 168, 216) h, los cuales fueron utilizados para los análisis microbiológicos y análisis bioquímicos.

2.4. Selección de la muestra

Para la selección de muestra ya una vez transcurrido el tiempo de fermentación de cada sustrato se procedió a la extracción del crudo enzimático.

Posteriormente fueron trasladadas en cadena de frío y protegidas de la luz al laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias, para realizar los análisis de celulasa (papel filtro, CMC), xilanasa y proteínas.

2.5. Técnicas de recolección de datos

2.5.1. Evaluación bioquímica

- Fibra
- Proteínas (%)
- Enzima celulasa (UI. .ml⁻¹)
- Enzima xilanasa (g.ml⁻¹)

2.5.2. Evaluación microbiológica

- Bacterias Coliformes totales (Unidades Formadores de Colonias/ml)

2.6. Procedimiento experimental

En la parte experimental se utilizaron los laboratorios de Biotecnología y Microbiología Animal (LABIMA) de la Facultad de Ciencia Pecuarias, el laboratorio de Biotecnología y laboratorio de Análisis Instrumental de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH, donde se utilizaron los siguientes equipos, materiales y reactivos:

2.6.1. Equipos de laboratorio

- pH - metro
- Termo higrómetro
- Centrífuga
- Estufa
- Balanza digital
- Incubadora
- Cámara de flujo laminar
- Microscopio
- Cámara de Newbauer
- Autoclave
- Refrigerador
- Espectrofotómetro
- Baño María
- Incubadora agitadora
- Computadora
- Impresora

Microorganismo

- Hongo *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™).

Reactivos

- Agar Patata Dextrosa (PDA)
- Ácido Sulfúrico
- Agua destilada
- Tween 80
- Extracto de levadura
- Fosfato de Amonio
- Sulfato de Magnesio heptahidratado
- Sulfato de Hierro heptahidratado
- Fosfato de Potasio
- Sulfato de Zinc heptahidratado
- Sulfato de Cobre heptahidratado
- Buffer de Acetatos
- Buffer de Citrato
- Buffer de Fosfatos
- Tartrato Doble de Sodio y Potasio
- Acido Di – Nitro Salicílico
- Hidróxido de Sodio
- Glucosa
- Reactivo de Bardford SIGMA
- Albumina Sérica
- D – Xylosa SIGMA
- Xilano de avena
- Carboximetil celulosa SIGMA
- Placas petrifil

Materiales

- Cajas petri de vidrio
- Probetas

- Vasos de precipitación
- Aza de cultivo
- Bisturí
- Erlenmeyer
- Pipetas
- Pera
- Mechero
- Gradillas
- Tubos de ensayo con tapón
- Frascos de vidrio
- Rotulador
- Materiales de limpieza y desinfección

2.6.1. Microorganismo

El microorganismo utilizado en este estudio es: *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™) (Catálogo: 6275) .



Fotografía 1-2: *Aspergillus niger* (ATCC® 6275™)

Realizado por: Cristian Centeno

2.6.2. Activación de la cepa *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™)

Para la activación de la cepa *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™) se siguieron las indicaciones establecidas en el Catálogo: 6275.

2.6.2.1. Procedimiento para microorganismos KWIK-STIK™ y KWIK-STIK Plus™

1. Deje que la bolsa KWIK-STIK™ sin abrir se equilibre a temperatura ambiente. Abra la bolsa por la muesca y retire la unidad KWIK-STIK™
2. Tire de la lengüeta para reitrar la etiqueta y coloquela en la placa del cultivo principal o el registro de control de calidad. No desarme el dispositivo durante la hidratación.
3. Apriete(solo una vez) la ampolla en la parte superior de KWIK-STIK™ (justo por debajo del menisco del liquido de la ampolla) situado en la tapa para liberar el liquido hidratante.
4. Sujete en posición vertical y golpee sobre una superficie dura para facilitar el flujo de liquido a través del eje hacia la parte inferior de la unidad que contiene el sedimento. Deje que el líquido hidratante fluya a través del eje del hisopo y hacia la parte inferior de la unidad que contiene el sedimento
5. Apretando en la parte inferior de la unidad, triture el sedimento en el liquido hasta que la suspensión del sedimento sea homogénea.
6. De inmediato, sature bien el hisopo en el material hidratado y transfiera a un medio de cultivo con agar.
7. Inocule la placa de cultivo principal aciendo rodar el hisopo con suavidad sobre un tercio de la placa.
8. Con una asa esteril, cree vetas para facilitar el aislamiento de colonias.
9. Utilice un método de desecho de riesgo biológico adecuado para desechar KWIK-STIK™
10. De inmediato, incube la placa de cultivo principal inoculado a la temperatura y las condiciones adecuadas para los microorganismos.



Fotografía 2-2: Activacion de *Aspergillus niger* (ATCC® 6275™)

Realizado por: Cristian Centeno

2.6.3. Preparación del medio de cultivo y siembra de la cepa *Aspergillus niger*

Para la realización de este procedimiento se tomó como referencia (Vásquez, 2008)

Para ello se utilizó el medio de cultivo agar patata dextrosa(PDA)

- Se preparó 250 ml de medio de cultivo y colocar en un Erlenmeyer de 250 ml.
- Se procedió a esterilizar a 121 °C por 45 minutos.
- Verter en las cajas Petri en volúmenes de 15 ml, dejar enfriar hasta que la solución gelifique.
- Se propagó el hongo *Aspergillus niger* (ATCC® 6275™) en PDA solidificado en cajas petri usando la técnica de siembra del punto central y estriado, la misma que se realizara una incisión con la aza cargada del microorganismo en el centro de la placa.
- Incubó a 27° C durante 4 días.
- Se observo el crecimiento radial, halo de hidrólisis, velocidad de crecimiento.

Nota: Los microorganismos crecen durante 120 h a una temperatura controlada de 30 °C y se realiza mediciones de la colonia y del halo de hidrólisis cada 24 h.



Fotografía 3-2: Propagación de *Aspergillus niger* (ATCC® 6275™)

Realizado por: Cristian Centeno

2.6.4. Preparación del inóculo y conteo en cámara de Newbauer

Basándose como referencia. (Vásquez, 2008)

- Se agregó 5 ml de una solución acuosa de Tween 80 (Sigma) al 0.1% v/v para realizar la extracción de esporas.

- Posteriormente se realizó un recuento de esporas utilizando una cámara de Neubauer y un microscopio. El número de esporas por mL se calculará usando la ecuación :

$$\frac{\text{No. esporas}}{\text{mL}} = (\text{promedio})(25)(10^2)(1 * 10^4) \quad \text{Ecuación 1-2}$$

- Obteniéndose una suspensión de $6,49 \times 10^9$ esporas/mL.



Fotografía 4-2: Preparación del inóculo de *Aspergillus niger* (ATCC® 6275™)

Realizado por: Cristian Centeno

2.6.5. Pretratamiento del sustrato en medio ácido

- Se seccó el material lignocelulósico en una estufa a 70 °C
- Se molio y tamizó el sustrato hasta obtener un diámetro de partícula de 0.05mm.
- Posteriormente se realizó un tratamiento con H₂SO₄ al 1% durante 2 horas para lograr romper la lignina que recubre la celulosa.
- se enjuagó con agua destilada hasta lograr un pH neutro. (Excepto el afrecho cervecero que al pasar por un proceso de malteado no necesita de un pretratamiento químico y finalmente se vuelve a secar en una estufa a 70 °C durante 24 horas.)



Fotografía 5-2: Lavado de los sustratos

Realizado por: Cristian Centeno

2.6.6. *Determinación de Humedad del sustrato*

Para la determinación de la humedad se basó según (Vaca, 2011).

- Se tomo 4 g de muestra y se deposito en papel aluminio a peso constante.
- Se colocó en una estufa a 90° C por 12 h
- Enfriar y pesar.

La ecuación permite calcular la cantidad de agua que será necesario adicionar al sólido:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{masa inicial} - \text{masa final}}{\text{masa inicial}} \times 100 \quad \text{Ecuación 2-2}$$

Los gramos de agua contenidos en el sólido se calcularan mediante la diferencia de masa de una cierta cantidad de sólido, antes y después de ser introducido en una estufa a 90°C durante 12 horas.



