



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
POSTGRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

BIOCONVERSIÓN DE LA CASCARILLA DE CACAO POR
***Aspergillus niger* PARA LA OBTENCIÓN DE QUITOSANO**

TRABAJO DE GRADO DE MAESTRÍA
Presentado ante la ilustre. Universidad Central de Venezuela por la **Ing. Agr. Gabriela Domínguez R.**, para optar al título de *Magíster Scientiarum* en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

Caracas-Venezuela

Febrero 2012



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
POSTGRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**BIOCONVERSIÓN DE LA CASCARILLA DE CACAO POR
Aspergillus niger PARA LA OBTENCIÓN DE QUITOSANO**

TRABAJO DE GRADO DE MAESTRÍA
Presentado ante la ilustre. Universidad
Central de Venezuela por la **Ing. Agr.**
Gabriela Domínguez R., para optar al
título de *Magister Scientiarum* en
Ciencia y Tecnología de Alimentos.
Tutor: MSc. Annalisse Bertsch

Caracas-Venezuela

Febrero 2012

DEDICATORIA

Quiero dedicarle este trabajo
A Dios que me ha dado la vida y fortaleza
para terminar esta investigación,
A mi tía Cristela que donde quiera que este,
sé que siempre me acompaña
A mi madre por estar ahí cuando más la necesité,
por su ayuda y constante cooperación
A mi esposo José por apoyarme y ayudarme en los
momentos más difíciles.
Y a la gloriosa Universidad Central de Venezuela,
la casa que vence la sombra

AGRADECIMIENTOS

Porque para poder llegar aquí, no hubiese sido posible sin la ayuda, el apoyo y la paciencia de muchas personas que estuvieron combatiendo esta batalla a mi lado, brindándome aliento, fuerzas y sobre todo esperanzas... A todas esas personas quiero gritarles a TODO PULMÓN GRACIAS!!!

A Dios por permitirme vivir y ser parte de esta experiencia

A mi madre por enseñarme a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni decaer en el intento. Me ha dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia y mi empeño, y todo ello con una gran dosis de amor y sin pedir nunca nada a cambio. Gracias mama!

A mi esposo, por su paciencia, por su comprensión, por su empeño, por su fuerza, por su amor, por su lealtad. Gracias! Nunca te podré estar suficientemente agradecida.

A mi amada UCV, por ser cómplice de mis logros, por cobijarme en su seno, compartir conmigo sus conocimientos, bondades y tristezas. Gracias por tanto!

Indudablemente a mi Tutora y amiga Annalisse Bertsch, gracias infinitas por su esfuerzo y dedicación. Sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su persistencia, su paciencia y su motivación han sido fundamentales para mi formación. Gracias infinitas!

A mi familia, sin ellos no podría haber llegado a este punto

A mis tías Cristela Méndez y Cristela Ruiz por su apoyo incondicional en todo momento, tía aunque ya no estás te llevo en mi corazón por siempre!

Al C.D.C.H por ser la institución que financio mis estudios de maestría

A la mejor técnico de la UCV Hazel Román, por ser mi guía y mi cómplice en todo momento, gracias por tu apoyo, sin tu ayuda nunca hubiese logrado culminar esta meta! Gracias!

A la Prof. Lenis Matute y Shimazú Martínez, por su amistad y sus consejos! Gracias por regalarme una sonrisa siempre y hacerme sonreír en los tiempos difíciles.

Al personal de Instituto de Química y Tecnología de la Facultad de Agronomía, Joel, Nelys, Isaias, Carlos, René, Gloria, Julia, por su ayuda y su paciencia.

Al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y a todos los Profesores que allí laboran, por compartir sus conocimientos y permitirme crecer a nivel académico y profesional

A Gaby y Osmara, por su apoyo y por siempre ayudarme de manera desinteresada. Chicas muchas Gracias!

A la Prof. Catalina Ramis, Glendys Salcedo, Jesús Molina, por toda su ayuda para la obtención de la beca y desarrollo de la misma.

Al Prof. Oscar Guevara, Ing. Alexis Rivas, Ing. Agustín Aveledo, Lic. Osmira Campos por tenderme la mano siempre que así lo necesite. Mil gracias.

A la Prof. Marleny Chavarri, por siempre estar dispuesta a ayudarme.

A mis amigas y compañeras de trabajo, Rosmar Narcise, Shelly Aleman, Nora Techeira, Brunilda Perdomo, Audrey Suarez, Marta Cori, muchas gracias por sus palabras de aliento cuando así lo necesite! Gracias

A la Prof. Rosana Figueroa, por sus consejos oportunos, por siempre estar allí y tenderme la mano. Gracias por el cariño!

A la Prof. Isabel Díaz, por su ayuda incondicional. Mil Gracias

A todos los que mi cabeza no pudo extraer esta noche. MIL GRACIAS

RESUMEN

En Venezuela, entre los desechos emanados en grandes volúmenes, se encuentran los producidos por la industria del cacao. De estos, tan sólo la cascarilla obtenida luego del tostado y molienda de los granos de cacao, corresponde a 2270 ton/año. Este residuo está compuesto principalmente por minerales y carbohidratos complejos representados por fibras lignocelulolíticas, sin uso alguno. En este sentido, este trabajo tuvo como finalidad, la bioconversión de la cascarilla de cacao por *Aspergillus niger* para la obtención de enzimas xilanasas y biomasa microbiana para su posterior transformación en quitosano. Para ello, en primer lugar, se procedió a realizar la selección de un aislado de *Aspergillus niger* con alta capacidad degradativa. Se empleó un diseño completamente aleatorizado en bloques con 2 tratamientos, concentración de sustrato ($T_1=30\text{g/l}$, $T_2=2,5\text{g/l}$) a diferentes niveles (0,12,24,48 horas). Se utilizaron 2 aislados, los cuales fueron aislados a partir de granos de maíz (ANM-1) y girasol (ANG) y representaron los bloques. Las variables respuestas fueron la actividad enzimática de las xilanasas y proteína microbiana. Posteriormente, se procedió a optimizar la producción enzimática de las xilanasas y la biomasa microbiana utilizando el aislado seleccionado. Para ello, se empleó la metodología de superficie de respuesta con la aplicación de un diseño factorial 2^6 fraccionado para estudiar el efecto de la concentración de sustrato (cáscara de cacao) (X_1), temperatura (X_2), agitación (X_3), urea (X_4), glucosa (X_5) y residuos de papa (X_6). A partir de la biomasa microbiana obtenida en condiciones optimizadas se procedió a extraer la quitina de las paredes celulares y posteriormente fue transformada en quitosano, el cual se caracterizó de forma preliminar. Los resultados demostraron que la actividad enzimática xilanasas fue significativamente ($p<0,05$) superior en el aislado ANM-1. En cuanto a la proteína, el análisis de varianza reveló diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$), en cuanto a la biomasa microbiana producida para el aislado ANM-1 con respecto a la obtenida por ANG. Se obtuvo un incremento de 9,46% de proteína durante la fermentación. Por su parte, el uso de 2,5 g/l de sustrato en el medio de cultivo (T_2) resultó altamente significativo ($p<0,01$) en relación al resultado obtenido con T_1 . El tiempo de fermentación seleccionado fue de 24 horas debido a que el máximo nivel de crecimiento se produjo en dicho tiempo. Por su parte, el estudio de los factores para la optimización del proceso resultó no significativo obteniendo un R^2 de 0,331 y 0,041 para la actividad enzimática de las xilanasas y la biomasa microbiana respectivamente. Basado en estos resultados se procedió a diseñar y desarrollar un nuevo ensayo, se consideraron la concentración de sustrato y la agitación como las variables regresoras debido a que mostraron ser las más influyentes. Realizado el estudio estadístico, se mostró que hay diferencias significativas entre los tratamientos, y la regresión evidenció que el modelo presentó un buen ajuste, con un factor determinístico (R^2) de 0,964 y 0,955 para la producción de biomasa microbiana y actividad enzimática de las xilanasas, respectivamente. Sin embargo, para las variables en estudio el punto crítico fue un punto de silla. Por tal razón, se procedió a realizar el análisis de Ridge. Los resultados revelaron que el valor más elevado de la biomasa microbiana dentro de los límites de la región estudiada fue de 26,58% de proteína y 946,29 BXU/ml de actividad enzimática de las xilanasas con una concentración de sustrato de 2,5g/l. Una vez obtenidas las condiciones óptimas de cultivo, se procedió a realizar el cultivo en un fermentador de 4 litros. Se determinó que el rendimiento de quitosano fue de 1,05%. Basado en las propiedades fisicoquímicas del quitosano obtenido el cual presentó un alto grado de desacetilación (86,64%), bajo contenido de cenizas (1,06%) y bajo contenido de materia insoluble (3,5%), algunos autores proponen su uso en la industria de alimentos, tratamientos de aguas, industria farmacéutica, entre otros. Por su parte, es necesario en investigaciones posteriores, la purificación y estudio de las propiedades de las enzimas xilanasas obtenidas.

Palabras claves: *Aspergillus niger*, quitosano, biotecnología, enzimas xilanasas.

SUMMARY

In Venezuela, the waste arising in large volumes, are produced by the cocoa industry. Of these, only the husk obtained after roasting and grinding cocoa beans, it is up to 2270 ton / year. This residue is composed mainly of minerals and complex carbohydrates represented by lignocellulolytic fibers, without any use. In this sense, this work was aimed, the bioconversion of cocoa husk by *Aspergillus niger* for the production of xylanase enzymes and microbial biomass for subsequent transformation into chitosan. To do this, first, we proceeded to perform the selection of an *Aspergillus niger* degradative high capacity. Experimental design was a completely randomized block with 2 treatments, substrate concentration (T1 = 30 g / l, T2 = 2,5 g/l) at different levels (0,12,24,48 hours). Two isolates were used, which were isolated from corn (ANM-1) and sunflower (ANG) and represented the blocks. The response variables were the enzymatic activity of the xylanase and microbial protein. Then, we proceeded to optimize the enzymatic production of xylanase and microbial biomass using selected isolated. For this, use the response surface methodology to the implementation of 26 fractional factorial design to study the effect of substrate concentration (cocoa shell) (X1), temperature (X2), agitation (X3), urea (X4), glucose (X5) and potato waste (X6). From the microbial biomass obtained under optimized conditions proceeded to remove the cell wall chitin and was subsequently transformed into chitosan, which was characterized in a preliminary way. The results showed that the xylanase enzyme activity was significantly ($p < 0,05$) higher in the isolated ANM-1. As for the protein, analysis of variance revealed statistically significant differences ($p < 0,05$), as to the microbial biomass produced for ANM-1 isolated with respect to that obtained by ANG. There was an increase of 9,46% protein during fermentation. Meanwhile, use of 2,5 g / l of substrate in the culture medium (T2) was highly significant ($p < 0,01$) in relation to the result obtained with T1. The fermentation time of 24 hours was chosen because the maximum level of growth occurred at such time. For its part, the study of factors for optimization of process was not getting a significant R^2 0,331 and 0,041 for the xylanase enzyme activity and microbial biomass respectively. Based on these results we proceeded to design and develop a new trial, we considered the substrate concentration and agitation as regressor variables because they proved to be the most influential. Performed the statistical study showed that there are significant differences between treatments, and regression showed that the model showed a good fit, with a deterministic factor (R^2) of 0,964 and 0,955 for the production of microbial biomass and enzymatic activity of the xylanases , respectively. However, for endpoints of the critical point was a saddle point. For this reason, we proceeded to perform the analysis Ridge. The results revealed that the highest value of the microbial biomass within the region studied was 26,58% protein and 946,29 BXU / ml xylanase enzymatic activity with a substrate concentration of 2,5 g/l. Having obtained the optimal culture conditions, we proceeded to carry out the cultivation in a fermentor of 4 liters. It was determined that the performance of chitosan was 1.05%. Based on the physicochemical properties of chitosan obtained which showed a high degree of deacetylation (86,64%), low ash (1,06%) and low content of insoluble matter (3,5%), some authors propose their use in the food industry, water treatment, pharmaceuticals, among others. Meanwhile, further research is necessary, purification and study of the properties of xylanase enzyme obtained.

Keywords: *Aspergillus niger*, chitosan, biotechnology, enzymes, xylanases

ÍNDICE

	Pág.
Página de título.....	i
Página de respaldo.....	ii
Veredicto.....	iii
Dedicatoria.....	v
Agradecimiento.....	vi
Resumen.....	viii
Summary.....	ix
Índice.....	x
Índice de cuadros.....	xiii
Índice de figuras.....	xv
Índice de anexos.....	xvii
A.-INTRODUCCIÓN.....	1
B.-OBJETIVOS.....	4
C.-MARCO TEÓRICO.....	5
1.-Generacion de desechos en Venezuela.....	5
2.- Residuos generados durante la transformación industrial de cacao.....	7
2.1.- Cascarilla de cacao.....	11
3.- Alternativas para el uso de la cascarilla de cacao.....	13
4.- Métodos biotecnológicos para la utilización de sustratos lignocelulolíticos.....	17
4.1.- Proceso de fermentación a partir de sustratos lignocelulolíticos.....	22
4.1.1.- Microorganismos capaces de degradar sustratos lignocelulolíticos.....	22
4.1.1.1.- <i>Aspergillus niger</i>	23
4.1.2.-Factores que afectan el proceso de fermentación.....	25
4.1.2.1.- Factores físicos.....	25
4.1.2.2.- Factores químicos.....	28
5.- Productos obtenidos biotecnológicamente a partir de la bioconversión de sustratos lignocelulolíticos	32
5.1.- Enzimas xilanasas.....	32

5.1.1.- Mecanismo de acción de las enzimas xilanasas.....	34
5.1.2.- Usos de las enzimas xilanasas.....	37
5.2.-Biomasa microbiana.....	41
5.2.1.- Quitosano.....	44
5.2.1.1.- Quitosano fúngico.....	50
5.2.1.1.1.- Factores que afectan la obtención de quitosano fúngico.....	54
5.2.1.1.2.- Propiedades del quitosano fúngico.....	55
6.- Optimización de procesos biotecnológicos.....	59
D.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	66
1.- Caracterización del sustrato.....	66
ETAPA I. FASE DE SELECCIÓN DEL AISLADO CON MAYOR CAPACIDAD DEGRADATIVA.....	67
2.- Microorganismo empleados.....	67
2.1.- Medio de cultivo.....	67
2.2.- Cultivo de <i>A. niger</i>	67
3.- Diseño experimental.....	69
ETAPA II. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO ÓPTIMAS PARA EL CRECIMIENTO MICROBIANO (BIOMASA) Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS XILANASAS.....	70
ETAPA III. CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL QUITOSANO PRODUCIDO A PARTIR DE LA QUITINA OBTENIDA POR LA BIOCONVERSIÓN DE LA CASCARILLA DE CACAO POR <i>Aspergillus niger</i> (ANM-1).....	72
1.- Cinética de fermentación en condiciones controladas.....	73
1.1.- Cultivo.....	73
2.- Proceso de extracción de quitosano fúngico.....	73
3.- Caracterización preliminar de las propiedades del quitosano fúngico.....	75
3.1.- Grado de desacetilación.....	75
3.2.- Rendimiento.....	76
3.3.- Porcentaje de materia insoluble.....	77
3.4.- Contenido de cenizas.....	77

D.- RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	78
1.- Caracterización del sustrato.....	78
ETAPA I. FASE DE SELECCIÓN DEL AISLADO CON MAYOR CAPACIDAD DEGRADATIVA.....	79
1.- Actividad enzimática de las xilanasas.....	80
2.- Biomasa microbiana.....	82
ETAPA II. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO ÓPTIMAS PARA EL CRECIMIENTO MICROBIANO (BIOMASA) Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS XILANASAS.....	86
1.- Actividad enzimática de las xilanasas.....	86
2.- Biomasa microbiana.....	87
ETAPA III. CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL QUITOSANO PRODUCIDO A PARTIR DE LA QUITINA OBTENIDA POR LA BIOCONVERSIÓN DE LA CASCARILLA DE CACAO POR <i>Aspergillus niger</i> (ANM-1).....	96
1.- Proceso de fermentación.....	96
2.- Estudio de la cinética de fermentación.....	98
3.- Caracterización preliminar del quitosano obtenido.....	102
E.- CONCLUSIONES.....	109
F.- RECOMENDACIONES.....	111
G.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
1 Composición química de la cascarilla de cacao.....	12
2 Producción mundial aproximada de algunos productos biotecnológicos.....	18
3 Composición promedio de bacterias, levaduras y hongos.....	29
4 Diversos sustratos lignocelulolíticos utilizados en procesos biotecnológicos por <i>A. niger</i> y sus condiciones de cultivo.....	31
5 Análisis proximal de la biomasa de microorganismos de interés.....	42
6 Microorganismos productores de quitina/quitosano y sus condiciones de fermentación.....	52
7 Recomendaciones generales para el uso de quitosano y sus aplicaciones.....	57
8 Características fisicoquímicas del quitosano y sus métodos de determinación.....	58
9 Tabla del diseño completamente aleatorizado en bloques.....	69
10 Niveles de estudio de los factores que influyen sobre la producción de biomasa microbiana y actividad enzimática de las xilanasas.....	70
11 Matriz del diseño factorial 2^6	71
12 Composición fisicoquímica del sustrato empleado.....	78
13 Resultados del Análisis de varianza para la actividad enzimática de las xilanasas. Estudio de los tratamientos ($T_1 = 30\text{g/l}$, $T_2 = 2,5\text{g/l}$) y bloques (ANM-1 y ANG).....	81
14 Análisis de varianza para la actividad enzimática de las xilanasas. Estudio de los tratamientos ($T_1 = 30\text{g/l}$, $T_2 = 2,5\text{g/l}$) y niveles (0, 12, 24, 48 horas).....	82
15 Análisis de varianza para la biomasa microbiana. Estudio de los tratamientos ($T_1 = 30\text{g/l}$, $T_2 = 2,5\text{g/l}$) y bloques (ANM-1 y ANG).....	86
16 Análisis de varianza para la biomasa microbiana. Estudio de los tratamientos ($T_1 = 30\text{g/l}$, $T_2 = 2,5\text{g/l}$) y niveles (0, 12, 24, 48 horas).....	84
17 Niveles de estudio de los factores que influyen sobre la producción biomasa microbiana.....	90
18 Matriz del diseño factorial 3^2	90
19 Coeficientes estimados por regresión del modelo polinómico determinado para la variable biomasa microbiana y actividad enzimática xilanasas.....	91

20	Resultados observados en los ensayos y valores estimados obtenidos para las variables biomasa microbiana (Y_1) y actividad de xilanasas (Y_2).....	92
21	Estimación según el análisis de Ridge para una respuesta máxima en la biomasa microbiana y la actividad enzimática xilanasa en el proceso de fermentación de la cascarilla de cacao por <i>A. niger</i> (ANM-1).....	95
22	Resultados obtenidos en el punto crítico y punto medio para la caracterización de las superficie de respuesta en la optimización de las variables biomasa microbiana y actividad enzimática xilanasa.....	94
23	Porcentaje de cenizas, grado de desacetilación y materia insoluble del quitosano fúngico obtenido con la quitina extraída de la biomasa microbiana de <i>A. niger</i> (ANM-1).....	103

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
1 Total de desechos sólidos recolectados en diferentes entidades federales de Venezuela para el año 2007.....	6
2 Producción de cacao en grano en Venezuela (1963-2008).....	9
3 Esquema tecnológico de la transformación industrial del cacao.....	10
4 Fruto del cacao (<i>Teobroma cacao</i>).....	11
5 Estructura química de la celulosa (a), hemicelulosa (b), (c) lignina.....	14
6 Esquema general de un proceso biotecnológico.....	19
7 Métodos usados en los procesos de recuperación y purificación de productos obtenidos por biotecnología.....	20
8 Productos obtenidos a partir de sustratos ricos en lignocelulosa.....	21
9 <i>Aspergillus niger</i> . (a) Colonias en placa de petri con esporulación. (b) Hifas, conidioforos y cabezas conidiales.....	24
10 Intervalos de temperatura para el crecimiento de: 1, psicrófilos; 2, mesófilos; 3, termófilos.....	26
11 Efecto del pH sobre la velocidad de crecimiento.....	27
12 Ingresos del mercado mundial de enzimas.....	33
13 Esquema general de la estructura de una molécula de xilano y sus ramificaciones.	35
14 Molécula de xilanasas.....	36
15 Modo de acción de la xilanasas.....	36
16 Relación estructural entre la quitina, el quitosano y el quitano.....	45
17 Composición del mercado mundial de la quitina y el quitosano.....	47
18 Tendencia de comercialización de los derivados de quitosano por empresas a nivel mundial.....	48
19 Usos del quitosano en los diferentes segmentos de la industria.....	49
20 Esquema de la pared celular de los hongos.....	51
21 Cascarella de cacao posterior al proceso de acondicionamiento.....	66
22 Esquema tecnológico propuesto para obtener biomasa microbiana a partir de la	

	fermentación de la cascarilla de cacao por <i>A. niger</i>	72
23	Proceso de extracción de quitosano fúngico.....	74
24	Actividad enzimática de las xilanasas durante el proceso de fermentación microbiana realizada por aislados de <i>A. niger</i> (ANM-1 y ANG).....	81
25	Proteína aportada por la biomasa microbiana durante el proceso de fermentación realizada por los aislados de <i>A. niger</i> (ANM-1 y ANG).....	83
26	Grafica en función de la variable actividad enzimática de las xilanasas y su respuesta antes los diferentes factores estudiados.....	88
27	Grafica en función de la variable biomasa microbiana y su respuesta antes los diferentes factores estudiados.....	89
28	Graficas de superficie de respuesta para la producción de biomasa microbiana (A) y actividad enzimática xilanasasa (B), en relación con los factores estudiados (concentración de sustrato y agitación).....	93
29	Proceso de fermentación para la obtención de biomasa microbiana a partir de la degradación de cascarilla de cacao por <i>A. niger</i> (ANM-1).....	97
30	Biomasa microbiana obtenida a partir de la degradación de cascarilla de cacao por <i>A. niger</i> (ANM-1).....	98
31	Comportamiento del pH durante el proceso de fermentación de cascarilla de cacao con el aislado de <i>A. niger</i> (ANM-1).....	99
32	Concentración de azúcares reductores y actividad enzimática de las xilanasasa durante el proceso de fermentación de cascarilla de cacao con el aislado de <i>A. niger</i> (ANM-1).....	100
33	Quitosano obtenido a partir de la quitina obtenida por la bioconversión de la cascarilla de cacao por <i>Aspergillus niger</i> (ANM-1).....	102
34	Curva de titulación para el quitosano fúngico obtenido a partir de la quitina producida por la bioconversión de la cascarilla de cacao por <i>A. niger</i> (ANM-1).....	104

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
1a Estudio estadístico de los diferentes factores estudiados en función de la actividad enzimática xilanasa.....	129
1b Estudio estadístico de los diferentes factores estudiados en función de la biomasa microbiana.....	129



A.- INTRODUCCIÓN

El rápido crecimiento de la industria alimenticia, representa sin duda alguna, uno de los grandes avances de la humanidad. Esto ha traído como consecuencia, que durante el procesamiento industrial de alimentos se generen grandes volúmenes de desechos orgánicos e inorgánicos. La disposición final de estos residuos constituye un problema que afecta el medio ambiente en todas las regiones del mundo (Diorio *et al.*, 2003).

Entre los desechos emanados en grandes volúmenes, se encuentran los desechos producidos por la industria del cacao. Expertos en la fabricación de productos a base de cacao, han determinado que el rendimiento de 100 Kg de granos de cacao es alrededor del 85%, el resto es considerado desecho. De estos, tan sólo la cascarilla de cacao corresponde al 12%. Esto indica que el procesamiento de cacao del país genera un promedio de 2.270 ton/año de cascarillas (Murillo, 2008). Este desecho está compuesto principalmente por minerales y carbohidratos complejos representados por fibras ricas en compuestos lignocelulolíticos (celulosa, hemicelulosa y lignina) (Yegres *et al.*, 2001).

Ante esta situación, las industrias han impulsado el desarrollo de investigaciones para aumentar el valor comercial del residuo de la producción de cacao debido a su carácter biodegradable, a través de la utilización de técnicas químicas y físicas que permitan degradar este tipo de residuos en azúcares simples. Sin embargo, este tipo de tratamiento ha resultado ambientalmente agresivo y de altos costos (Bertsch *et al.*,



2010). Por su parte, la biotecnología moderna ha permitido la bioconversión de los residuos agroindustriales ricos en lignocelulosa mediante el uso de microorganismos especializados.

En este sentido, desde hace muchos años se han aislados microorganismos (*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus* spp. *Trichoderma* spp.), con capacidad de excretar enzimas lignocelulolíticas. En este sentido, las enzimas xilanasas son capaces de hidrolizar los enlaces glicosídicos β -1,4 de los xilanos componente principal de la fibra dietética. Estas son capaces de hidrolizar las fracciones complejas liberando azúcares fermentables, generando compuestos o metabolitos diferentes al sustrato tales como etanol, ácidos, antibióticos, enzimas y el quitosano, entre otros (Monsalve *et al.*, 2006). En la actualidad, se ha considerado la posibilidad de la producción industrial de quitosano a partir de la biomasa microbiana descartada en los procesos de obtención principalmente del ácido cítrico de las diferentes industrias biotecnológicas o la producción de biomasa microbiana a partir de los diferentes residuos lignocelulolíticos y su utilización con este fin (Adamek *et al.*, 2001).

El quitosano es un copolímero de la N-acetil-D glucosamina y D-glucosamina unidas por enlaces glucosídicos. En la actualidad, este producto ha tomado gran interés debido a su amplia gama de aplicaciones, por ejemplo, en la industria de cosméticos, productos farmacéuticos, aditivos alimentarios, agricultura, tratamiento de agua, entre otros (Nwe y Stevens, 2002).



El quitosano es producido comercialmente por la desacetilación de la quitina obtenida de la concha de mariscos, residuos de camarones y cangrejos y el procesamiento de la langosta con bases fuertes a altas temperaturas por largos períodos de tiempo. Sin embargo, existe una gran problemática para la producción de este metabolito debido a la oferta estacional de las materias primas y los altos costos ambientales asociados con el procesamiento químico para la conversión de la quitina a quitosano. En este sentido, los avances recientes en tecnología de fermentación sugieren que muchos de estos problemas se pueden superar mediante la producción de biomasa microbiana a partir de cultivos de hongos (*Penicillium citrinum*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus oryzae* y *Aspergillus niger*) los cuales presentan en sus paredes celulares quitina la cual posteriormente puede ser transformada en quitosano (Khalaf, 2004).

La utilización en procesos biotecnológicos de la cascarilla de cacao para la obtención de quitosano no es reportado en la literatura. De allí que sea necesario la definición del proceso en sí, lo cual contempla el estudio de la composición del sustrato, la elección del microorganismo adecuado y los parámetros de fermentación. Por esta razón el presente trabajo tiene como objetivo la optimización de las condiciones de bioconversión de la cascarilla de cacao por *Aspergillus niger* para la obtención de xilanasas y de biomasa microbiana para su posterior transformación en quitosano fúngico.



B.- OBJETIVOS

General

- Bioconversión de la cascarilla de cacao por *Aspergillus niger* y su transformación en quitosano

Específicos

- Evaluar aislados de *Aspergillus niger* (ANM-1 y ANG) según su capacidad enzimática y de crecimiento en cultivos de cascarilla de cacao.
- Establecer las condiciones de fermentación óptimas para la bioconversión de la cascarilla de cacao por *Aspergillus niger* para la obtención de biomasa microbiana y actividad de las xilanasas.
- Obtener quitosano a partir de la quitina obtenida por la bioconversión de la cascarilla de cacao por *Aspergillus niger* en condiciones controladas de cultivo (fermentador).
- Caracterizar en forma preliminar las propiedades fisicoquímicas del quitosano producido a partir de la quitina obtenida por la bioconversión de la cascarilla de cacao por *Aspergillus niger*.



C.- MARCO TEÓRICO

1.- GENERACIÓN DE DESECHOS EN VENEZUELA

El crecimiento de grandes áreas metropolitanas, en donde se concentra una gran cantidad de población genera amplios volúmenes de residuos sólidos en espacios relativamente pequeños. Los grandes cambios de patrones de consumo, en especial, el uso de productos de carácter desechables constituye otras de las causas del incremento per-cápita de residuos sólidos a nivel nacional. Para el año 2007, se recolectaron 25.296,84 toneladas por día de desechos sólidos, con una tasa de generación per-cápita de 0,934 Kg/hab/día. Para este año, las entidades federales que generaron mayor cantidad de desechos sólidos fueron: Zulia, Miranda, Carabobo, Táchira y Aragua (Figura 1) (Instituto Nacional de Estadística, 2009).

Por su parte, el rápido crecimiento de la industria de alimentos, representa sin duda alguna, uno de los grandes avances de la humanidad. Esto ha traído como consecuencia, que durante el procesamiento industrial de alimentos se generen grandes volúmenes de desechos orgánicos e inorgánicos. La disposición final de estos residuos constituye un problema que afecta el medio ambiente en todas las regiones del mundo, donde la enorme cantidad de desechos genera inconvenientes de difícil solución. La generación de estos residuos, en conjunto con una inadecuada gestión en el manejo, recolección, transferencia y disposición final de los desechos deriva grandes efectos ambientales negativos (Diorio *et al.*, 2003).