Fotografía 6-2: Pesaje para la determinación de humedad.

Realizado por: Cristian Centeno

2.6.7. *Crecimiento de A. niger van Tieghem (ATCC® 6275™) sobre residuos agroindustriales.*

Para el crecimiento de *A. niger* se utilizarón tres distintos residuos agroindustriales: afrecho cervecero, salvado de trigo, salvado de soya

Para el desarrollo de las fermentaciones:

- Se tomó 25 g de sustrato estéril previamente humedecidos (80% de humedad) con un suplemento de nutrientes (Tabla 2-2) y se colocó en frascos de vidrio.
- Posteriormente se tomó una concentración de $6,49 \times 10^9$ esporas/mL y se inóculo en el sustrato.
- Se mezcló e incubó durante las horas indicadas en el Cuadro 2 a 27°C.

Tabla 2-2: Suplemento de nutrientes

Factores	g. L ⁻¹
Extracto de levadura	10
(NH₄)₂SO₄	1.5
Glucosa	6
Na₂HPO₄	3.4
MgSO₄•7H₂O	0.3
FeSO₄•7H₂O	0.1
KH₂PO₄	2.4
ZnSO₄•7H₂O	0.1
CuSO₄•5H₂O	0.08

Realizado por: Cristian Centeno, 2017

Fuente: Vásquez, 2008

Este suplemento fue utilizado como una solución para ajustar la humedad del sustrato seco a la requerida en las condiciones experimentales citadas.



Fotografía 7-2: Crecimiento de *Aspergillus niger* (ATCC® 6275™) sobre residuos agroindustriales.

Realizado por: Cristian Centeno

2.6.8. Obtención del extracto enzimático crudo

Al material fermentado del sustrato y el tiempo obtenido en la tabla 2-2:

- Se adicionó una solución amortiguadora de acetatos 50 mM, pH 5.5, en relación 1:1.5 (v/v)
- Se mezcló y prensó manualmente, lo que se pudo filtrar se centrifugará a 5,000g en una centrífuga, por 20 min a 4° C
- Se separó los sólidos del fermento, el sobrenadante se almacenará en tubos de ensayo a 4° C (Vásquez, 2008).



Fotografía 8-2: Centrifugación del crudo enzimático.

Realizado por: Cristian Centeno

2.6.9. Determinación del mejor sustrato y del efecto del tiempo de incubación para la FES

- Se utilizó 3 diferentes sustratos (salvado de trigo, afrecho cervecero y salvado de soya) con un diámetro de partícula 0.05 mm con el respectivo pre tratamiento ácido.
- Se añadió el medio nutritivo suplementario, con inóculo de *A. niger* van Tieghem (ATCC® 6275™) de $6,49 \times 10^9$ esporas/mL (Tabla 1-2), y humedad del 80%.
- Se llevó a cabo la fermentación en frascos de vidrio sellados completamente a diferentes tiempos (72, 120, 168, 216) h
- Se retiró los frascos de vidrio de los tres sustratos durante la fermentación cada 48 h, se obtuvo el crudo enzimático y se determinó la producción de xilanas (utilizando como sustratos xilano de avena (Sigma) al 1% (p/v)), celulasa (utilizando como sustratos carboximetil celulosa (Sigma) al 1% (p/v) y papel filtro), respectivamente.

2.6.9.1. Determinación de la actividad sobre papel filtro

- Según (Ghose, 1987). Deben hacerse al menos dos diluciones en tampón citrato de la solución de enzima cuya actividad se quiere medir. Una de ellas debe liberar en el medio de reacción algo menos de dos mg y la otra algo más de dos mg de azúcares reductores expresados como glucosa.

NOTA: Aunque las diluciones que liberan esta cantidad de azúcares reductores deben ser estudiadas para cada caso particular, se puede deducir de nuestras experiencias con distintas soluciones de celulasas, que estas corresponden, generalmente, a concentraciones de proteínas solubles (calculadas según el método de Lowry) comprendidas entre 1mg/ml y 0,1 mg/ml.

- Los patrones de glucosa se preparan a partir de una solución de glucosa, en tampón citrato 0,05M, pH 4,8, de 10 mg/ml de concentración. Las diluciones, realizadas con el mismo tampón citrato, deben tener una concentración final de 1,0, 0,7, 0,5 y 0,25 mg en 0,5 ml respectivamente.
- La reacción enzimática se lleva a cabo en tubos de ensayo de unos 25 ml de capacidad. En la siguiente tabla, se detallan los volúmenes de reactivos que deben incorporarse en las distintas muestras.

Tabla 3-2: Actividad sobre papel filtro

	Muestra problema	Patrones de glucosa	Blanco enzima	Cero
Tampón citrato	1ml	1ml	1ml	1.5ml
Solución enzima	0.5ml	----	0.5ml	----
Glucosa	----	0.5ml*	----	----
Tira de papel filtro	1	----	----	----

*de la dilución de glucosa correspondiente

Realizado por: Cristian Centeno, 2017

Fuente: Ghose, 1987

- Las muestras problema se atemperan a 50 °C antes de añadir la tira de papel de filtro. Es importante que el papel quede sumergido, en su mayor parte, en la mezcla de reacción. La incubación de las muestras se realiza durante 60 minutos a 50 °C en un baño con agitación.

- Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se añaden 3 ml del reactivo DNS a todos los tubos, incluyendo muestras problema, patrones de glucosa, blanco de enzima y cero. Después de agitar se introducen durante cinco minutos en un baño con agua hirviendo y se transfieren posteriormente a un baño de agua fría. Se añaden 20 ml de agua destilada a cada tubo y, se agitan invirtiéndolos varias veces hasta que la mezcla sea uniforme. Luego se dejan reposar unos 20 minutos para que la pulpa de papel se deposite en el fondo de los tubos y se lee la densidad óptica del sobrenadante a 500 nm frente a la muestra cero.



Fotografía 9-2: Determinación de la actividad de celulasa sobre el papel filtro.

Realizado por: Cristian Centeno

2.9.1.1. Cálculo de las UPF de la solución enzimática:

- Ajustar los valores de absorbancia obtenidos para los distintos patrones de glucosa a una recta.
- Calcular sobre la ecuación de esa recta los valores de glucosa que corresponderían a las absorbancias obtenidas para las muestras problema (después de deducir el valor del blanco de enzima correspondiente).
- Representar en papel semilogarítmico los valores de glucosa obtenidos frente a las concentraciones (inversas de las diluciones) de solución de enzima correspondiente, y estimar el valor de la concentración que liberaría exactamente 2 mg. de azúcares reductores:

$$\frac{UPF}{ml} \cdot \text{de solución de enzima original} = \frac{0.37}{c} \quad \text{Ecuación 3-2}$$

Donde:

c= concentración de enzima que liberaría 2.0mg de glucosa.

2.6.9.2. Determinación de la actividad sobre CMC

- Según (Ghose, 1987). Deben hacerse al menos dos diluciones en tampón citrato de la solución de enzima cuya actividad se quiere medir. Una de ellas debe de liberar en el medio de reacción algo menos de 0,5 mg y la otra algo más de 0,5 mg de azúcares reductores expresados como glucosa.
- Los patrones de glucosa se preparan a partir de una solución de glucosa en tampón citrato 0,5 M pH 4,8 a una concentración de 5 mg/ml. Las diluciones realizadas con el mismo tampón citrato deben tener una concentración final de 1,0, 0,7, 0,5 y 0,25 mg en 0,5 ml respectivamente.
- La reacción enzimática se lleva a cabo en tubos de ensayo de unos 25 ml de capacidad. En la siguiente tabla, se detallan los volúmenes de reactivos que deben incorporarse en las distintas muestras.

Tabla 5-2: Actividad sobre CMC

	Muestra problema	Patrones de glucosa	Enzima blanco	Cero
CMC1%	0.5ml	----	----	----
Solución de enzima	0.5ml	----	0.5ml	----
Glucosa	----	0.5ml*	----	----
Tampón citrato	----	0.5ml	0.5ml	1

*de la dilución de glucosa correspondiente.