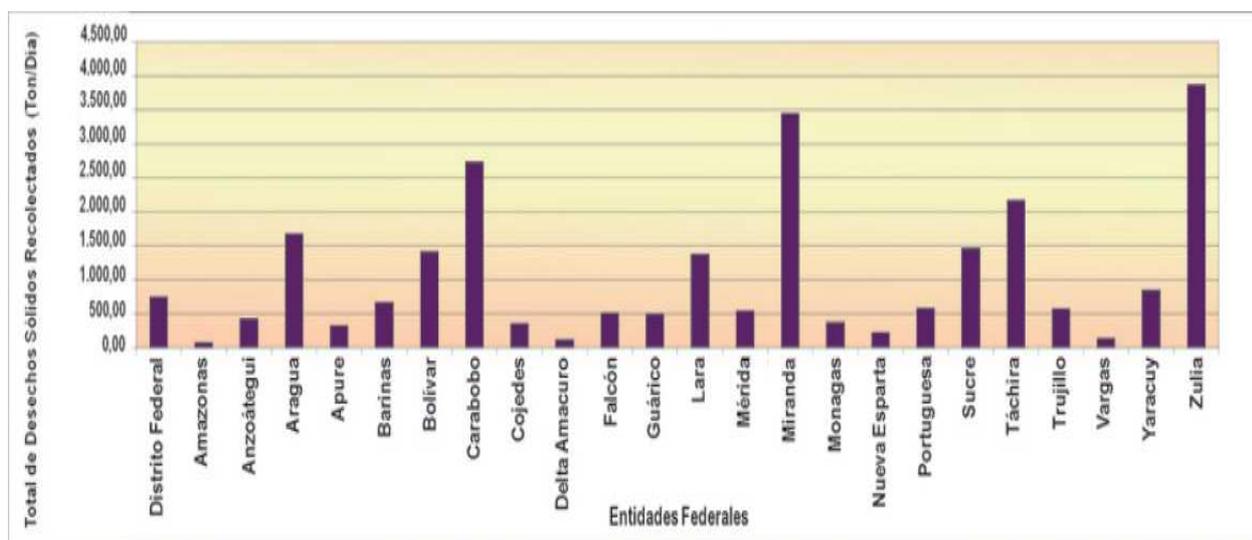


Figura 1. Total de desechos sólidos recolectados en diferentes entidades federales de Venezuela para el año 2007.

Fuente: Instituto de Estadística, (2009).

La variedad y cantidad de los desechos de la industria de alimentos depende de la actividad, materias primas que utilizan, productos que elaboran, deficiencia del servicio de recolección, grado de control de las diferentes operaciones del proceso, tiempo de existencia, tamaño y el número de trabajadores de la industria (Gutiérrez *et al.*, 1996).

En Venezuela, las industrias que representan mayores problemas son las pertenecientes al ramo cárnico, lácteo, chocolate, bebidas y especialidades alimenticias, donde un porcentaje mayor al 30% descarga residuos de tipo líquido, sólido o gaseoso sin control alguno (Sánchez *et al.*, 2009).

Entre los desechos emanados en grandes volúmenes, se encuentran los desechos producidos por la industria del cacao. En Venezuela para el año 2008, se generaron



2.836,6 toneladas de desechos sólidos durante el procesamiento de cacao, los cuales ocasionaron innumerables inconvenientes de difícil solución, debido a que no recibieron tratamiento y se convirtieron en focos de contaminación y enfermedades (Diorio *et al.*, 2003).

2.- RESIDUOS GENERADOS DURANTE LA TRANSFORMACIÓN INDUSTRIAL DEL CACAO

Los establecimientos pertenecientes a las ramas cárnica, pesquera, láctea, azucarera, cacao, chocolate, café, bebidas, procesamiento de frutas y legumbres están caracterizadas por un alto consumo de agua, tanto en la etapa de producción como en el lavado de equipos, la cual es considerada agresiva en mayor o menor grado en cuanto a su contenido de carga orgánica (Sánchez *et al.*, 2009; Gutiérrez *et al.*, 1996). De allí el control existente en los países como Chile, España, El Salvador, entre otros, sobre el agua residual proveniente de las empresas de procesamiento de cacao, la cual requiere cumplir valores máximos permisibles de sólidos solubles (300 mg/L), DBO_{5,20} (300 mg/L), DQO (400mg/L), la cantidad de fosforo (10-15 mg/L), nitrógeno amoniacal (80 mg/L) y el poder espumante (7 mM) para poder ser vertido en el alcantarillado (Norma Salvadoreña NSO.13.49.01.09).

Así mismo, la actividad industrial de las fábricas de chocolate y torrefactoras (industrias procesadoras de café tostado y molidos) se caracterizan por el desprendimiento de gases al ambiente, que si bien, en un principio pueden ser agradables con el tiempo



degeneran en olores desagradables y molestos. Estos olores que consisten en sustancias volátiles originadas durante el tostado y de esta manera se forman y desprenden estéres de ácido clorogénico, derivados del furfural, otras sustancias aromáticas, sustancias volátiles de alquitrán. Estos compuestos dan lugar a la producción de un humo muy denso, oloroso y azul pálido. El uso de chimeneas altas para diluir contaminantes atmosféricos generados en una industria, constituyen un elemento esencial en el tratamiento de emisiones gaseosas en la industria de alimentos (Gutiérrez *et al.*, 1996).

Por otra parte, Delfín y Durán (2003) indican que entre los desechos sólidos generados durante el procesamiento de cacao cerca del 30%, son materiales celulolíticos o lignocelulolíticos. Estos son materiales que no solo son difíciles de degradar, sino que además, su estructura reticular tridimensional de anillos aromáticos enlazados por átomos de oxígeno, obstaculiza el acceso de las enzimas hidrolíticas hacia las fibrillas celulósicas.

Sin embargo, estos desechos son considerados potencialmente biodegradables. Por residuo biodegradable se entiende todos aquellos que en condiciones de vertido, pueden descomponerse de forma aerobia o anaerobia, tales como residuos de alimentos y de jardín, el papel y el cartón. Es importante no añadir estos desechos a los vertederos, para evitar los impactos negativos que provoca en el medio ambiente, los cuales podrían generar consecuencias ecológicas. Es por ello que son promovidas a nivel mundial, las acciones para valorizar estos residuos los cuales poseen un alto



potencial de reciclaje y un posible uso beneficioso en la agricultura o en la mejora de suelos (Diorio *et al.*, 2003).

Ante esta situación, las industrias han impulsado el desarrollo de investigaciones para aumentar el valor comercial de la producción de cacao debido a su carácter biodegradable, a través de la reincorporación de los diferentes desechos a procesos industriales (Murillo, 2008). Según datos de la FAO (2010), la producción nacional de cacao ha presentado un crecimiento durante los últimos años, para el año 2008, estuvo alrededor de 18.911 toneladas (Figura 2).

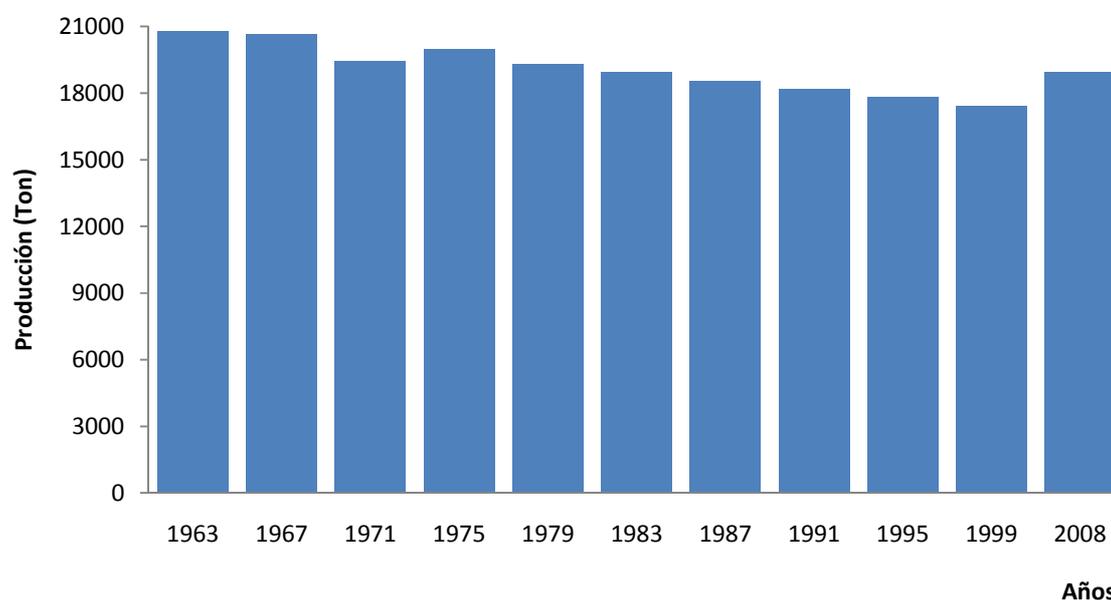


Figura 2. Producción de cacao en grano en Venezuela (1963-2008).

Fuente: FAO, (2010).



Expertos en la fabricación de productos a base de cacao, han determinado que el rendimiento de 100 Kg de granos de cacao es alrededor del 85%, el resto (15%) es considerado desecho. De estos, tan sólo la cascarilla de cacao corresponde el 12%. Esto indica que el procesamiento de cacao del país genera un promedio de 2.270 ton/año de cascarillas, lo que implicaría 150 kg de desechos generados por cada tonelada de cacao procesado (Murillo, 2008). Este desecho es obtenido durante la transformación industrial del grano de cacao fermentado y seco, durante las operaciones de molienda y refinado para la obtención de licor de cacao (Figura 3).

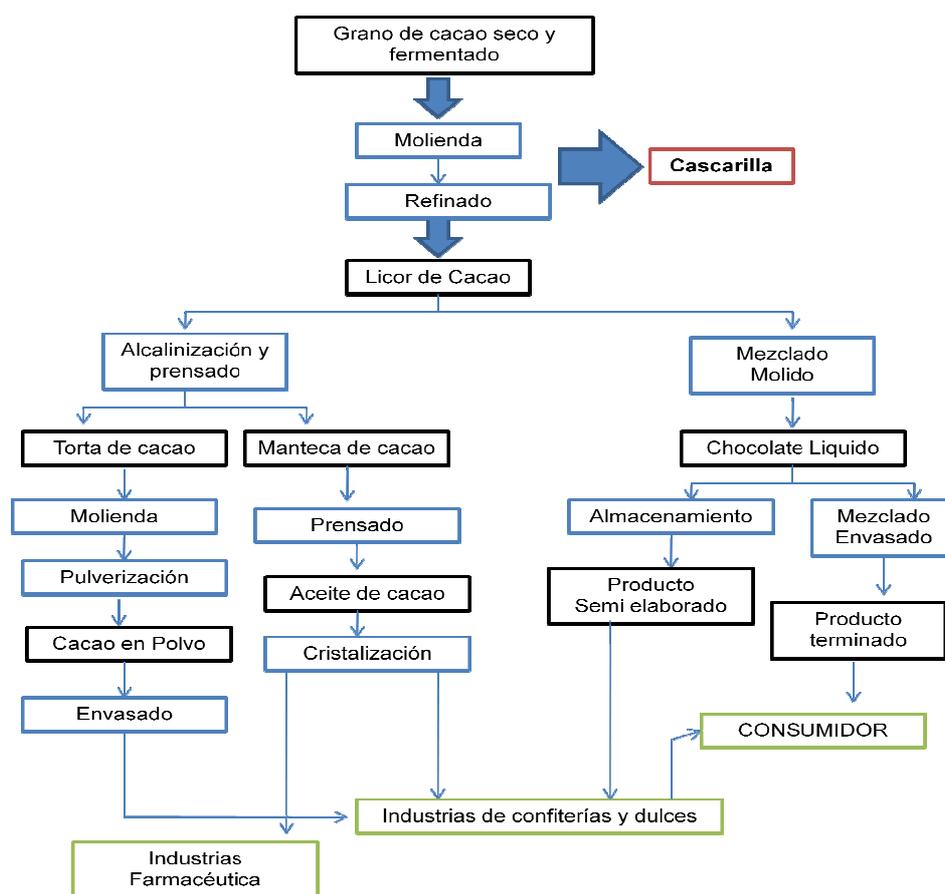


Figura 3. Esquema tecnológico de la transformación industrial del cacao.

Fuente: El autor.



2.1.- CASCARILLA DE CACAO

La semilla de cacao está recubierta por una pulpa mucilaginosa de color blanco, sabor azucarado y ácido. Al eliminar el mucílago o pulpa aparece una envoltura delgada de color rosado que constituye el tegumento o cascarilla de la semilla (Figura 4). Las dimensiones son variables, oscilando el largo entre veinte (20) y treinta (30) mm, el ancho entre diez (10) y diecisiete (17) mm, y el espesor entre siete (7) y doce (12) mm. La forma también es variable y puede ser triangular, ovoide, alargada, redondeada, aplanada, dependiendo de las condiciones ambientales y del número de semillas por fruto (Quintero y Cartay, 2000).

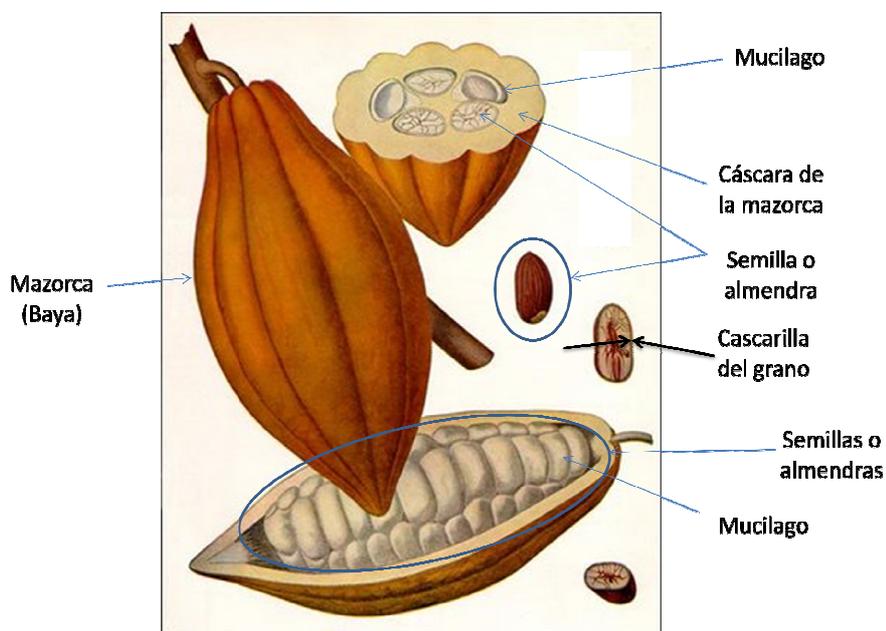


Figura 4. Fruto del cacao (*Teobroma cacao*).

Fuente: González, (2007).



La cascarilla de cacao está compuesta principalmente por proteínas, minerales y carbohidratos complejos representados por fibras ricas en compuestos lignocelulolíticos (Cuadro 1) (Yegres *et al.*, 2001). Estos últimos contienen celulosa, hemicelulosa y lignina, polímeros difíciles de atacar por acción enzimática, debido a la ausencia de cadenas laterales que permiten a las moléculas acercarse unas a otras para formar estructuras rígidas (Figura 5) (Márquez *et al.*, 2007).

Cuadro 1. Composición química de la cascarilla de cacao

COMPOSICIÓN	CONTENIDO (%) Base seca
Humedad	4,60
Fibra dietética total	43,50
Celulosa	19,50
Hemicelulosa	11,80
Ácido Galacturónico	12,20
Lignina Klason	13,70
Proteína bruta	14,90
Lípidos	2,20
Sales minerales	13,50
Azúcares reductores	0,80
Almidón	1,10
Compuestos polifenólicos	0,70
Taninos	0,17
Teobromina	1,10
Cafeína	0,11
Acido fítico	1,00

Fuente: Casanovas, 1997.