Realizado por: Cristian Centeno, 2017

Fuente: Ghose, 1987

- Las muestras problema se incuban a 50°C durante 30 minutos en un baño de agitación-Transcurrido este tiempo se añaden 3 ml de DNS a todos los tubos incluyendo muestras problema, patrones de glucosa, blanco de enzima y cero. Se agitan y se introducen en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos, transcurridos los cuales se transfieren a un baño de agua fría. Se añaden 20 ml de agua destilada a cada uno de ellos, se agitan y se lee la densidad óptica de las muestras a 540 nm frente a la muestra cero.



Fotografía 10-2: Determinación de la actividad de CMC.

Realizado por: Cristian Centeno

2.9.2.1. *El cálculo de la actividad en la solución de enzima problema se realizan según se detalla a continuación:*

- Ajustar los valores de absorbancia obtenidos para los distintos patrones de glucosa a una recta.
- Calcular sobre la ecuación de la recta los valores de glucosa que corresponden a las absorbancias obtenidas para las muestras problema (después de deducir el valor del blanco de enzima).
- Representar en papel semilogarítmico los valores de glucosa obtenidos frente a las concentraciones (inversas de las diluciones empleadas) de solución de enzima correspondientes y estimar el valor de la concentración que liberaría exactamente 0,5 mg de azúcares reductores.

$$\frac{UI}{ml} \text{ de la solución de enzima} = \frac{0.185}{c} \quad \text{Ecuación N° 4-2}$$

Donde:

c= concentración de enzima que liberaría 0.5mg de glucosa.

2.6.9.3. *Determinación de la actividad sobre xilanas*

Para la realización de este método se tomó como referencia (Cortez, 2015, pp-31-32) para cada muestra de crudo enzimático correctamente diluido es el siguiente:

- En un tubo con rosca se agrega 1 mL de solución de Birchwood xilano al 0,5% p/v en buffer de citrato 0,05 M y pH de 5,3.
- Se agrega 0,5 mL de extracto enzimático crudo correctamente diluido.

- Se incuba la muestra a 50 °C por un tiempo de 10 minutos para que se forme xilosa.
- Después del tiempo de incubación se agrega 1,5 mL de DNS.
- Se hierven las muestras en baño maría por 5 minutos, luego se dejan enfriar en baño de agua helada por aproximadamente 45 minutos.
- Se mide la absorbancia a una longitud de onda de 546 nm y se registran los valores obtenidos.
- Con los valores de absorbancia obtenidos y con ayuda de la curva de calibración se calcula la concentración de enzima.

Para la elaboración de la curva de calibración fueron preparadas de acuerdo a lo descrito en la siguiente tabla:

Tabla 6-2: Preparación de la curva de calibración

Tubos de ensayo	Xilosa (mg/mL)	Volumen (mL) Xilosa (1mg/mL)	Volumen (mL) Agua destilada
Blanco	0	0	1,5
1	0,1	0,15	1,35
2	0,2	0,3	1,2
3	0,3	0,45	1,05
4	0,5	0,75	0,75
5	0,75	1,13	0,37

Realizado por: Cristian Centeno, 2017

Fuente: Cortez, 2015

- Después de agregar cada uno de los reactivos descritos en la tabla se procede a agregar 1,5 mL de DNS.
- Se hierven las muestras a baño maría durante 5 minutos, luego se deja enfriar en baño de agua helada durante aproximadamente 10 min.
- Se mide la absorbancia a una longitud de onda de 546 nm y con los datos obtenidos se construye la curva de calibración.

2.6.9.4. Determinación de proteína

Para la determinación de proteínas se usó el método de Biuret por lo cual para la preparación del Reactivo de Biuret se realizó lo siguiente:

Disolver 3,8 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 6,7 g NaEDTA en 700 ml de H_2O . Mientras se agita añadir 200 ml de NaOH 5N y luego 1g de KI como estabilizante. Guardar en frasco de plástico.

Una vez preparado el reactivo de Biuret se añadió 1 ml del reactivo de biuret a los tubos estándar y muestras problemas preparadas como se indica en la Tabla.

Dejar a temperatura ambiente y leer la Absorbancia a 545 nm frente al blanco. El color es estable 1 hora (Reyes y Galván, 2012).

Tabla 7-2: Protocolo tipo para la cuantificación de proteínas por el método de Biuret

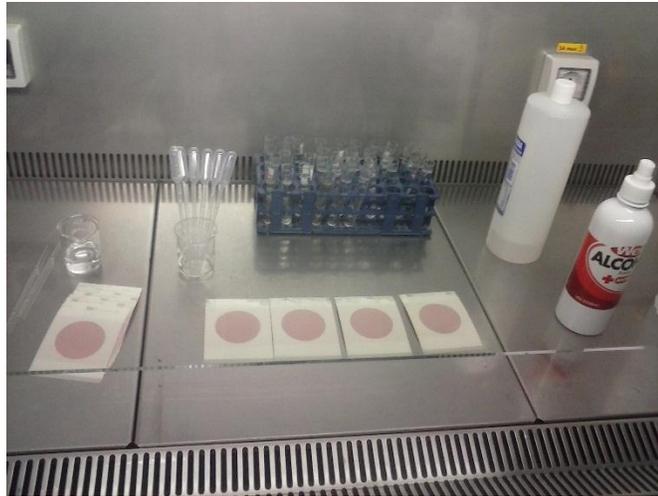
Tubos	Estándar (20mg/ml)	Agua	Reactivo de Biuret
Blanco	0 μl	100 μl	1 ml
1	25 μl	75 μl	1 ml
2	50 μl	50 μl	1 ml
3	75 μl	25 μl	1 ml
4	100 μl	0 μl	1 ml
Muestras	100 μl	0 μl	1 ml

Realizado por: Cristian Centeno, 2017

Fuente: Reyes y Galván, 2012.

2.7. Determinación de Coliformes en extracto enzimático

Para la determinar si existe presencia de Coliformes totales, E. coli se utilizó placas Petrifilm TM con tres repeticiones cada una de las muestras. La siembra consistió en una dilución de la muestra del extracto enzimático en tres tubos etiquetados desde la 10^{-1} a la 10^{-3} , añadidos a cada uno 9 mL de agua destilada y 1 mL de la muestra del extracto enzimático puro en el tubo 10^{-1} del mismo tubo se coge con una nueva pipeta 1mL de la disolución, así hasta la 10^{-3} ; a los tubos se agitaron durante 60 segundos para que exista homogeneidad del contenido. Se suspendió al film inferior un 1mL del último tubo correspondiente de la muestra disuelta se realizó una presión leve del dispensor en el film superior para distribuir el inóculo por la zona circular. Se esperó 1 minuto para que se solidifique el gel, para luego proceder a ser incubado a 32 °C durante un lapso de 24 h.



Fotografía 11-2: Determinación de presencia de coliformes totales, E. coli
Realizado por: Cristian Centeno

CAPITULO III

3. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

3.1. Evaluación de los residuos agroindustriales abundantes y de bajo costo como sustratos para la producción de un crudo enzimático utilizando una cepa de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™).

En la presente investigación se estudiaron tres tipos de residuos agroindustriales (Afrecho cervecero, salvado de trigo, salvado de soya) como fuente principal de carbono para la producción de enzimas extracelulares. Los residuos agroindustriales fueron sometidos a un pre tratamiento químico con H_2SO_4 para así lograr romper los enlaces éter de la lignina presente, a excepción del afrecho cervecero debido a que este sustrato tiene ya previamente un tratamiento químico.

Al sustrato seco se adicionó un medio suplementario para así ajustar a una humedad del 80% y a su vez ayude como un refuerzo nutritivo (Arguero, 2014). Posteriormente al pre tratamiento químico se analizó el contenido de fibra y pH de cada uno de ellos.

Tabla 3-1: Resultados de pH y fibra de los residuos agroindustriales.

Sustrato	Contenido de fibra (%)	pH del sustrato
Afrecho cervecero	32.44	7.35
Salvado de trigo	15.28	6.87
Salvado de soya	5.40	7.09

Realizado por: Cristian Centeno, 2017

De los resultados obtenidos de la Tabla:3-1, el contenido de fibra de los tres sustratos agroindustriales, con mayor porcentaje de fibra se encuentra el afrecho cervecero, a su vez los valores de pH obtenidos se encuentran dentro del rango deseado, ya que según (Vásquez, 2008) menciona que una vez realizado el pre tratamiento químico se debe estabilizar hasta un pH de 7.

En base a Bansal, *et al.* (2012), un sustrato sólido ideal debe proporcionar todos los nutrientes necesarios al microorganismo en crecimiento para una función óptima. Sin embargo, algunos de los nutrientes pueden estar disponibles en concentraciones subóptimas, o incluso no estar presentes en el sustrato. En tales casos, es necesario complementarlos externamente por esta razón se usó como aditivo la adición de un medio suplementario.

3.2. Caracterización del proceso de fermentación extractiva de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™) aplicando indicadores bioquímicos y microbiológicos.

El proceso de fermentativo aplicado fue en medio sólido, teniendo en cuenta el uso de los tres sustratos y el suplemento de nutrientes. Una vez obtenido el extracto enzimático se procedió a evaluar factores bioquímicos como la concentración de proteínas y la producción de celulasas y xilanasas, en cuanto a los microbiológicos se analizó coliformes totales y fecales.

3.2.1. Determinación de concentración de las enzimas Celulasas, Xilanasas por *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC 6275) y proteínas.

3.2.1. Proteínas

3.2.1.1. Curva de calibración

Tabla 2-3: Curva de calibración para la cuantificación de proteínas.

Concentración (mg/ml)	Valor de Absorbancia 545nm
0,1	0,034
0,2	0,071
0,4	0,142
0,8	0,277
1	0,345

Realizado por: Cristian Centeno, 2017

3.2.1.2. Datos de la concentración de proteínas bajo FES de *A. niger*.

Tabla 3-3: Evolución en el tiempo de la producción de proteínas bajo FES de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™), en diferentes fuentes de carbono.

Tiempo (h)	Afrecho Cervecerero (mg/ml)	Salvado de Trigo (mg/ml)	Salvado de Soya (mg/ml)
72	0,166	0,299	0,379
120	0,141	0,184	0,418
168	0,107	0,236	0,508
216	0,115	0,211	0,575

Realizado por: Cristian Centeno, 2017

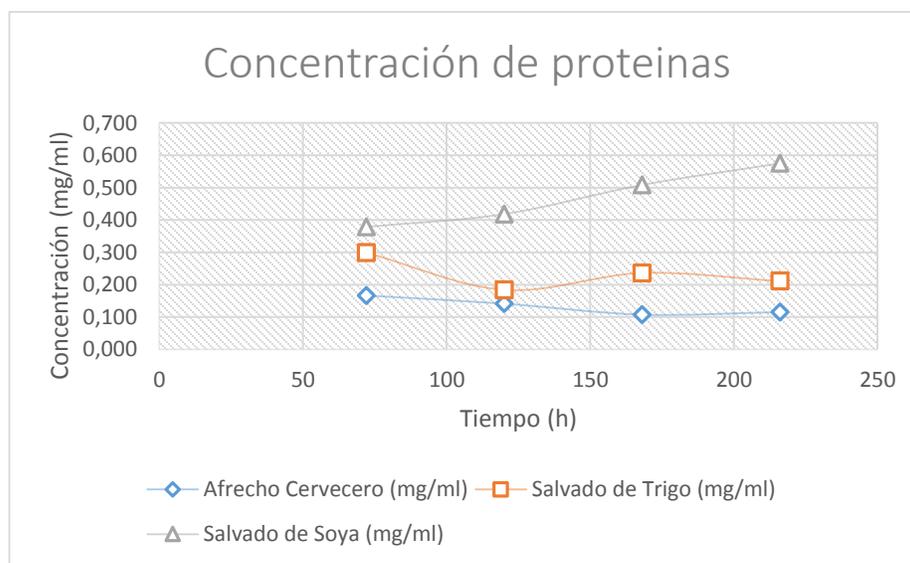


Figura 1-3: Gráfico de la evolución en el tiempo de la producción de proteínas bajo FES de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™), en diferentes fuentes de carbono.

Realizado por: Cristian Centeno, 2017

Cuando se obtuvo los resultados de la concentración de proteínas en las diferentes muestras obtenidas por el método de Biuret, se conoció que el sustrato con mayor concentración de proteínas fue el salvado de soya en comparación con los otros dos sustratos, la mayor concentración de proteínas totales se encontraba a las 216 h de incubación con una concentración de 0.575 mg/ml, así como también se obtuvo la menor concentración de proteínas en el afrecho cervecero en un tiempo de incubación de 168 horas con un valor de 0.107 mg/ml. Algunos investigadores como Matute L (2014, pp. 48-56) afirman que este incremento es atribuible al crecimiento del hongo en el medio de cultivo, ya que la estructura celular de este moho presenta un alto contenido de proteínas.

3.2.2. Celulasas

La celulasa analizada en la investigación fue: Endoglucanasa que fue determinada por el método de Carboximetil Celulasa. Exoglucanasa está enzima en cambio fue analizada por el método de Papel Filtro. A continuación se detallan los resultados obtenidos:

3.2.2.1. Endoglucanasa.

3.2.2.1.1. Curva de calibración

Tabla 1-3: Curva de calibración para la cuantificación de endoglucanasas.

Concentración(mg/ml)	Valor de Absorbancia 500nm
0,25	0,043
0,5	2,607
0,7	2,7
1	2,73

Realizado por: Cristian Centeno, 2017

3.2.2.1.2. Datos de la concentración de endoglucanasa bajo FES de *A. niger* van Tieghem (ATCC® 6275™)

Tabla 2-3: Evolución en el tiempo de producción de endoglucanasa bajo FES de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™), en diferentes fuentes de carbono.

Tiempo (h)	Afrecho Cervecerero (UI.ml ⁻¹)	Salvado de Trigo (UI.ml ⁻¹)	Salvado de Soya (UI.ml ⁻¹)
72	1,508	1,552	1,500
120	2,503	2,447	1,881
168	2,651	2,123	2,071
216	2,843	2,23	2,286

Realizado por: Cristian Centeno, 2017

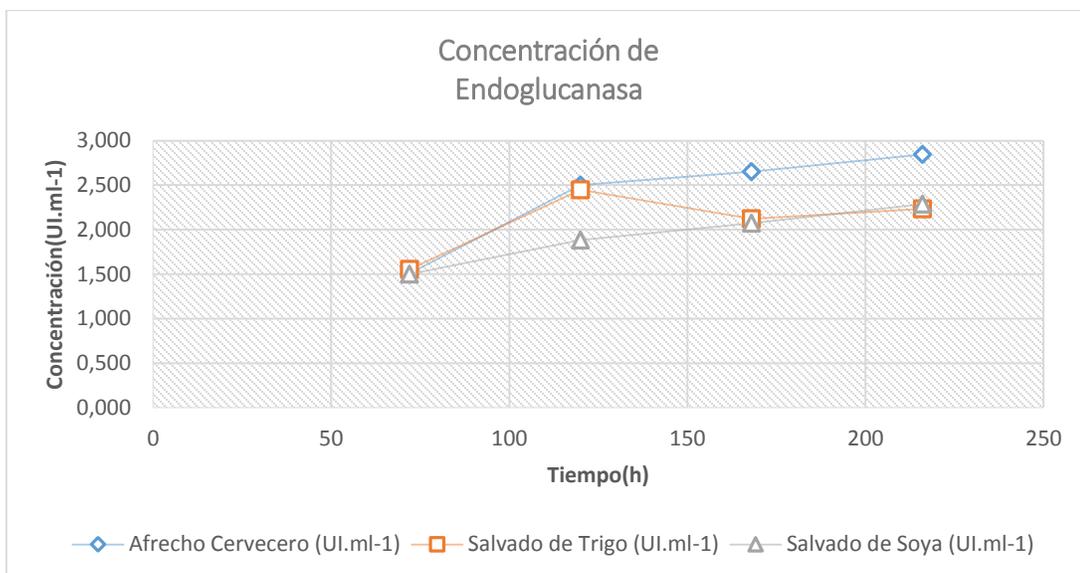


Figura 2-3: Grafico de la evolución en el tiempo de la producción endoglucanasas bajo FES de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™), en diferentes fuentes de carbono.