La celulosa es un polímero de D-glucosa unida por enlaces glucosídicos β -1,4 que se estructuran en largas cadenas lineales (microfibrillas) unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals intramoleculares, formando una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y regiones amorfas susceptibles a la degradación (Figura 5). La hemicelulosa es un polímero complejo de heteropolisacáridos formado por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) que forman cadenas ramificadas y los ácidos 4-O-metilglucurónico, D-galacturónico y D-glucurónico, en los que los azúcares están unidos por enlaces β -1,4 y ocasionalmente por enlaces β -1,3. Mientras que la lignina es un heteropolímero amorfo, tridimensional y ramificado formado por alcoholes aromáticos que da soporte estructural, rigidez, impermeabilidad y protección a los polisacáridos estructurales (celulosa y hemicelulosa) y es altamente resistente a la degradación química y biológica (Figura 5) (Cuervo *et al.*, 2009).

Estas estructuras complejas, hacen que estos compuestos permanezcan por años sin alteración en los lugares de disposición final, generando un impacto negativo en el medio ambiente. Por esta razón, se hace necesario buscar alternativas de utilización de estos residuos potencialmente biodegradables, aumentando así el valor comercial del rubro (Delfín y Durán, 2003).

3.- ALTERNATIVAS PARA EL USO DE LA CASCARILLA DE CACAO

Actualmente, se llevan a cabo gran cantidad de estudios para la reincorporación de la cascarilla de cacao en los diferentes segmentos industriales tales como la industria

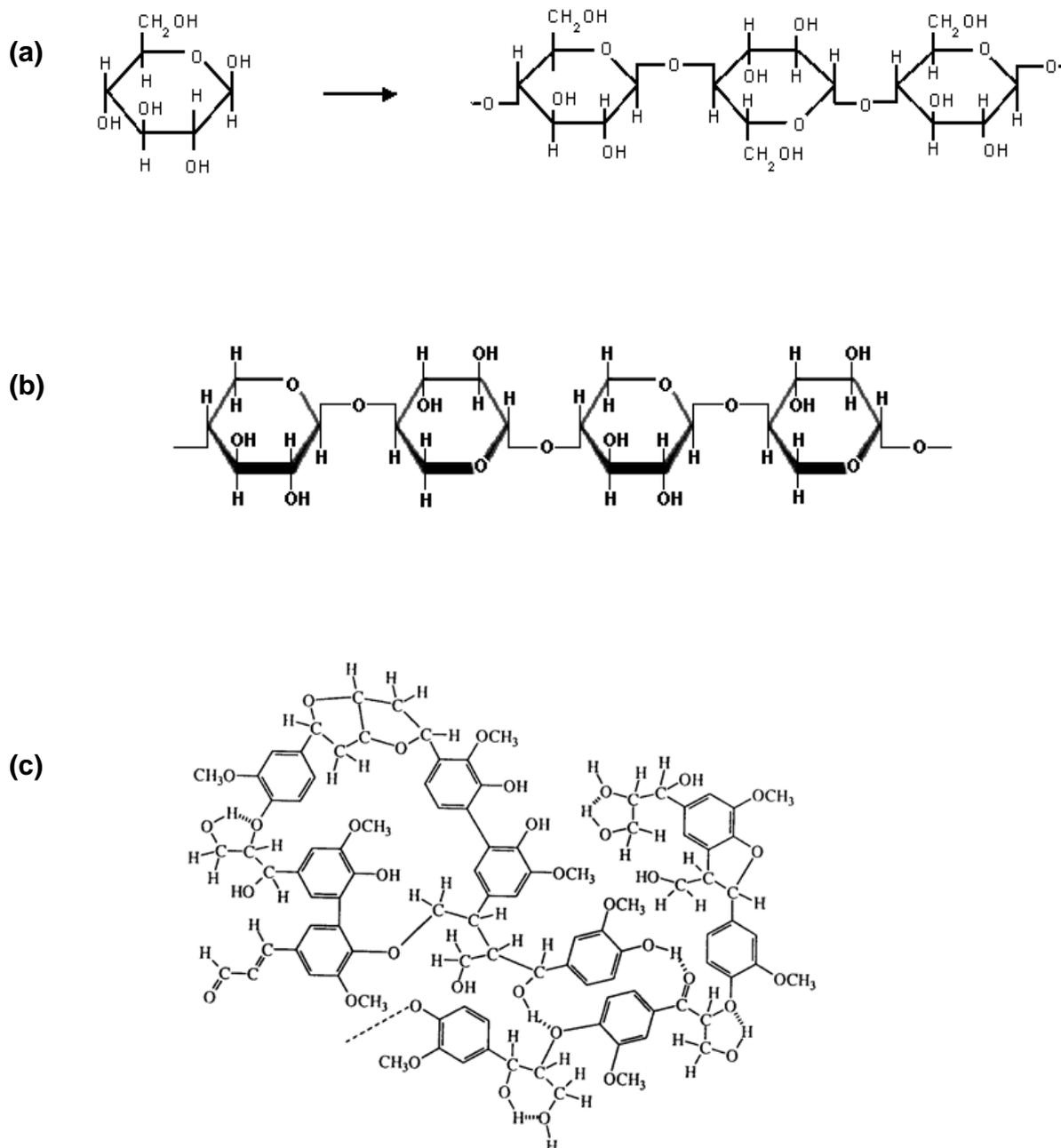


Figura 5. Estructura química de la celulosa (a), hemicelulosa (b), (c) lignina.

Fuente: Márquez *et al.*, (2007).



agrícola, farmacéutica, alimenticia, biotecnológica, entre otras. En este sentido, Olubamiwa *et al.*, (2000), utilizó la cascarilla de cacao como reemplazo del maíz en proporciones de 5, 10, 15 y 20% en las raciones de las ponedoras. La producción de huevos, el peso de los huevos y la conversión de alimento fueron significativamente mejores con la incorporación de la cascarilla. Sin embargo, debido al alto contenido de factores antinutricionales su inclusión en las dietas para animales está limitado a un 10% de incorporación en piensos para animales monogástricos.

Por otra parte, Ismail y Yee (2006), estudiaron los efectos de la incorporación de la cascarilla de cacao, como agente antioxidante en la oxidación de lípidos de carnes de vacuno almacenadas a 4°C por 14 días. Este tipo de oxidación lipídica es una de las mayores causas de disminución de vida útil de este tipo de producto. Actualmente, son utilizados conservantes sintéticos como el BHT y BHA los cuales previenen la oxidación de varios alimentos. El producto obtenido con la cascarilla de cacao presentó las mismas propiedades que los comerciales a nivel estadístico. La capacidad antioxidante de los componentes polifenólicos presentes en la cascarilla de cacao tiene un gran potencial en la reducción de la oxidación lipídica de carnes congeladas.

Por su parte, Moulay (2007), registró una patente en la cual describe el proceso de obtención de un extracto soluble de cacao rico en fibra dietética a partir de cascarilla de cacao. La aplicación de este producto es recomendable con proteínas, en bebidas lácteas, estabilizantes para bebidas de cacao, agentes para coberturas con un amplio rango de aplicaciones, reductoras del envejecimiento del almidón en alimentos y



extensoras de la vida útil de alimentos y bebidas. Así mismo, Keen *et al*, (2005), desarrolló una investigación utilizando un extracto de la cascarilla de cacao y estudiaron su efecto en la flora intestinal, los resultados indicaron que la fibra de cascarilla y su extracto podría mejorar la microflora intestinal y las condiciones ambientales en el intestino. La cascarilla de cacao es útil como un recurso de fibra dietética nueva.

Recientemente, en la industria farmacéutica, un extracto alcalino de la cascarilla del cacao fue examinado por su posible actividad anti-VIH. Se ha demostrado que este extracto inhibe efectos citopatogénicos de VIH en cultivos celulares. La actividad anti-VIH fue atribuida a la interferencia con la absorción viral, más que a la inhibición de la replicación viral después de la adsorción. Se encontró que este extracto, inhibe muy fuerte la replicación de VIH y la formación de sincitios entre las células VIH-infectadas y las células no infectadas de la línea linfoblastoide T, Molt-4. Sin embargo, el estudio de la actividad antiviral de extractos de cacao no se ha realizado en profundidad, y sus ingredientes activos permanecen sin ser investigados (Kalvatchev *et al.*, 1998).

Los usos reportados de los desechos del procesamiento del cacao son limitados, las cantidades sobrantes son considerables, lo que se traduce en una disminución de la problemática ambiental pero no en su eliminación. En adición, por su composición rica en lignocelulosa, la cascarilla de cacao, pueden desdoblarse en azúcares simples mediante métodos químicos tradicionales con ácidos, bases y tratamientos calóricos. Sin embargo, un aporte hacia la disminución de la acumulación de estos residuos, ha sido su reutilización por vía biotecnológica, tomando en cuenta que los tratamientos



convencionales algunas veces resultan ambientalmente agresivos (Bertsch *et al.*, 2010).

4.- MÉTODOS BIOTECNOLÓGICOS PARA LA UTILIZACIÓN DE SUSTRATOS LIGNOCELULOLÍTICOS

La biotecnología es definida como la aplicación controlada y deliberada de agentes biológicos sencillos (microorganismos, o componentes celulares), en operaciones técnicamente beneficiosas, tanto de fabricación de productos como de servicios (Vega *et al.*, 2002). Según Carrera (2003), el objetivo general de los procesos biotecnológicos es la utilización de sistemas biológicos, organismos vivos o derivados para la creación, producción o modificación de productos o procesos con usos específicos.

En la actualidad, numerosos investigadores han centrado sus estudios en la utilización de los desechos lignocelulolíticos de los diferentes segmentos de la industria, como sustratos potencialmente biodegradables y de bajo costo, para la obtención de bioproductos útiles desde el punto de vista económico, nutricional, industrial y ambiental. En el Cuadro 2 se muestra el volumen de producción de ciertos productos biotecnológicos en los que se pueden citar el etanol, la proteína, el ácido cítrico, las enzimas, entre otros.

Un esquema general de un proceso biotecnológico se muestra en la Figura 6. El punto central de este proceso es la fermentación. En esta etapa de operación se utilizan



catalizadores biológicos (microorganismos) para la producción de sustancias de interés tales como alimentos, agentes terapéuticos, enzimas, etc. (Cuadro 2). De la misma forma es utilizado, un sustrato o medio de cultivo como fuente de carbono y energía para el desarrollo microbiano (Negrin *et al.*, 2007).

Cuadro 2. Producción mundial aproximada de algunos productos biotecnológicos

Producto	Toneladas por año
Etanol	5×10^6
Aminoácidos	5×10^5
Ácido cítrico	5×10^5
Levadura de panificación	5×10^5
Proteína Unicelular	5×10^5
Antibióticos	5×10^4
Enzimas	5×10^4

Fuente: Carrera, (2003).

Finalmente, es luego del proceso de fermentación que el producto debe ser purificado y ulteriormente procesado, lo cual requiere aplicar una serie de operaciones unitarias referidas colectivamente como “downstream processing” (SP). Estas operaciones comprenden todos los tratamientos que requiere el cultivo, para la obtención del producto en las condiciones de pureza y actividad deseadas (Negrin *et al.*, 2007). La



Figura 7, muestra algunos de estos métodos utilizados para la recuperación del producto tales como la filtración, centrifugación, cromatografía, entre otros. La selección del tipo de operación va a depender de la pureza con la que se desee obtener el producto final.

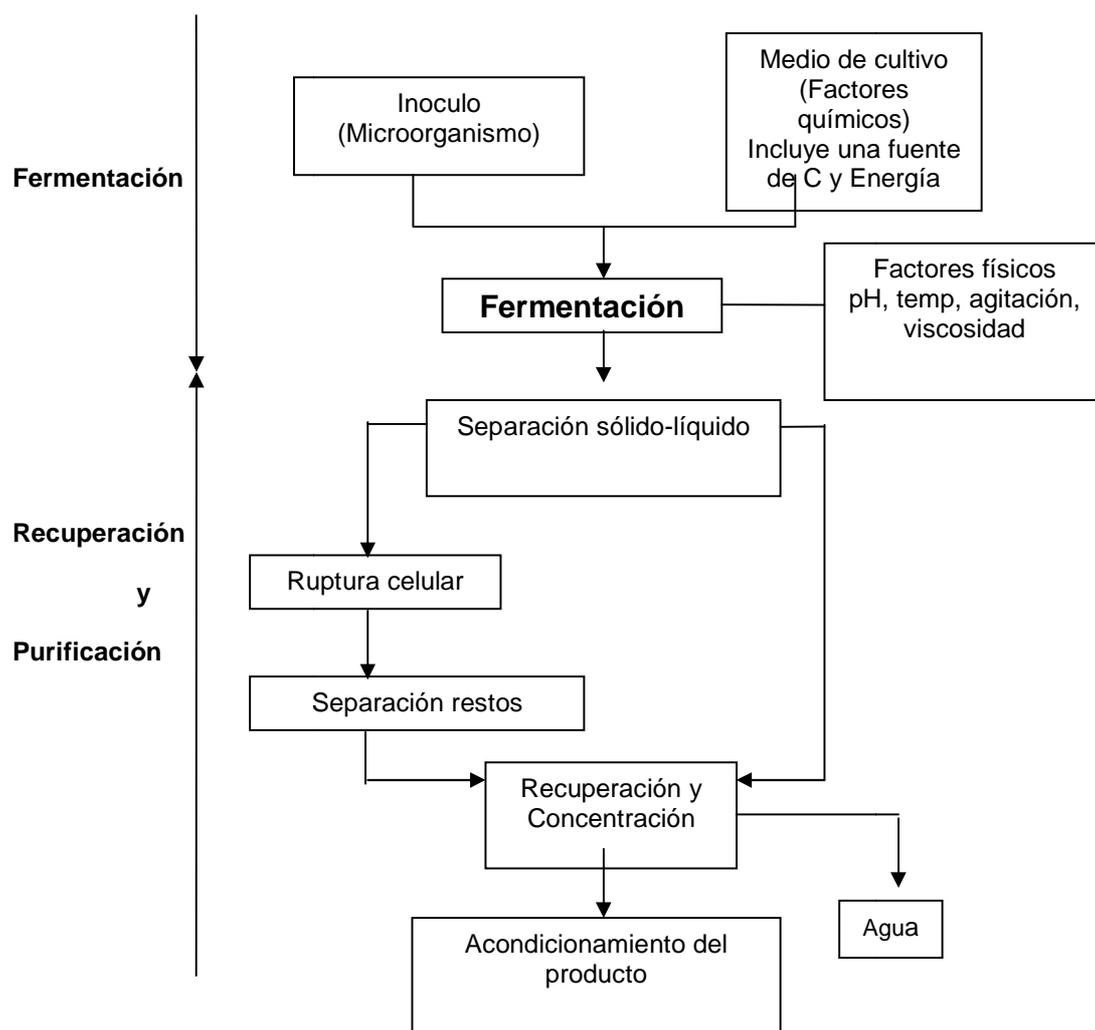


Figura 6. Esquema general de un proceso biotecnológico.

Fuente: Negrin *et al.*, (2007).

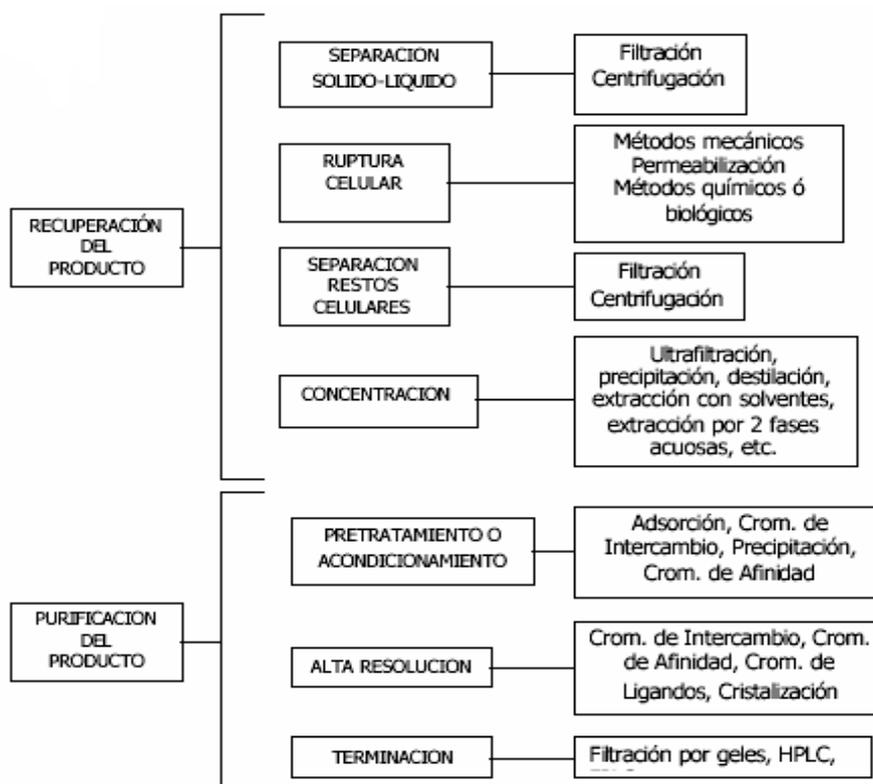


Figura 7. Métodos usados en los procesos de recuperación y purificación de productos obtenidos por biotecnología.

Fuente: Negrin *et al.*, (2007).

En la Figura 8, se pueden observar las 2 vías tecnológicas para la utilización de sustratos ricos en lignocelulosa. Tradicionalmente, este tipo de sustrato ha sido sometido a tratamientos químicos muy agresivos para la obtención de azúcares fermentables. Esto ha tenido un gran impacto negativo en la preservación del ambiente, así como también ha generado altos costos dentro de los procesos industriales. Por su parte, la biotecnología moderna ha permitido la bioconversión de los residuos agroindustriales ricos en lignocelulosa mediante el uso microorganismos capaces de excretar las enzimas lignocelulolíticas y obtener azúcares fermentables los cuales



posteriormente han sido utilizados en procesos de fermentación para la producción de insumos de interés industrial tales como el quitosano, enzimas, proteína microbiana, antibióticos, alcohol, entre otros (Figura 8). Además del interés económico que ello supone para la producción de insumos de mayor valor agregado, la utilización de subproductos agroindustriales tiene incidencias en la preservación de la calidad del medio ambiente al considerar el desarrollo de tecnologías "limpias" orientadas hacia una transformación sustentable de los recursos naturales (Coello *et al.*, 2003).

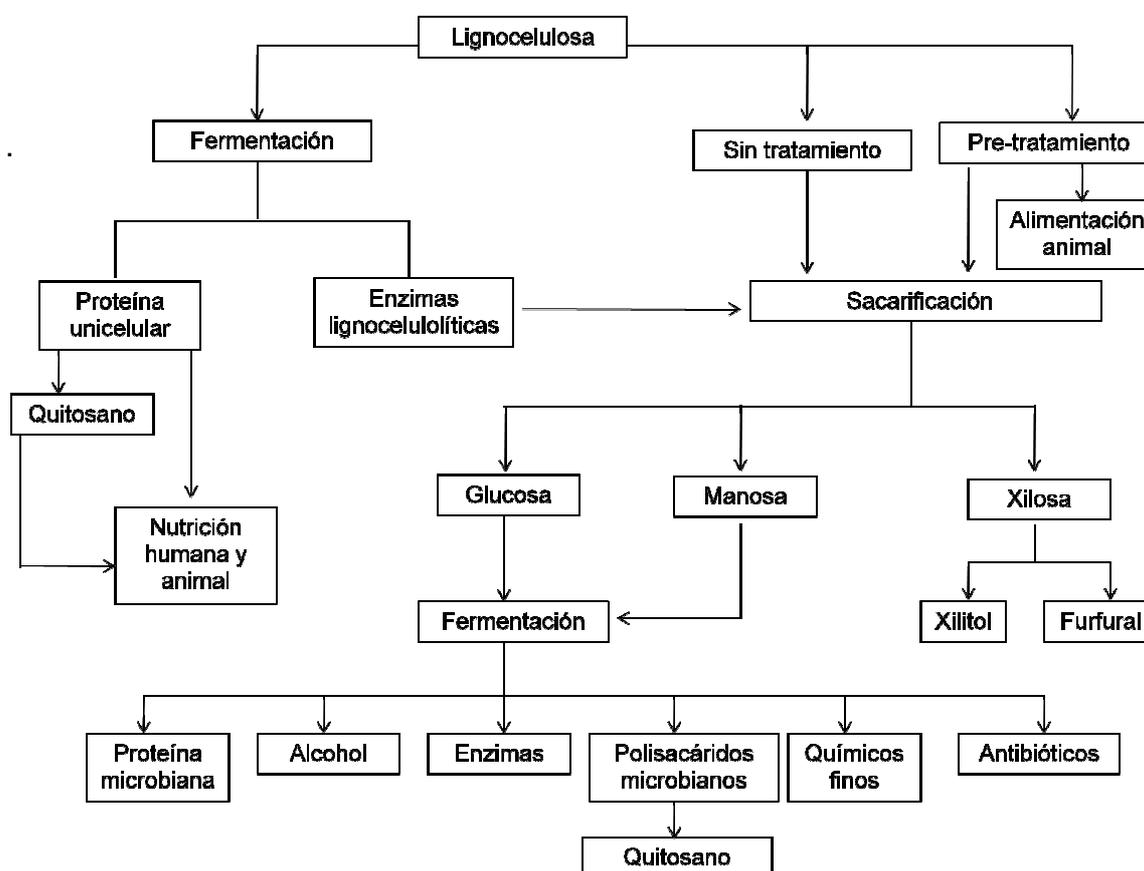


Figura 8. Productos obtenidos a partir de sustratos ricos en lignocelulosa.

Fuente: Howard *et al.*, 2003.



Sin duda alguna, estos residuos lignocelulolíticos constituyen materias primas de bajo costo y fácil adquisición que pueden ser utilizados como sustratos fermentables en la preparación de medios de uso microbiológico, lo cual ha constituido uno de los retos más interesantes de la biotecnología actual (Coello *et al*, 2003).

4.1.- PROCESO DE FERMENTACIÓN A PARTIR DE SUSTRATOS LIGNOCELULOLÍTICOS

Es importante resaltar, que la economía, eficiencia y éxito de los procesos biotecnológicos depende en gran medida de la correcta selección del sustrato y el microorganismo a utilizar. Durante años, muchos investigadores han evaluado una amplia gama de sustratos lignocelulolíticos en este tipo de procesos.

Sin embargo, la utilización de sustratos cuyos reportes en la literatura es escasa tal como es el caso de la cascarilla de cacao, se hace necesario definir cuáles son los factores que afectan el proceso biotecnológico. Este conlleva a la realización del estudio de la composición del sustrato, del microorganismo a utilizar, establecer las condiciones de cultivo, para así obtener un óptimo rendimiento de los metabolitos de interés.

4.1.1.- MICROORGANISMOS CAPACES DE DEGRADAR SUSTRATOS LIGNOCELULOLÍTICOS

En los procesos biotecnológicos a partir de desechos ricos en compuestos lignocelulolíticos, se requiere de microorganismos capaces de degradar ese tipo de



sustratos. Desde hace muchos años se han aislado microorganismos (*Trametes* sp., *Pleurotus ostreatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ficuum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Bjerkandera adusta*, *Rhizopus oligosporus*), con capacidad de excretar enzimas lignocelulolíticas las cuales son capaces de hidrolizar la celulosa, hemicelulosa y lignina, liberando azúcares (Nigam y Singh, 1995).

4.1.1.1.- *Aspergillus niger*

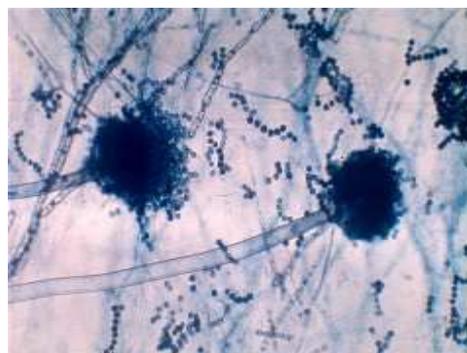
Entre los microorganismos con actividad lignocelulolítica reportados se encuentra al ya mencionado hongo filamentoso *Aspergillus niger*. Como sugiere su nombre es un hongo negro, el cual pertenece a la Clase Deuteromycetes, Sub Clase hyphomicetes, Orden Moniliales, Familia Moniliaceae genero *Aspergillus* y especie *Aspergillus niger* (Sáez *et al.*, 2002). Es importante conocer las características del grupo de *Aspergillus niger* para su identificación, las cuales son: cabezas conidiales de tonos negros a negro grisáceo, son globosas, radiadas o divididas formando columnas de cadenas de conidios irregulares o bien definidos. Los conidioforos son de color hialino a café típicamente lisos, vesículas globosas. Los conidios son globosos (Figura 9) (Vega *et al.*, 2002). Algunas investigaciones han permitido conocer que en general *A. niger* se desarrolla en un rango de pH entre 4 y 5,5 y temperatura óptima de crecimiento entre 35-38°C. El uso de *A. niger* representa algunas ventajas como facilidades de manipulación, sus habilidades de fermentar una gran variedad de materias primas de bajo costo y producir rendimientos elevados de bioproductos (Carrillo, 2003).



Aspergillus niger es particularmente importante en la fabricación de enzimas, ácido cítrico y glucónico, que se encuentran en amplia aplicación en la industria de alimentos, dentro de las enzimas producidas por este microorganismo de interés industrial tenemos las amilasas y glucoamilasa, celulasas, fitasas, proteasas, tanasas, pectinasas, lactasas, gluco oxidasas, oxidorreductasas, lipasas, entre otras (Wainwright, 1992; Brown *et al.*, 1989).



(a)



(b)

Figura 9. *Aspergillus niger*. (a) Colonias en placa de petri con esporulación.

(b) Hifas, conidioforos y cabezas conidiales.

Fuente: Vega *et al.*, (2002).

Es importante resaltar que expertos de la FAO / OMS han examinado y aceptado reiteradamente preparados enzimáticos de *A. niger* incluido el propio organismo (FAO / OMS 1972, 1978, 1981, 1987, 1990). La FDA en los Estados Unidos ha aceptado numerosas enzimas de uso alimentario: a comienzos de 1960 la FDA realizó una carta



de opinión reconociendo que alfa amilasa, celulasa, amiloglucoamilasa, catalasa, glucosa, oxisada, lipasa y pectinasa, producidas por *A. niger* en general pueden ser consideradas como seguras (GRAS), bajo la condición de cepas no patogénica y no toxigénicas (Schuster *et al.*, 2002).

Como ya se ha mencionado anteriormente, el éxito de los procesos biotecnológicos depende en gran medida del sustrato y el microorganismo a utilizar. Una vez seleccionadas estas variables, es necesario estudiar los factores que afectan el proceso de fermentación para un óptimo desarrollo del microorganismo y buen rendimiento del producto.

4.1.2.- Factores que afectan el proceso de fermentación

Los factores vinculados con las condiciones de operación y medio de cultivo son muy importantes debido a que cada microorganismo exige condiciones específicas para su crecimiento óptimo.

4.1.2.1.- Factores físicos

El efecto de la temperatura sobre el crecimiento es complejo. Por un lado cada reacción química individual, de todas las que conforman el metabolismo, es afectada por la temperatura, por lo que un incremento de ésta resulta en una mayor velocidad de reacción (Ertola *et al.*, 1994).



Como regla general, los microorganismos psicrófilos poseen temperatura óptima entre 10 y 20 °C, los mesófilos entre 30 y 40 °C y, finalmente, los termófilos entre 50 y 60 °C (Figura 10).

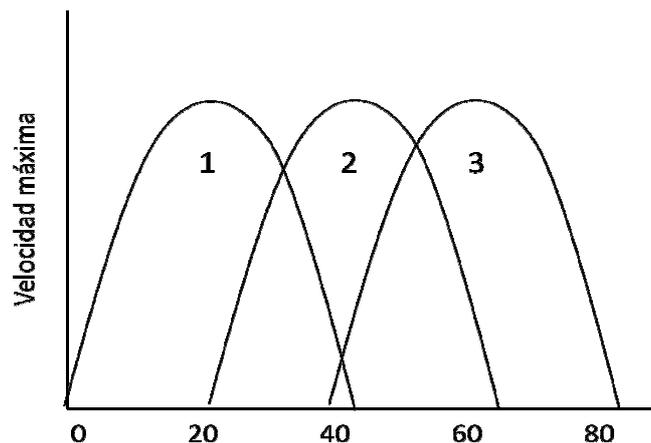


Figura 10. Intervalos de temperatura para el crecimiento de: 1, psicrófilos; 2, mesófilos; 3, termófilos.

Fuente: Scragg, 1996.

El pH tiene menos efecto sobre las actividades biológicas que la temperatura debido a que la célula está razonablemente bien adaptada para regular su concentración interna de iones de hidrogeno frente a las condiciones externas adversas, aunque la energía de mantenimiento que se requiere para hacerlo resulta obviamente afectada. Además el pH del medio externo probablemente tiene un efecto importante sobre la estructura y permeabilidad de la membrana externa (Walker y Gingold, 1997). En la Figura 11 se muestra una grafica típica de velocidad de crecimiento de las células en relación al pH.



Los microorganismos pueden crecer en una variada gama de pH que va desde pH 2 para los acidófilos hasta pH 11 para alcalófilos. Este es frecuentemente alrededor de pH 7 para bacterias y pH 4-5 para hongos (Ertola *et al.*, 1994).

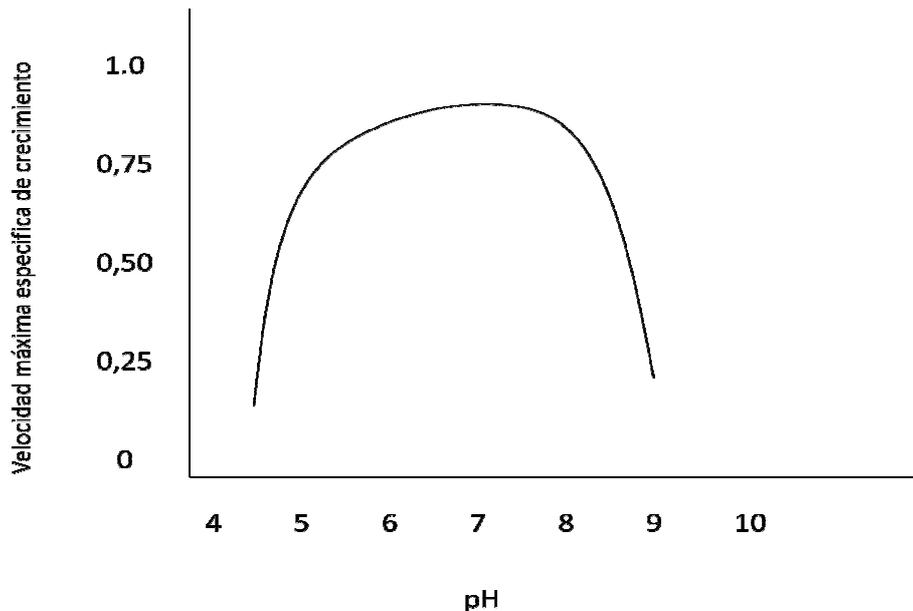


Figura 11. Efecto del pH sobre la velocidad de crecimiento.