Realizado por: Cristian Centeno, 2017

3.2.2.2. Exoglucanasas

3.2.2.2.1. Curva de calibración

Tabla 3-3: Curva de calibración para la cuantificación de exoglucanasa.

Concentración(mg/0,5ml)	Absorbancia
0,25	0,043
0,5	2,607
0,7	2,7
1	2,73

Realizado por: Cristian Centeno, 2017

3.2.2.2.2. Datos de la concentración de exoglucanasa bajo FES de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™)

Tabla 4-3: Evolución en el tiempo de la producción exoglucanasa bajo FES de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™), en diferentes fuentes de carbono.

Tiempo (h)	Afrecho Cervecerero (UI.ml ⁻¹)	Salvado de Trigo (UI.ml ⁻¹)	Salvado de Soya (UI.ml ⁻¹)
72	5,540	5,298	4,953
120	6,103	5,700	5,663
168	5,876	5,962	5,829
216	5,827	5,962	5,763

Realizado por: Cristian Centeno, 2017

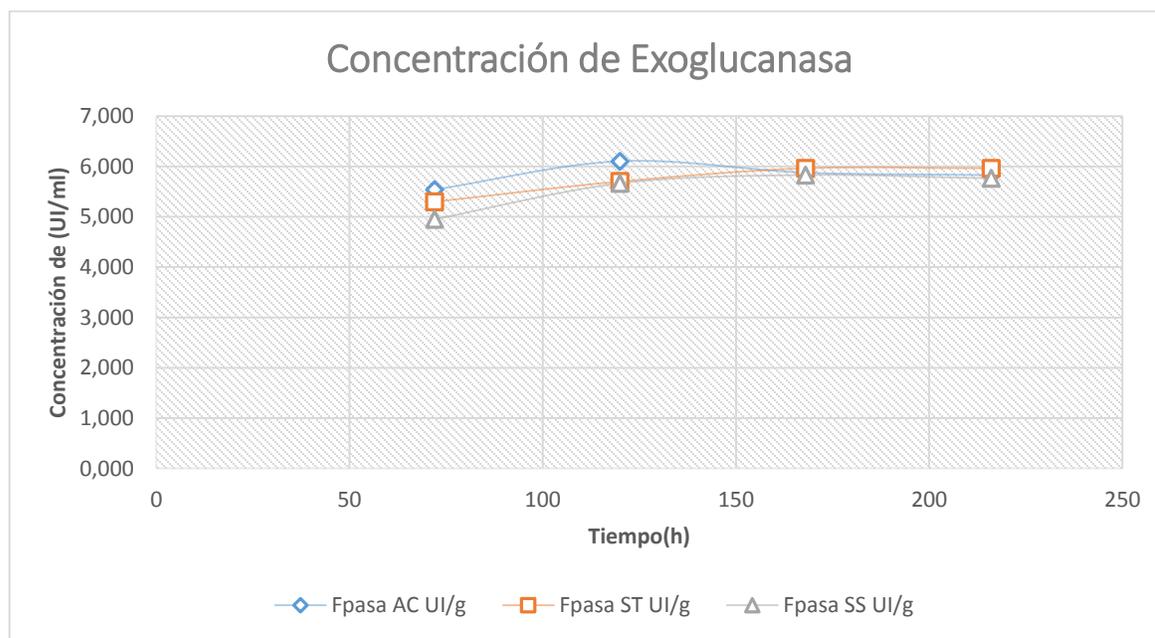


Figura 3-3: Gráfico de la evolución en el tiempo de la producción exoglucanasa bajo FES de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™), en diferentes fuentes de carbono.

Realizado por: Cristian Centeno, 2017

El hongo *Aspergillus niger* según Ncube, T (2015, pp. 119-127) ha demostrado que puede ser un candidato potencial para la producción de enzimas porque el hongo es fácil de manipular y produce

grandes cantidades de enzimas extracelulares, además es capaz de crecer fácilmente en una gran cantidad de residuos agroindustriales.

Entre las diferentes fuentes de carbono probadas se encontró que el afrecho cervecero genero mayor producción enzimática extracelular (celulasas) en comparación con los otros residuos agroindustriales, este residuo agroindustrial es un subproducto de la cervecería y cuenta con un porcentaje alto de proteína y es altamente digestible (Carrión, 2014, pp.28-29).

Según Ncube, T (2015, pp. 119-127) los residuos de granos de cerveza puede ser un sustrato adecuado para la producción de celulasa utilizando *A. niger* por fermentación en estado sólido. La reutilización de subproductos industriales se ha ido incrementado, ya que se ha considerado de un punto de vista económico y ambiental benéfico para las empresas cerveceras. Este subproducto es de suministro continuo, tiene un relativo bajo costo y un valor nutricional potencial (Mussatto S, 2006, pp. 1-14).

En base al mejor sustrato obtenido después de haber transcurrido las 216 h de incubación se obtuvo un mayor rendimiento de (0,561 UI/ml) de endoglucanasas. En el caso de la exoglucanasa el tiempo óptimo de incubación fue de 120 h con rendimiento de (1,218UI/ml).

León Gualberto (2015), uso el afrecho cervecero según como material lignocelulósico para maximizar la productividad del complejo enzimático celulasa y así obtener mejor productividad.

3.2.3. Xilanasa

3.2.3.1. Curva de calibración

Tabla 5-3: Curva de calibración para la cuantificación de xilanasa.

Concentración(mg/ml)	V.Absorbacia 500nm
0,25	0,101
0,5	0,331
0,7	0,521
1	0,61

Realizado por: Cristian Centeno, 2017

3.2.3.2. Datos de la concentración de exoglucanasas bajo FES de *A. niger* van Tieghem (ATCC® 6275™)

Tabla 6-3: Evolución en el tiempo de la producción xilanasa bajo SSF de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™), en diferentes fuentes de carbono.

Tiempo (h)	AC (mg/ml)	ST (mg/ml)	SS (mg/ml)
72	7,570	2,275	2,209
120	4,790	3,139	2,337
168	4,337	3,935	1,923
216	5,270	4,283	2,491

Realizado por: Cristian Centeno, 2017

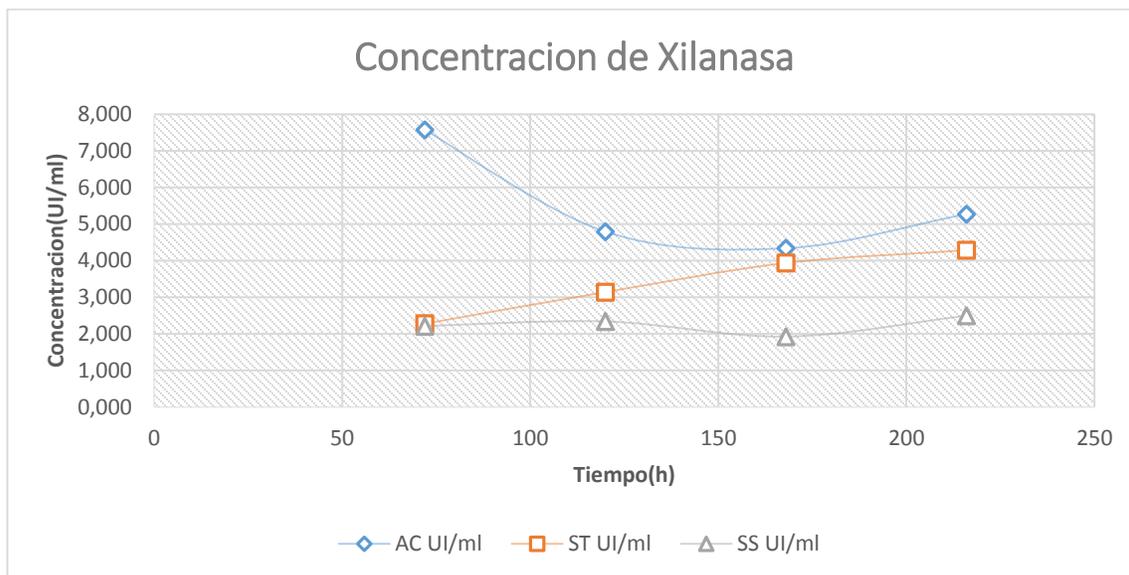


Figura 4-3: Gráfico de la evolución en el tiempo de la producción xilanasa bajo SSF de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™), en diferentes fuentes de carbono.