Fuente: Bu'Lock y Kristiansen, 1991.

Así mismo, el crecimiento de un organismo aerobio en el cultivo sumergido requiere oxígeno disuelto en el medio. El oxígeno debe ser aportado continuamente ya que es escasamente soluble en una solución acuosa (Bu'Lock y Kristiansen, 1991).

Según Scragg (1996), la finalidad de la agitación en un proceso de fermentación es: dispersar el aire en la solución de nutrientes, obtener una temperatura y una concentración de nutriente en todo el recipiente, suspender los microorganismos y nutrientes sólidos y dispersar cualquiera de los líquidos inmiscibles presentes. Así mismo, Walker y Gilgold (1997), señalan que además de proporcionar oxígeno, la



aireación es también importante para limpiar el cultivo de productos metabólicos volátiles e indeseables.

En este sentido, *Aspergillus niger* es considerado un microorganismo mesófilo y alcalófilo, su temperatura óptima de crecimiento es de 35 °C, pH entre 3,5 y 5 y se requiere de agitación para favorecer el crecimiento de dicho microorganismo (Narasimha *et al.*, 2005).

Como ya se mencionó anteriormente, la preparación de medios de cultivo también constituye un factor muy importante para el desarrollo de procesos de fermentación, debido a que se debe suministrar los nutrientes necesarios para el óptimo crecimiento microbiano (Ertola *et al.*, 1994).

4.1.2.2.- Factores químicos

A pesar de la diversidad de requerimientos nutritivos para el crecimiento celular y la formación de productos óptimos, hay algunos conceptos generales que son válidos para virtualmente todas las fermentaciones. Las células requieren: una fuente de energía suficiente, concentración adecuada de otros elementos y requerimientos específicos (Scragg, 1996). La composición promedio de bacterias, levaduras y hongos se muestra en la Cuadro 3.

Resulta evidente, que el constituyente principal de los microorganismos es el carbono. Se debe adicionar al medio una fuente de energía suficiente, la cual se debe basar en



el rendimiento constante (gramos de células por gramo de sustrato usado) y el costo. Adicionalmente, junto con la fuente de carbono, es vital una fuente de nitrógeno. En los medios de laboratorio el nitrógeno es aportado en forma de sales de amonio o nitrato, pero para los procesos industriales se usan otras fuentes, tales como la urea, harina de pescado, proteínas hidrolizadas, entre otras. (Walker y Gilgold, 1997).

Cuadro 3. Composición promedio de bacterias, levaduras y hongos

Componente (%)	Bacteria	Levadura	Hongos
Carbono	48	48	48
Nitrógeno	12,5	7,5	6
Proteína	55	40	32
Carbohidratos	9	38	49
Lípidos	7	8	8
Ácidos nucleicos	23	8	5
Cenizas	6	6	6

Fuente: Scragg, 1996.

Según Brown *et al.*, (1989), con el fin de obtener un medio complejo para una fermentación industrial se deben considerar: los requerimientos de nutrientes específicos, la composición exacta de los nutrientes industriales y las posibles modificaciones durante el almacenamiento, las propiedades de los nutrientes en términos de almacenaje y manejo y el costo de los nutrientes. Resulta evidente, que con la utilización de desechos lignocelulolíticos, como por ejemplo, la cascarilla de



cacao, es posible aportar una fuente de carbono de bajo costo. Sin embargo, este tipo de sustrato el cual ha sido poco estudiado en cuanto a su composición nutricional disponible para los microorganismos, se hace imperioso estudiar la necesidad de inclusión o no, de otros compuestos que permitan cumplir con los requerimientos nutricionales y fisiológicos del microorganismo a utilizar en el proceso de fermentación.

En este sentido, números investigadores han centrado sus estudios en la utilización de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno para el desarrollo óptimo de *Aspergillus niger* (Cuadro 4). Lechurdi, (2006), desarrolló una investigación para la obtención de fitasa, utilizando como medio de cultivo diferentes residuos de la agroindustria (Harina gruesa de maíz, Afrechillo, torta de canola), estos residuos representaron una importante fuente de carbono para el desarrollo del microorganismo. Sin embargo para la obtención máxima de estas enzimas fue necesario adicionar sulfato de amonio como fuente de nitrógeno bajo condiciones de temperatura 25°C y pH 5,3. Así mismo, Matute (2010), utilizó afrechillo de trigo con la adición de sulfato de magnesio, sulfato de potasio, extracto de levadura y fosfato de potasio en el medio de cultivo utilizando *A. niger* (ANM-1), logrando obtener en fermentación solida un incremento de proteína en un 53,4%. Por el contrario, Yegres *et al.*, (2005), obtuvo pectinasas utilizando *A. niger* a partir de la cascara de la mazorca de cacao. Realizaron la optimización del medio de cultivo y los parámetros físicos. Los resultados indicaron que la adición de urea y otras fuentes de nitrógeno, reprimían la producción de la enzima, por lo que concluyeron que la mazorca de cacao contenía todos los nutrientes necesarios para el desarrollo óptimo del microorganismo.



Cuadro 4. Diversos sustratos lignocelulolíticos utilizados en procesos biotecnológicos por *A. niger* y sus condiciones de cultivo

MICROORGANISMO	SUSTRATO/CONDICIONES QUÍMICAS	CONDICIONES FÍSICAS	REFERENCIA
<i>Aspergillus</i> sp.	Cascara de mazorca de cacao, agua destilada	30°C, pH 4,8, 70% humedad	Yegres <i>et al.</i> , 2005
<i>Aislado de Aspergillus ficuum</i>	Harina gruesa de maíz, Afrechillo, torta de canola, sulfato de amonio, agua destilada	25°C, pH 5,3	Lerchundi, 2006
<i>Trametes</i> sp., <i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Aspergillus niger</i>	Bagazo de caña de azúcar, agua destilada	30-34°C, 80% humedad	Márquez <i>et al.</i> , 2007
5 aislados de <i>Aspergillus niger</i>	Cascara de banano; KCl; FeSO ₄ ; NaNO ₃ ; K ₂ HPO ₄ ; MgSO ₄ , y agua destilada	35°C, pH 4,5, 90 rpm	Rodríguez, 2008
<i>Aislado de }Aspergillus niger (ANM-1)</i>	Afrechillo de trigo; sulfato de magnesio, sulfato de amonio, fosfato de potasio, extracto de levadura	85% humedad 37°C 7 días	Matute, 2010

De igual forma Holker *et al* (2007), indica que altas concentraciones de azúcares fermentables inhiben el crecimiento de *A. niger* experimentando cambios fisiológicos, que reducen la producción de enzimas, mecanismo conocido como represión catabólica o retroregulación.

Para el éxito de los procesos biotecnológicos es indiscutible, la necesidad de estudiar y conocer las condiciones óptimas de temperatura, pH y agitación del microorganismo a



utilizar a partir del sustrato seleccionado. Así como también, la composición del sustrato y la disponibilidad de los nutrientes para el desarrollo microbiano.

Los compuestos generados a partir de la hidrólisis de estos compuestos (celulosa, hemicelulosa y lignina), pueden ser utilizados en procesos de fermentación por algunos microorganismos, obteniendo una amplia gama de productos tales como las enzimas, la proteína unicelular, el quitosano, etanol, entre otros (Monsalve *et al.*, 2006).

5.- PRODUCTOS OBTENIDOS BIOTECNOLÓGICAMENTE A PARTIR DE LA BIOCONVERSIÓN DE SUSTRATOS LIGNOCELULOLÍTICOS

5.1.- ENZIMAS XILANASAS

Las enzimas son proteínas-polímeros de cadena larga, con aminoácidos sucesivamente ligados unos a otros a través de enlaces peptídicos en una secuencia determinada genéticamente que presentan actividad catalítica (Valeri, 2006). Actúan facilitando las transformaciones químicas; acelerando considerablemente las reacciones y disminuyendo la energía de activación que muchas reacciones requieren (Birch *et al.*, 1981).

El tamaño del mercado de las enzimas es difícil de estimar, por razones de índole comercial y debido a que en muchas ocasiones las enzimas son producidas y utilizadas por la misma empresa. Sin embargo, estudios afirman que la producción y utilización de



enzimas crecerá hasta el 2013 en un ritmo de 6,3% anual. Así mismo, se estima que el valor del mercado oscila entre 500 y 700 billones de dólares anuales (Figura 12). El crecimiento está apoyado por la percepción de que los productos químicos pueden reemplazarse, representando las enzimas una forma natural de mejorar la eficiencia y la calidad (Freedonia, 2007).

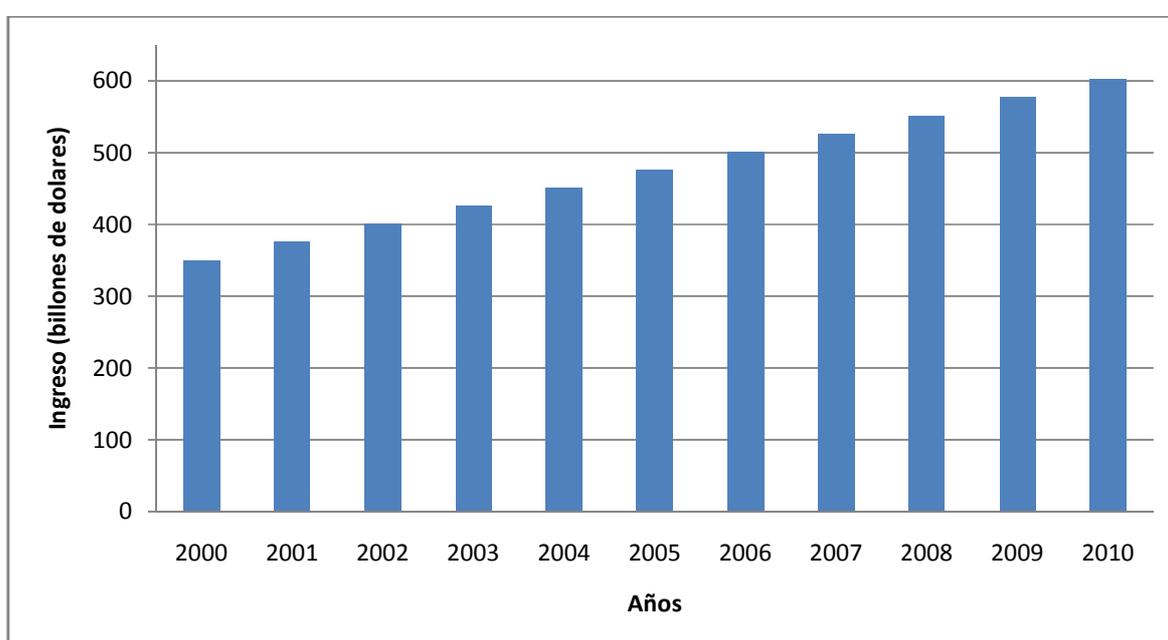


Figura 12. Ingresos del mercado mundial de enzimas.

Fuente: Cifras de las estimaciones de Freedonia (2007) y Frost y Sullivan, (2005).

Sin duda alguna, los residuos lignocelulolíticos constituyen materias primas de bajo costo y fácil adquisición que pueden ser utilizados como sustratos fermentables en la preparación de medios de uso microbiológico, lo cual ha constituido uno de los retos más interesantes de la biotecnología actual. Sin embargo, para su utilización se



requieren microorganismos capaces de excretar enzimas capaces de degradar este tipo de sustrato, dentro de este grupo de enzimas tenemos, las celulasas, hemicelulasas y de las xilanasas (Coello *et al*, 2003).

5.1.1.- MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS ENZIMAS XILANASAS

El xilano es un polisacárido muy abundante en la naturaleza; el más abundante después de la celulosa. Forma parte de las hemicelulosas presentes en la matriz amorfa de la pared celular secundaria de los tejidos lignificados de las plantas leñosas, aunque también se puede encontrar en la matriz de paredes primarias de células en crecimiento y de semillas y bulbos, donde tiene función de reserva. Es la principal hemicelulosa de las maderas duras (angiospermas), representando un 15 - 30% del peso seco de la pared vegetal, y es menos abundante en el caso de las maderas blandas (gimnospermas), donde representa un 7 - 12% del peso seco (Gallardo, 2007).

En este sentido, las enzimas xilanasas son capaces de hidrolizar los enlaces glicosídicos β -1,4 de los xilanos. La degradación enzimática de polisacáridos se puede realizar mediante dos mecanismos: exo y endo. En el mecanismo exo, el polisacárido es degradado por el retiro sucesivo de los azúcares terminales de la cadena polimérica. En el mecanismo del tipo endo la degradación del polisacárido se produce de manera aleatoria; en las primeras etapas, las moléculas de enzima unidas al sustrato causan rupturas múltiples en el polisacárido y producen fragmentos más cortos, que servirán como sustrato para la siguiente degradación (Morales *et al.*, 1999).

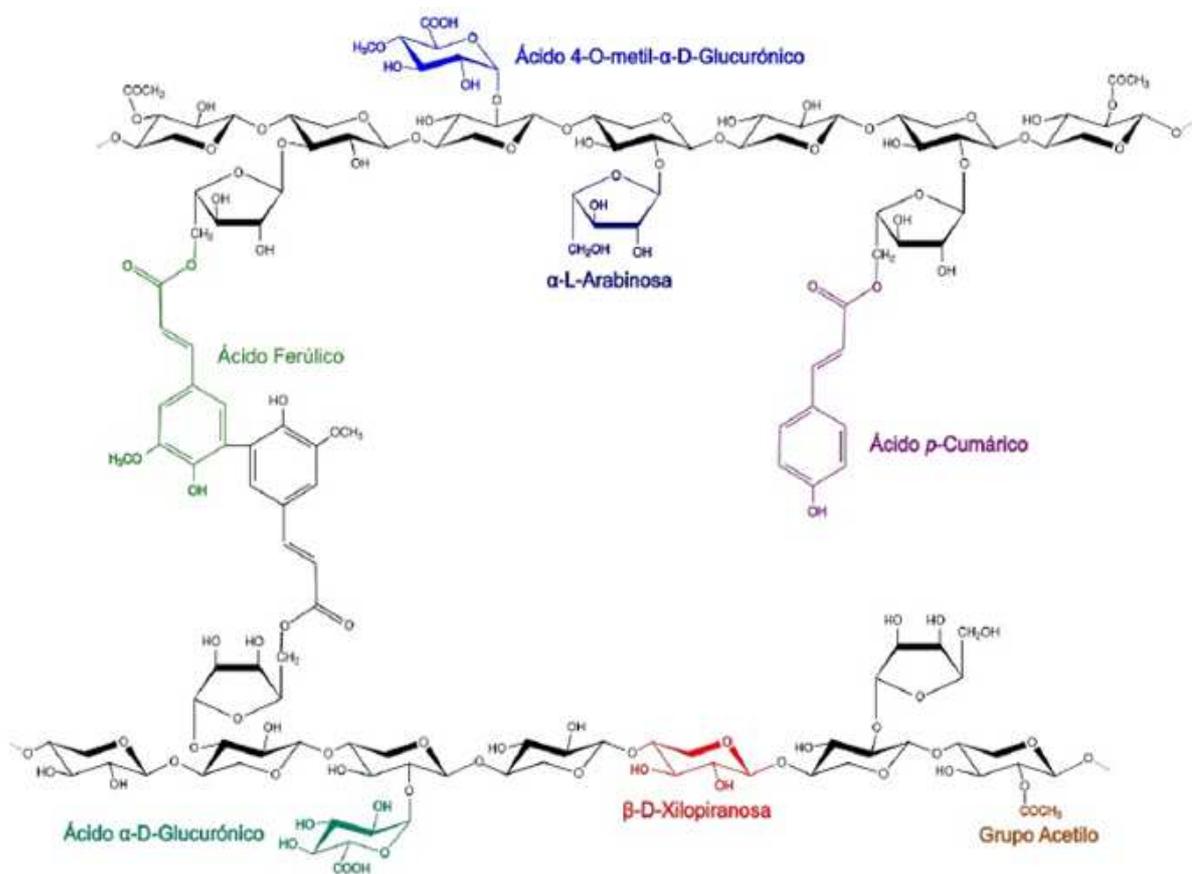


Figura 13. Esquema general de la estructura de una molécula de xilano y sus ramificaciones.