Realizado por: Cristian Centeno, 2017

En el estudio realizado En este estudio la cepa de *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™), el afrecho cervecero fue capaz de producir xilanasa en mayor cantidad en comparación a los demás sustratos. La xilanasa de *Aspergillus. niger* es una nueva enzima, que actualmente es poco

producida en las grandes empresas debido a su baja concentración de producción (Izidoro, et al. 2014).

En cuanto a la producción de xilanasa se obtuvo mayor concentración en el tiempo de 72 h de incubación con un rendimiento de 3,468 mg/ml y en menor producción se obtuvo el salvado de soya en el tiempo de 68 horas con una concentración de 1,923 mg/ml. Con estos resultados podemos determinar que la mayor concentración del crudo enzimático se dio gracias al afrecho cervecero. El uso del afrecho cervecero como sustrato para la producción de xilanasa ayuda a la disminución de este desperdicio, pero también reduce el costo de producción de xilanasa.

3.3. Determinación de los costos y aplicaciones de los productos de esta tecnología.

3.3.1. Relación Beneficio/Costo

Tabla 7-3: Análisis económico mediante el indicador beneficio costo de la obtención del crudo enzimático por *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™)

Rubro	Unidad	Costo, \$	S1	S2	S3
Hongo <i>Aspergillus niger</i>	1 Isopos	109.44 \$	36.48\$	36.48\$	36.48\$
Agar Patata Dextrosa (PDA)	500 g	70 \$	28\$	28\$	28\$
Ácido Sulfúrico	2.5 L	35\$		0.14\$	0.14\$
Agua destilada	1 galón	4 \$	16\$	24\$	24\$
Tween 80	500 ml	31 \$	0.10\$	0.10\$	0.10\$
Extracto de levadura	500 g	80 \$	1.60\$	1.60\$	1.60\$
Fosfato de Amonio	500 g	48.75\$	0.98\$	0.98\$	0.98\$
Sulfato de Magnesio heptahidratado	500 g	15 \$	0.30\$	0.30\$	0.30\$
Sulfato de Hierro heptahidratado	500 g	15 \$	0.30\$	0.30\$	0.30\$
Fosfato de Potasio	500 g	20.63 \$	0.41\$	0.41\$	0.41\$
Sulfato de Zinc heptahidratado	500 g	15 \$	0.30\$	0.30\$	0.30\$
Sulfato de Cobre heptahidratado	500 g	83.61\$	1.67\$	1.67\$	1.67\$
Buffer de Acetatos	250 ml	14 \$	5.60\$	5.60\$	5.60\$
Buffer de Citrato	250 ml	14 \$	5.60\$	5.60\$	5.60\$
Buffer de Fosfatos	250 ml	14 \$	5.60\$	5.60\$	5.60\$

Tartrato Doble de Sodio y Potasio	500 g	29 \$	11.60\$	11.60\$	11.60\$
Acido Di – Nitro Salicílico	25 g	35\$	14\$	14\$	14\$
Hidróxido de Sodio	1 Kg	22\$	2.20\$	2.20\$	2.20\$
Glucosa	500 g	18.50 \$	0.37\$	0.37\$	0.37\$
Albumina Sérica	10 g	5 \$	0.50\$	0.50\$	0.50\$
D – Xylosa	100 g	55 \$	11\$	11\$	11\$
Xilano	50 g	30 \$	6\$	6\$	6\$
Carboximetil celulosa SIGMA	500 g	37.50 \$	0.75\$	0.75\$	0.75\$
Placas petrifil	25 unt	64 \$	30.72\$	30.72\$	30.72\$
Cajas petri de vidrio	1 cajas	1.39\$	13.90\$	13.90\$	13.90\$
Materiales de limpieza y desinfección		15 \$	5 \$	5 \$	5 \$
Residuos agroindustriales	1 Kg	2.50 \$	2.50 \$	2.50 \$	2.50 \$
Manejo					
Mano de obra	jornal	400 \$	133\$	133\$	133\$
Análisis de laboratorio	1 muestras	10.36 \$	10.36 \$	10.36 \$	10.36 \$
Egresos			354.74\$	362.88\$	362.88\$
Venta de enzimas (250ml)			459.95\$	459.95\$	459.95\$
Ingresos			459.95\$	459.95\$	459.95\$
B/C			1.30\$	1.27\$	1.27\$

Realizado por: Cristian Centeno

En el estudio económico realizado sobre la producción del extracto enzimático (celulasa, xilanas) evaluando diferentes sustratos e intervalos de tiempo, se determinaron los costos incurridos en cada uno de los tratamientos y durante el proceso de producción, así representados por la utilización de reactivos, materiales, análisis de laboratorio, transporte, mano de obra, por otra parte los ingresos estuvieron representados por la venta del extracto enzimático (celulasa, xilanas), costo que fue cotizado a la empresa Espectrocrom ubicado en la ciudad de Quito-Ecuador. Demostrando así que la mayor rentabilidad para la producción del extracto enzimático (celulasa, xilanas) tiene un beneficio/costo de 1,30 USD es decir por cada dólar invertido se recupera esa inversión y se tiene una ganancia de 0,30 dólares.

El extracto enzimático que contiene enzimas lignocelulolíticas es prometedor como un medio para incrementar la utilización de forraje y mejorar la eficiencia productiva de los rumiantes, existen numerosos microorganismos que degradan eficazmente la celulosa y hemicelulosa a través de enzimas como las celulasas y hemicelulasas (Facchini; et al, 2011).

CONCLUSIONES

- En el estudio realizado podemos determinar que *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™), tiene un gran potencial para producir enzimas (celulasa y xilanasas), utilizando sustratos como salvado de trigo, salvado soya, afrecho cervecero, brindando así un valor agregado a estos residuos.
- La fermentación en estado sólido representa una técnica de cultivo apropiada para la producción de enzimas (celulasas y xilanasas) por *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™), usando como mejor sustrato el afrecho cervecero.
- El tiempo óptimo para la producción de endoglucanasas es de 216 h de incubación con un rendimiento de 2.483 UI.ml⁻¹, en el caso de la exoglucanasa el tiempo de incubación óptimo es de 120 h de incubación con un rendimiento de 6.103 UI.ml⁻¹, finalmente con un tiempo de 72 h de incubación obteniendo un rendimiento de 7.570 mg.ml⁻¹ para la xilanasas.
- Durante el proceso de fermentación extractiva del *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™), se realizó los análisis bioquímicos y microbiológicos dando así como resultado la ausencia de agentes contaminantes en las muestras del extracto enzimático.
- En base a los análisis económicos realizados en base a la producción de enzimas (celulasas, xilanasas) a nivel laboratorio se obtiene mayor rentabilidad, así estableciéndose un índice de Beneficio – Costo de 1,30 USD

RECOMENDACIONES

- Al trabajar con *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™), se deben tomar en cuenta que es un hongo esporula y presenta riesgos para la salud, para lo cual se debe manipular en una cámara de flujo laminar usando las medidas de protección adecuadas y con mucha precaución.
- Para mayor producción de enzimas extracelulares en Fermentación en estado sólido es recomendable trabajar en recipientes que representen una mayor cantidad de expansión horizontal para mayor propagación del *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™), trabajando así a con un tiempo máximo de fermentación entre el rango de 72 – 120 horas, una temperatura de 25 °C, pH de 7, sustrato de afrecho cervecero, tamaño de partícula de 0,05 mm.
- Al obtener el extracto enzimático (celulasa, xilanasa), se debe dar uso inmediato, debido que a medida que transcurre el tiempo disminuye la concentración de las enzimas. Se debe mantener a una temperatura de 4°C durante el tiempo máximo de 7 días.
- En cuanto a la aplicación tecnología para la producción de enzimas existen equipos limitados para lograr dicho objetivo por lo cual se recomienda buscar medio alternativos que ayuden a lograrlo.
- Se recomienda realizar un análisis microbiológico una vez concluido cada proceso así evitar posteriormente la presencia de microorganismos dañinos que afecten al crudo enzimático.