Fuente: Gallardo, 2007.

La xilanasa (Figura 14) es una enzima clasificada como una hidrolasa que cataliza la hidrólisis de azúcares complejos a azúcares simples, el modo de acción se muestra en la Figura 15, donde la xilanasa reduce la longitud de las cadenas de polimeros de β -(1,4)-D-xilopiranosil resultando en fragmentos de azúcares de cadena corta (xilosa) (Miyadi, 2010).



Nombre sistemático: 1,4-β-D-xilanohidrolasa

Nombre recomendado: *endo-1,4-β-xilanasa*

Tipo: Hidrolasa

Sustrato: Xilano

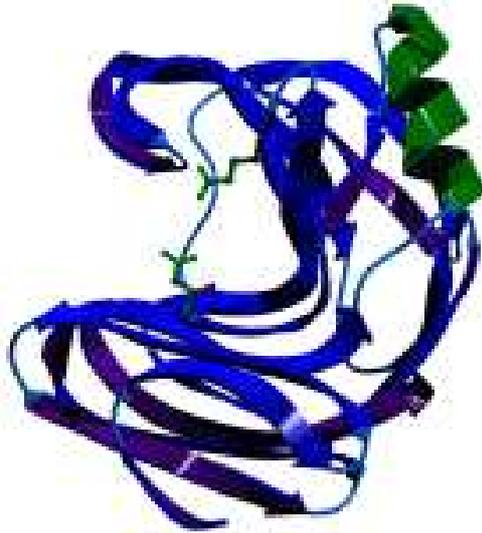


Figura 14. Molécula de xilanasa.

Fuente: Miyadi, 2010.

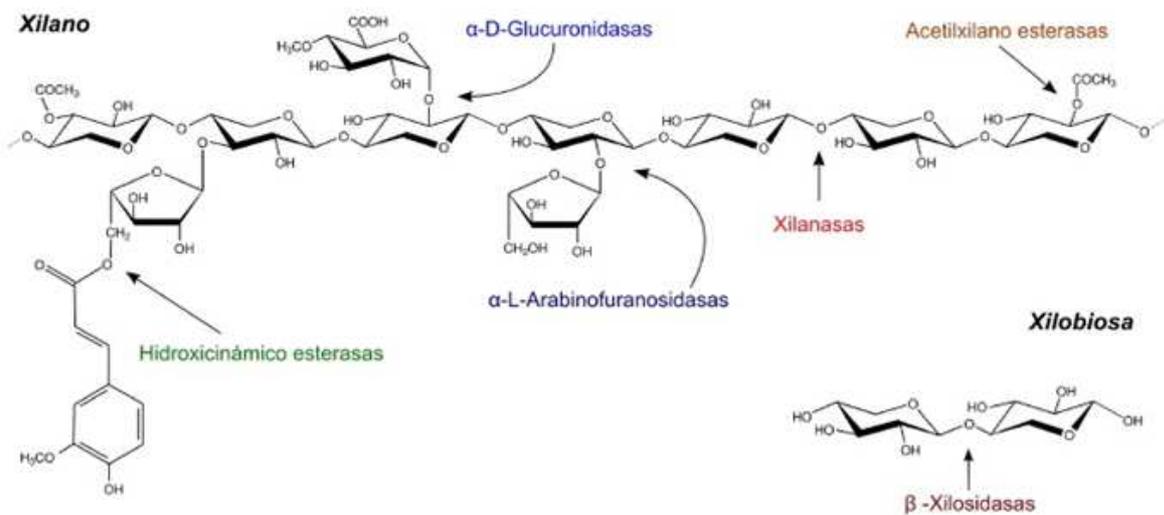


Figura 15. Modo de acción de la xilanasas.

Fuente: Gallardo, 2007.



Para la bioconversión de sustratos lignocelulolíticos, las condiciones para la producción de xilanasas por *Aspergillus niger* son relativamente simples, su temperatura óptima es de 35 °C, pH entre 3,5 y 5, y se requiere de agitación para favorecer dicha producción (Narasimha *et al.*, 2005). Lo cual coincide con los planteado por Rodríguez, (2008), donde para la óptima bioconversión de la cascara de banano utilizando las cepa de *A. niger* (ANM-1 y ANG-1) su óptima temperatura fue de 35°C, pH 4,5 y 90 rpm. Por su parte, Ikram *et al.*, (2004), indican en su investigación, que la máxima producción de xilanasas fue observada a una temperatura de incubación de 30°C y pH 5, luego de un periodo de 48 horas de fermentación.

La producción microbiana de estas enzimas está sujeta a diferentes mecanismos de regulación. A partir de los estudios realizados tanto en hongos como bacterias se ha propuesto un modelo general de regulación controlado por dos mecanismos principalmente. Por un lado, la inducción que se lleva a cabo por sus sustratos naturales celulosa y xilano para las celulasas y xilanasas; respectivamente, y por otro la represión por fuentes de carbono de bajo peso molecular como glucosa y celobiosa para el caso de las celulasas, así como xilosa, arabinosa o xilobiosa para las xilanasas (Ponce y Pérez, 2002).

5.1.2.- USOS DE LAS ENZIMAS XILANASAS

En la actualidad existen disponible numerosos preparados enzimáticos comerciales de grado alimenticio que contienen principalmente actividad xilanasas. Estos preparados



enzimáticos son obtenidos de microorganismos de origen fúngico y bacteriano, que principalmente provienen de los microorganismos *Trichoderma* sp., *A. niger* y *Bacillus subtilis* (Bhat, 2000). Algunos de estos preparados enzimáticos son: Crystalzyme PML-MX de Valley Research Inc Biocellulase A de Quest Intl., Celluclast 1.5 L de Novo Nordisk, Econase Ce-S de Enzyme Development Co., Cellulase AP30K de Amano Enzyme, Stonenzyme Plus, Zymafilt L-300 y Macerex de Enmex S.A. de C.V., Novozym 342 de Novo Industries, Cellubrix L de Novo Nordisk y Cellulase de Bio-Cat Inc (Ovando y Waliszewski, 2005).

En el laboratorio de Biotecnología Agroindustrial (LBA) del Instituto de Química y Tecnología de la UCV, se están desarrollando procesos biotecnológicos para elaborar nuevos bioproductos a partir de residuos y subproductos agroindustriales, entre estos, los aditivos multienzimáticos producidos por *Aspergillus niger* ANM-1 destinados al consumo animal (Domínguez, 2008). La evaluación de la actividad de las xilanasas de estos aditivos reveló a través del uso de la Metodología de Superficie de respuesta que las condiciones óptima de pH y temperatura es de 5,58 y 42,69 °C, respectivamente (Miyadi, 2010).

La biotecnología de las enzimas xilanasas empezó al principio de los años 80, primero en la alimentación animal seguida por aplicaciones en la industria de alimentos. Posteriormente estas enzimas empezaron a usarse en las industrias de lavandería, textil y de la pulpa y papel. En las últimas dos décadas su uso se ha incrementado en forma considerable y actualmente representan cerca del 20% del mercado mundial de las enzimas (Ponce y Perez, 2002). La versatilidad de las enzimas permite que sean



aplicadas en una gran variedad de segmentos de la industria alimentaria: industria panificación, molinería, láctea, cervecera, en procesos de fabricación de gelatinas, en la modificación del almidón, fabricación de jarabes, alcohol, jugos y vinos. Las enzimas son específicas, es decir, hidrolizan y sintetizan un compuesto en particular (Valeri, 2006).

Dentro de la industria alimentaria, las xilanasas se usan para favorecer la extracción y filtración de jugos de frutas o verduras para hidrolizar las paredes celulares de las frutas o vegetales; obteniendo una licuefacción total, mejorando el rendimiento del zumo y la extracción del color; además se evita el enturbiamiento de los concentrados de zumo de fruta, filtración de mosto y la extracción de aceites comestibles (Ponce y Perez, 2002).

Así mismo, el uso de algunos preparados con actividad de xilanasas en el proceso de extracción ha tenido un efecto positivo sobre el rendimiento de la extracción del aceite. Freitas *et al.*, (1993), señaló que el rendimiento en la extracción del aceite de aguacate mejora en un 30 % mayor, después de someter la pulpa de aguacate a un proceso de extracción acuosa enzimática con los preparados comerciales Ultra-SP-L y Olivex, comparado con el proceso de extracción térmico tradicional.

Actualmente, la principal aplicación industrial de las xilanasas se da en la industria papelera. En ella, el tratamiento con xilanasas de la pasta de papel, previo al blanqueo químico, comporta importantes beneficios económicos y ventajas medioambientales. Por su parte, en la industria de panificación, las enzimas xilanasas han sido muy



utilizadas debido a que producen modificaciones en la estructura de los pentosanos, obteniendo una disminución en la capacidad de absorber agua de los pentosanos, lo que ocasiona que el agua no absorbida por estos polisacáridos se redistribuya entre los demás componentes del “sistema” masa, teniendo como consecuencia cambios en la consistencia de la masa, los cuales se ven reflejados en las propiedades reológicas (Gallardo, 2007)..

De igual forma, las xilanasas son ampliamente utilizadas en la alimentación animal como una estrategia para mejorar la utilización de los alimentos, particularmente aquellos lignocelulolítico, por parte de los rumiantes utilizando tratamientos de forrajes con enzimas lignocelulolíticas exógenas o su inclusión como suplemento en la ración (Márquez *et al.*, 2007). Este tipo de productos cada vez se están usando más en la alimentación animal para mejorar tanto la calidad de la ración como el costo de la misma y fundamentalmente disminuyen la contaminación ambiental. En la práctica tienen varias aplicaciones como el mejoramiento energético de una ración o utilizar menos cantidad de alguna materia prima costosa o conflictiva por su calidad. Por otra parte, en lechones tienen una gran aplicación mejorando la digestibilidad de las dietas y sustituyendo la disminución de producción de enzimas endógenas al momento del destete, donde se produce una situación crítica por el aparato digestivo inmaduro y el cambio de dieta. Todo esto se traduce en mejores resultados productivos y disminución de la necesidad de tratar lechones con antibióticos. En las dietas de cerdos en engorde también son importantes por mejorar el aprovechamiento de los nutrientes de los cereales, mejorando la ganancia diaria y el índice de conversión (Labala, 2007).



5.2.- BIOMASA MICROBIANA

La producción de biomasa microbiana es una de las alternativas para la producción de alimentos para humanos y animales de mayor importancia debido al rápido crecimiento de los microorganismos involucrados, el alto valor proteico y la diversidad de sustratos que pueden emplearse para su obtención (Medina, 1999). En el Cuadro 5, se muestra la composición química de los principales microorganismos de interés para la producción de biomasa microbiana.

Es importante resaltar, que en varios estudios experimentales para demostrar la patogenicidad potencial de *A. niger* se ha concluido que la ingestión de dosis grandes de esporas e inhalación de esporas no induce micosis en los animales experimentales, además se ha demostrado que un día después de la ingestión, el hongo ya no se encuentra en el tracto digestivo del animal (Schuster *et al*, 2002). No se han detectado pruebas contundentes que denoten problemas toxicológicos causados por la ingesta de proteína unicelular. Estudios efectuados con ratas alimentadas con dietas de 30% de biomasa microbiana pura no reportaron efectos sobre el crecimiento, ni valores hemáticos.

A. niger, *A. oryzae* y *T. reesei* son organismos utilizados usualmente en los procesos de producción para la alimentación animal y aditivos para la industria. Se han realizado ensayos de toxicidad en varios preparados enzimáticos derivados de las tres especies



indican que son seguros para el uso en sus aplicaciones industriales (Blumenthal, 2004).

Cuadro 5. Análisis proximal de la biomasa de microorganismos de interés

Microorganismo	Nitrógeno (%)	Proteína (%)	Grasas (%)	Fibra (%)	Cenizas (%)
Bacterias					
<i>Methylomonas clara</i>	12-13	80-85	8-10	-	8-12
Levaduras					
<i>Candida utilis</i>	8,3	52	7	5	8
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	9	54	1	-	9
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8,4	53	6,3	-	7,3
<i>Candida lipolytica</i>	11	69	1,5	-	8
Hongos					
<i>Fusarium graminearum</i>	8,7	54	-	-	-
<i>Paecilomyces varioti</i>	8,8	55	1,3	7	6
<i>Aspergillus niger</i>	8,7	55	-	-	-

Fuente: García et al, 1999



Actualmente, los productos derivados de las paredes celulares de hongos han cobrado gran importancia debido a su amplia utilización. Adicionalmente, estos metabolitos son extraídos de la biomasa microbiana, la cual es considerada material de descarte en la industria del antibiótico y del ácido cítrico (García *et al.*, 1999). Según Wu *et al.*, (2005), el ácido cítrico es el ácido orgánico más utilizado en el alimentos, bebidas, y farmacéutica como un acidificante o agente que mejora el sabor y es comercialmente producido por fermentación sumergida con *Aspergillus niger*. El informe anual de las necesidades mundiales de ácido cítrico se estiman en 400.000 toneladas, que se traduce en 800.00 toneladas de residuos de micelio de *A. niger* por año, el cual es descartado.

En este sentido, se ha demostrado en numerosas investigaciones el mejoramiento en la eficiencia productiva de pollos de engorde, a través de la utilización de aditivos de *Aspergillus niger*, debido a la presencia de betaglucanos y mananos en las pared celular de dicha hongo, pudiendo ejercer efectos en el sistema inmune del pollo y exclusión de patógenos a escala digestiva, así como también una alta capacidad de llevar a cabo reacciones de absorción para ciertas micotoxinas de tipo Zealenona, Aflatoxina y Ocratoxina (López, 2007).