BIBLIOGRAFIA

1. **ARCE CERVANTES, O.** Producción de extractos enzimáticos a partir de *Fomes sp.* EUM1 y su evaluación en condiciones ruminales (Tesis) (doctoral). Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa-México. 2012. p. 13 [Consulta: 26 mayo 2017]. Disponible en: <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/aspuam/presentatesis.php?recno=15849&docs=UAMI15849.pdf>
2. **ARGUERO TATUPANTA, Adriana Patricia.** Estudio de la producción de Amilasa mediante *Aspergillus niger* por fermentación sólida, con el uso de residuos agroindustriales. (Tesis) (Ingeniería). [En línea]Escuela Politécnica Nacional, Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria. (Quito - Ecuador). 2014. P. 53 [Consulta: 25 de febrero]. Disponible en: <http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/7349/1/CD-5494.pdf>
3. **Blog de Biología.** *Factores que afectan la actividad enzimática* [blog]. [Consulta:29 mayo 2017]. Disponible en: <https://www.blogdebiologia.com/factores-que-afectan-la-actividad-enzimatica.html>
4. **CARMONA, Juan C.** “El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo”. Colombian journal of animal science and veterinary medicine [En línea], 2005, (Colombia), pp. 49-63. [Consulta: 11 noviembre 2017]. ISSN: 0120-0690. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/2950/295022952006.pdf>
5. **CHACON, O.** “ Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos”. *Universidad y ciencia.* [En línea], 2005, Mexico, Vol 21, Núm 42, pp. 113-114 [Consulta: 17 junio 2017]. Disponible en: <http://www.universidadyciencia.ujat.mx/sistema/documentos/volumenes/21-42-2005/6.pdf>
6. **CORTEZ CEVALLOS, Ian Alberto.** *Obtención de xilanasa con micelios de Penicillium corylophilum y Asperillus terreus fermentados en desecos de piña y maracuya.* [En línea] (tesis).

- (Ingeniería) [Pregrado] Universidad Central del Ecuador, Quito - Ecuador, 2015. p.1 [Consulta: 2017-11-11]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/3787/1/T-UCE-0017-107.pdf>
7. **CARRION ABAD, A.** Evaluación de tres niveles de afrecho de cervecería mas maíz en la alimentación de vacas meztisas de leche en el cantón Ponce Enríquez Provincia del Azuay (Tesis) (Ingeniería). [Pregrado] Universidad Nacional de Loja, Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Loja-Ecuador. 2014. pp. 28-29 [Consulta: 26 mayo 2017]. Disponible en: <http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/11652/1/Tesis%20Anibal%20%28revisada%29.pdf>
 8. **CASTILLO RODRIGUEZ, F.** Biotecnología Ambiental, [en línea]. Madrid-España, Editorial Tébar, S.I., 2005. [Consulta: 29 mayo 2017]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=19ffPAm3E3kC&pg=PA303&lpg=PA303&dq=factores+que+afectan+la+produccion+de+enzimas&source=bl&ots=BQrhnn5VHK&sig=gz_83zEkp11TVQL_L9Lzzjoihzw&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwibzKbb64jUAhXC4SYKHUyjC_cQ6AEIPTAF#v=onepage&q=factores%20que%20afectan%20la%20produccion%20de%20enzimas&f=false
 9. **DOMINGUEZ MERCHAN, J.** Evaluación del valor nutritivo de las principales materias primas que se utilizan en la alimentación de vaconas de 12-24 meses de edad en el cantón Cayambe (Tesis) (Ingeniería). [Pregrado] Universidad Politécnica Salesiana, Escuela de Ingeniería Agropecuaria. Quito-Ecuador. 2014. pp. 27-28 [Consulta: 26 mayo 2017]. Disponible en: <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/9835/1/YT00248.pdf>
 10. **GIRALDO, L. A; et al. Sapiens.** “Effect of enzyme application method on in vitro rumen fermentation of tropical forages”. *Journal Animal Feed Science*. [En línea].2004, (Colombia). pp. 63-66. [Consulta: 11 noviembre 2017]. ISSN: 1230³1388. Disponible en: <http://www.jafs.com.pl/Effects-of-enzyme-application-method-on-in-vitro-nrumen-fermentation-of-tropical-forages,73739,0,2.html>

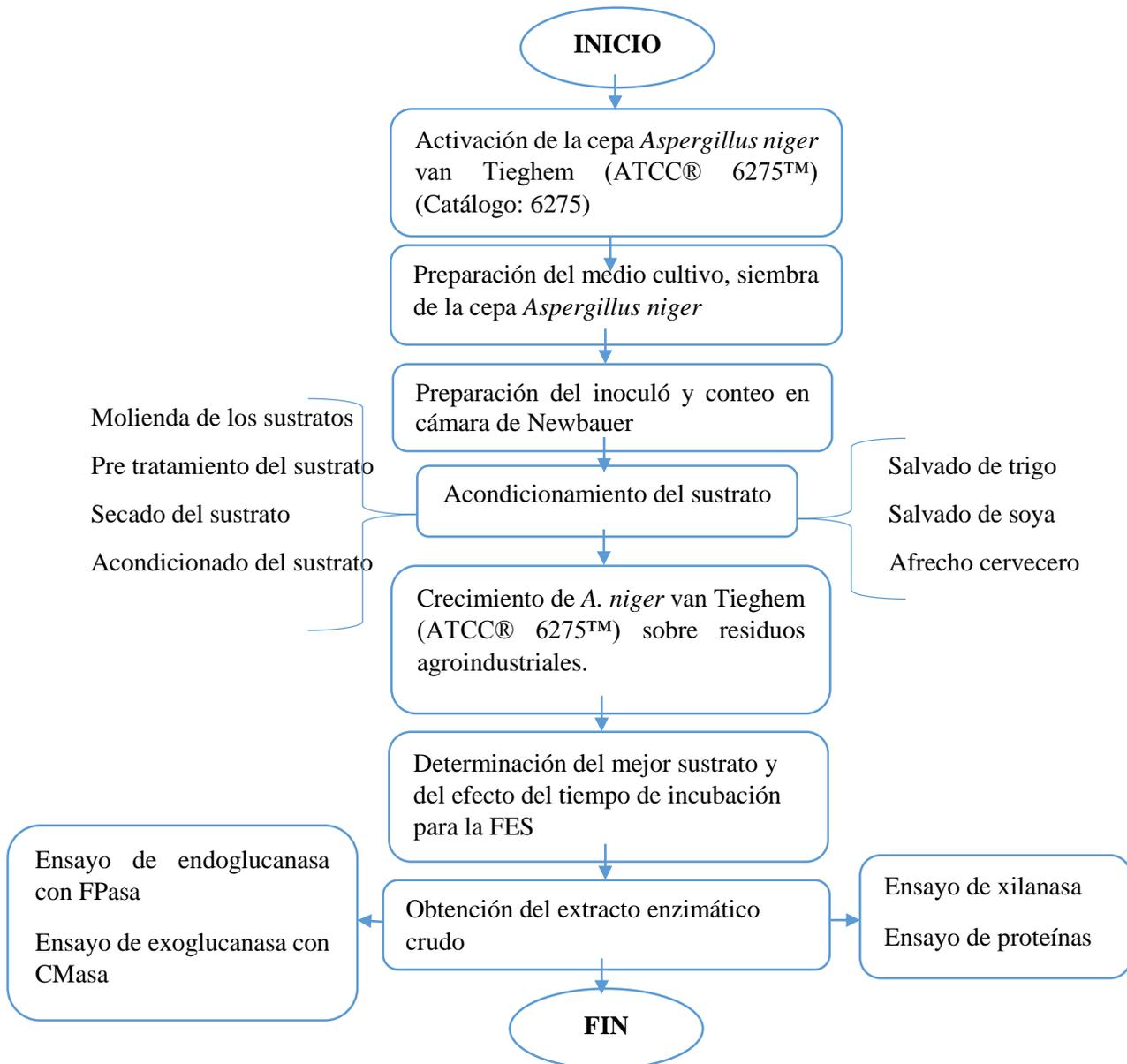
11. **GIRALDO, L. A; et al. Sapiens.** “Influence of exogenous fibrolytic enzymes and fumarate on methane production, microbial growth and fermentation in Rusitec fermenters”. *British Journal of Nutrition*. [En línea].2007, (España), pp. 753–761. [Consulta: 11 noviembre 2017]. Disponible en: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.831.7721&rep=rep1&type=pdf>
12. **GHOSE.** “Measurement of cellulase activities” *Pure and Appl. Chem.* Vol. 59. N°2. [En línea].1987, (India), pp. 257 - 268. [Consulta: 11 noviembre 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17475087>
13. **FAO.** *Agroindustrias para el desarrollo*. [En línea]. Roma: C. A. Da Silva, 2013. [Consulta: 11 noviembre 2016]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i3125s.pdf>
14. **Instituto Nacional de Tecnología Industrial.** *Biotecnología Industrial |biotecnología y medio ambiente* [en línea]. . [Consulta: 26 mayo 2017]. Disponible en: <http://www.inti.gov.ar/biotecnologia/index.php?seccion=ambiente>
15. **IZARRAL, M; et al. Sapiens.** “Influencia de la concentracion de inculo en la produccion de celulasa y xilanas por *Aspergillus niger*”. *Revista Colombiana de Biotecnología* [en línea], 2010, Colombia, Vol 12, Núm 2, p. 2. [Consulta: 26 mayo 2017]. ISSN 1909-8758. Disponible en: <http://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/18555/38208>
16. **LUNA AGUILAR, G.** Obtención de balanceado a partir de los desechos del maracuyá (*Passiflora Edulis* Variable *Flavicarpa*) para ganado vacuno (Tesis) (Ingeniería). [Pregrado] Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ingeniería Química, Escuela de Ingeniería Química. Quito-Ecuador. 2014. pp.14-36[Consulta: 26 mayo 2017]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/3778/1/T-UCE-0017-75.pdf>
17. **MORALES, Bran.** *Microorganismos en la industria* [blog]. [Consulta: 26 mayo 2017]. Disponible en: <http://biotecindustrial.blogspot.com/>

- 18. MORAL, Sandra. Et al.** “Aspectos relevantes del uso de enzimas en la industria de los alimentos” vol. 3, n° 2(2015), (México) p. 94. [Consulta: 26 mayo 2017]. ISSN 2334-2501. Disponible en: <http://www.reibci.org/publicados/2015/mayo/1000102.pdf>
- 19. MARIN ALVARADO, R.** Caracterización y expresión recombinante de una celulasa de origen Antártico (Tesis) (Ingeniería). [Pregrado] Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología. Chile. 2007. pp. 11-13 [Consulta: 17 junio 2017]. Disponible en: http://www.tesis.uchile.cl/tesis/uchile/2007/marin_ra/sources/marin_ra.pdf
- 20. OCAMPO, R; et al. Sapiens.** “Un análisis del metabolismo de *Aspergillus niger* crecimiento sobre un sustrato solido”. Revista Mexicana de Ingeniería Química [en línea], 2003, (Mexico), vol. 12, (núm. 1), p. 3. [Consulta: 26 mayo 2017]. ISSN: 1665-2738 Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/620/62028007005.pdf>
- 21. PEÑAFIEL ACOSTA, S; et al. Sapiens.** “ Utilización de residuos agroindustriales para la producción de proteína microbiana”. *European Scientific Journal*. [En línea], 2015, Ecuador, vol 11, pp. 1-10[Consulta: 11 noviembre 2017]. ISSN 1857- 7431. Disponible en: <http://eujournal.org/index.php/esj/article/viewFile/6270/6042>
- 22. Salud y bienestar.** *El efecto pH sobre las enzimas* [blog]. [Consulta: 17 Junio 2017]. Disponible en: <https://lasaludi.info/ph-efecto-sobre-enzimas.html>
- 23. RAMÓN AUQUILLA, Pablo A.** Análisis de la Capacidad Degradativa de Residuos Lignocelulósicos Utilizando El Hongo *Pleurotus ostreatus* var. Florida. [En línea] (Tesis). (Ingeniería) [Pregrado] Universidad Politécnica Salesiana, Carrera de Ingeniería Ambiental, Cuenca - Ecuador, 2012. p.25-29 [Consulta: 2017-11-11]. Disponible en: <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/2811/6/UPS-CT002462.pdf>

- 24. TORRES MONTES, M.** Obtención de enzimas hidrolíticas a partir de una cepa del hongo *Aspergillus ficuum* mediante fermentación en medio solido (Tesis) (Licenciatura). Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias. Valdivia-Chile. 2009. pp. 7-9 [Consulta: 26 mayo 2017]. Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2009/fct693o/doc/fct693o.pdf>
- 25. VÁSQUEZ VANEGAS, Anny Milena.** Producción de xilanasas por *Aspergillus sp.* En fermentación sumergida y fermentación en medio solido [En línea] (tesis). (Maestría) Universidad Iberoamericana, México, 2013. p.10. [Consulta: 2017-05-26]. Disponible en: <http://www.bib.uia.mx/tesis/pdf/015774/015774.pdf>
- 26. VINIEGRA GONZALEZ, G.** “Producción de enzimas por *Aspergillus*”. BioTecnología [en línea], 2003, (Mexico),), vol. 8, (núm. 2), p. 20. [Consulta: 26 mayo 2017]. Disponible en: http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2003_2/Produccion_de_enzimas.pdf

ANEXOS

ANEXO A: Protocolo para la obtención del crudo enzimático.



ANEXO B: Procedimiento para la obtención del crudo enzimático.

1. Activación de cepa *Aspergillus niger* van Tieghem (ATCC® 6275™)



2. Propagación de la cepa *Aspergillus niger*



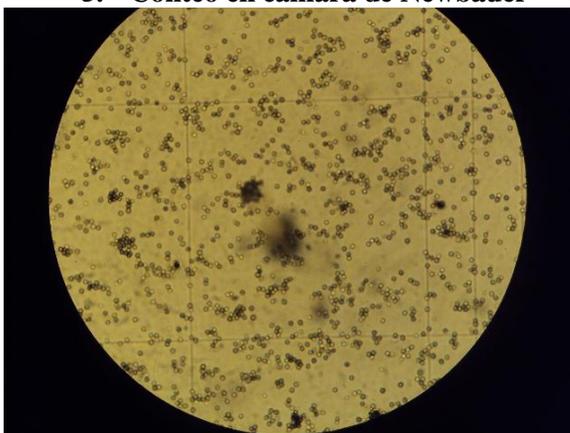
3. Preparación del medio cultivo



4. Preparación del inoculó



5. Conteo en cámara de Newbauer



6. Pre tratamiento del sustrato



7. Secado del sustrato

8. Acondicionado del sustrato



9. Crecimiento de *A. niger* van Tieghem (ATCC® 6275™) sobre residuos agroindustriales.



10. Determinación del mejor sustrato y del efecto del tiempo de incubación para la FES



11. Obtencion del crudo enzimatico.



12. Centrifugación del crudo enzimático.



13. Ensayo de exoglucanasa y exoglucanasa con FPasa



14. Ensayo de endoglucanasa con CMasa



15. Ensayo de xilanas



16. Ensayo de proteínas



17. Determinación de pH



18. Determinación de coliformes