Así mismo, un grupo de investigadores de productos dietéticos, nutrición y alergias de España, llevó a cabo la evaluación para un producto alimentario denominado "KiOnutrime-CG TM". Este producto tiene un contenido de más del 90% de quitina-glucano, que es el principal componente de las paredes celulares del micelio de



Aspergillus niger derivados de un proceso de fermentación. Este ingrediente está destinado a ser comercializado como un suplemento alimenticio para aumentar la ingesta diaria de fibra. El panel concluyó que el nuevo producto KiOnutrime-CG™ es seguro, como ingrediente alimentario en las condiciones propuestas de uso y los niveles de ingesta propuesta (European Food Safety Authority, 2010).

Adicionalmente, esta biomasa microbiana de descarte está siendo considerada como fuente alternativa para la producción de quitosano fúngico debido al alto contenido de quitina presente en las paredes celulares de los hongos. Algunas investigaciones han demostrado que el quitosano microbiano puede tener características únicas comparadas con las derivadas de los crustáceos. En este sentido, se ha considerado la posibilidad de la producción industrial de quitosano a partir de la biomasa microbiana de *Aspergillus niger* descartada en los procesos de obtención principalmente del ácido cítrico de las diferentes industrias biotecnológicas o la producción de biomasa microbiana a partir de los diferentes residuos lignocelulolíticos y su utilización con este fin (Adamek *et al.*, 2001).

5.2.1.- QUITOSANO

La quitina se encuentra distribuida ampliamente en la naturaleza, después de la celulosa es el polímero natural más abundante, presenta una tasa de reposición tan alta en la biósfera que se estima duplica a la de la celulosa, por lo que constituye un



importante recurso renovable. La principal fuente de quitina son exoesqueletos de crustáceos (Cocoletzi *et al.*, 2009).

La quitina es una sustancia que se encuentran naturalmente en los exoesqueletos de los insectos, en las conchas de los crustáceos, como cangrejos, camarones y en las paredes celulares de los hongos. La quitina se extrae de las conchas mediante la eliminación de carbonato de calcio, pigmentos, las proteínas y los lípidos. El quitosano es una forma desacetilado de la quitina obtenido por desacetilación termoquímica en hidróxido de sodio concentrado (Figura 16) (Maghssoodi *et al.*, 2009).

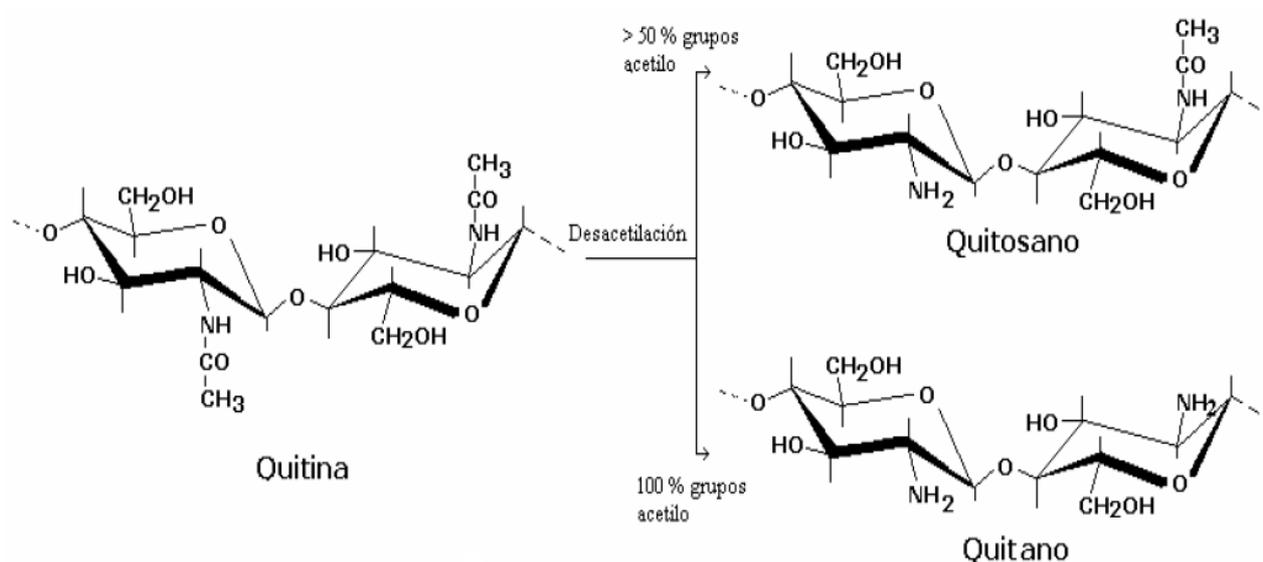


Figura 16. Relación estructural entre la quitina, el quitosano y el quitano.

Fuente: Lares, (2008).



Entre los materiales naturales más usados en la actualidad una pareja de polisacáridos que ha tomado mucho auge por la infinidad de aplicaciones que ha logrado encontrarseles, y, especialmente por su poco impacto ambiental, lo constituye la quitina y el quitosano. Ambos polímeros están químicamente emparentados. La quitina, por su parte, es un poli (β -N-acetil-glucosamina), la cual mediante una reacción de desacetilación que elimine al menos un 50% de sus grupos acetilos, se convierte en quitosano (poli β -N-acetil-glucosamina-co- β -glucosamina). Cuando el grado de desacetilación alcanza el 100% el polímero se conoce como quitano. La quitina y el quitosano son copolímeros de la N-acetil-D glucosamina y D-glucosamina unidas por enlaces glucosídicos (Figura 15) (Lares, 2008).

El mercado mundial de oferentes de quitina y quitosano está formado por diferentes actores. Liderizando el mercado se encuentra Estados Unidos y Japón. Según un estudio realizado por la Sociedad Asiática de Quitina (1996), el mercado mundial de quitosano en 1994 era de 1000 TN de las cuales 800 TN eran utilizadas en Japón, esto demuestra la gran importancia de este país como productor y consumidor. Esta situación puede explicarse si se tiene en cuenta que el mismo estuvo a la vanguardia en la producción de éstos biopolímeros ya que inició sus actividades en la década del 70. Actualmente el panorama mundial se ha visto modificado y por lo tanto la producción y el consumo, en dónde no solo ha aumentado el volumen de producción con la participación de nuevos actores globales, sino también los nuevos campos de aplicación han encontrado nuevos mercados que poseen un potencial de desarrollo futuro muy promisorio (Figura 17) (Caprile, 2009).

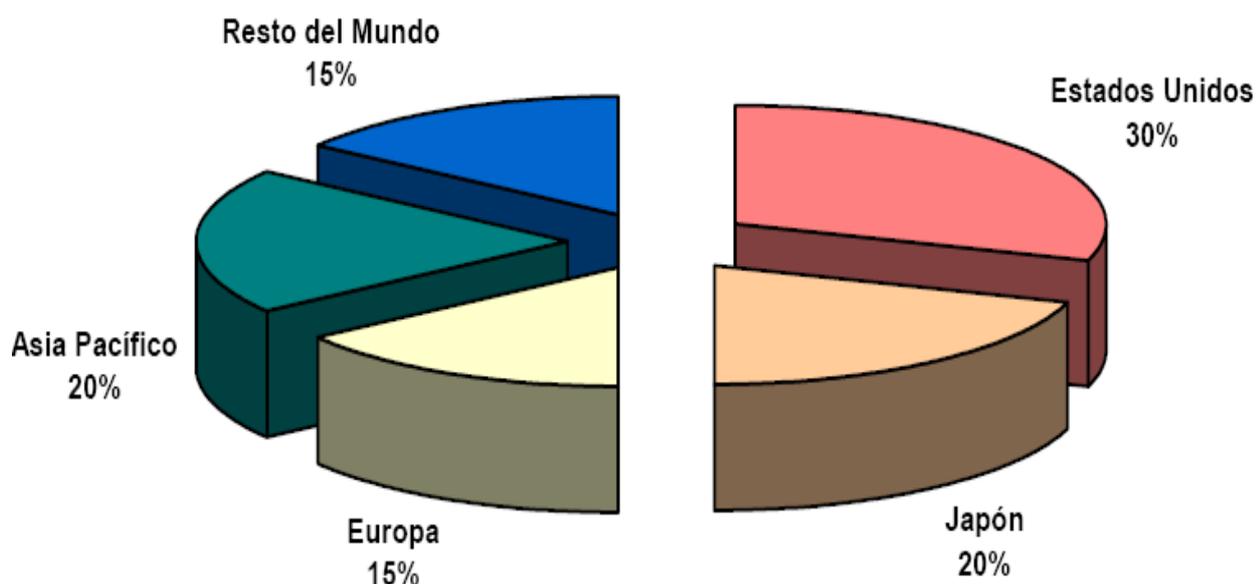


Figura 17. Composición del mercado mundial de la quitina y el quitosano.

Fuente: Caprile, 2009.

El mercado para quitina y productos de quitosano en 1999 fue estimado por varias fuentes en 17.085 toneladas métricas con un valor mediano de 15.000 dólares por tonelada métrica. A nivel mundial existen compañías que lideran el comercio de todos los productos obtenidos del quitosano, estas transnacionales son en su mayoría biotecnológicas en las esferas de la salud y la agricultura. La mayor de ellas es Procter and Gamble Company con 8 innovaciones tecnológicas comercializadas y a continuación se encuentran Jordanian Pharmaceutical Manufacturing Co., Zonagen INC. y Netch INC. (Figura 18) (Herrera *et al.*, 2010).



Figura 18. Tendencia de comercialización de los derivados de quitosano por empresas a nivel mundial.

Fuente: Herrera *et al.*, 2010.

El quitosano tiene una amplia gama de aplicación, por ejemplo, en cosméticos, productos farmacéuticos, aditivos alimentarios y la agricultura. Es utilizado como un componente de pasta de dientes, cremas para manos y cuerpo, champú, para la disminución del colesterol sérico, células y enzimas inmovilizadoras, como material para la fabricación de lentes de contacto, como pegamento, soporte cromatográfico, el fortalecimiento de los agentes de papel, compuestos antimicrobianos, floculación y agentes quelantes en el tratamiento de aguas residuales (Figura 19) (Nwe y Stevens, 2002).

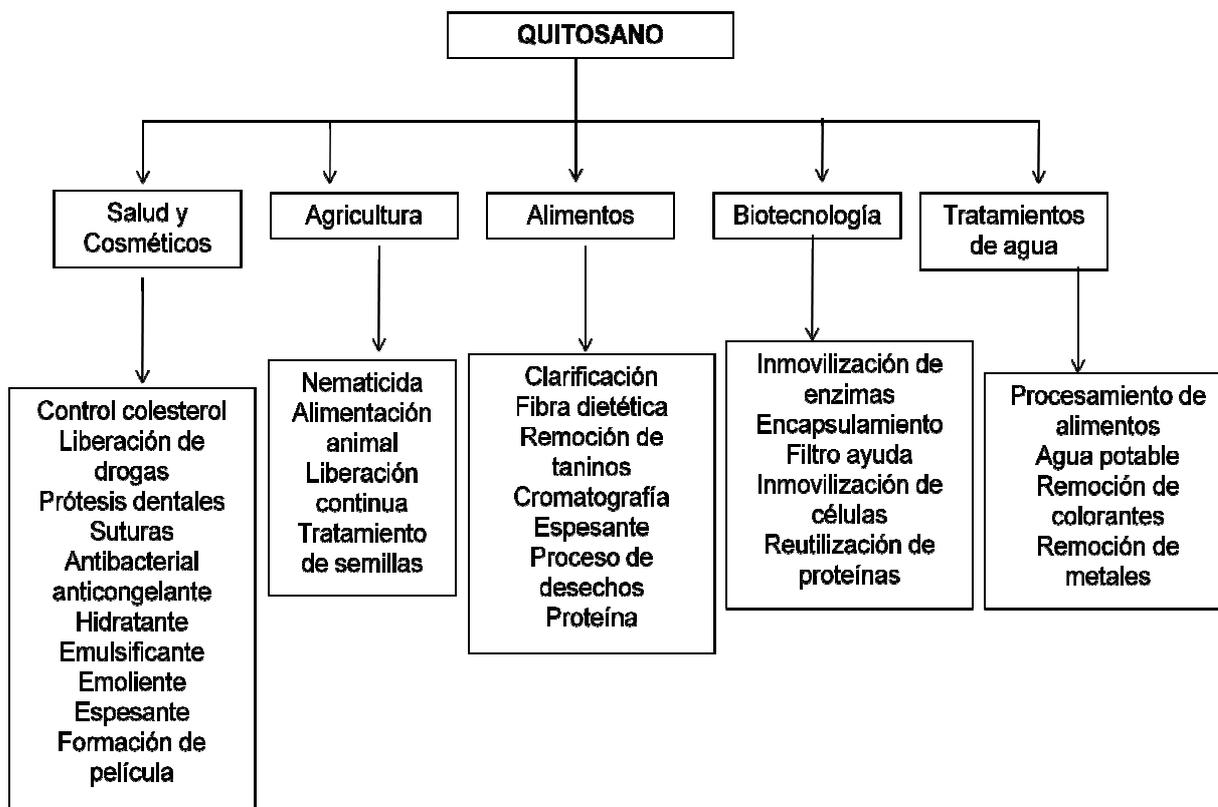


Figura 19. Usos del quitosano en los diferentes segmentos de la industria.

Fuente: Lemus, (2007).

Adicionalmente, el quitosano es el único biopolímero natural catiónico (con cargas positivas). Posee excelentes propiedades como ser: antifúngico, antivirósico, biocompatible, biodegradable, antimicrobiano, no tóxico, emulsionante, absorbente de grasas, adsorbente de metales contaminantes, filmogénico, etc, que hacen que sea considerado de gran aplicación en distintos campos de la industria (Caprile, 2009).

Como ya se ha mencionado anteriormente, el quitosano es producido comercialmente por la desacetilación de la quitina obtenida de mariscos, residuos de camarones y



cangrejos y el procesamiento de la langosta con bases fuertes a altas temperaturas por largos períodos de tiempo. Sin embargo, existe una gran problemática para la producción de este metabolito debido a la oferta estacional de las materias primas y los altos costos ambientales asociados con el procesamiento químico para la conversión de la quitina a quitosano (Khalaf 2004).

5.2.1.1.- QUITOSANO FÚNGICO

Los avances recientes en tecnología de fermentación sugieren que muchos de estos problemas se pueden superar mediante el cultivo de hongos los cuales presentan quitina en sus paredes celulares y que posteriormente por medio de tratamientos químicos, esta quitina puede ser transformada en quitosano. El micelio de diversos hongos Ascomicetos incluyendo, *Zygomycetes*, *Basidiomycetes* y *Deuteromycetes*, son fuentes alternativas de quitina y quitosan (Khalaf, 2004).

Según Gholizadeh (2010), la pared celular fúngica ocupa alrededor del 40% del volumen celular y tiene un espesor uniforme en todo el protoplasto. La pared celular fúngica tiene una serie de polisacáridos y glicoproteínas que es una estructura única en los eucariotas, y es esencial para el crecimiento de hongos y su viabilidad. La microscopía electrónica ha demostrado que la pared celular del hongo se compone de dos o más capas (Figura 20). Por lo general, las paredes celulares del micelio contienen cerca de 29% de glucano, 31% de manano y 25-30% de quitina. La quitina se encuentra ampliamente distribuida en los hongos, de familias Basidiomycetes,



Ascomycetes, Zygomycetes y Phycomycetes, donde es un componente de las paredes celulares del micelio, tallos, y esporas.

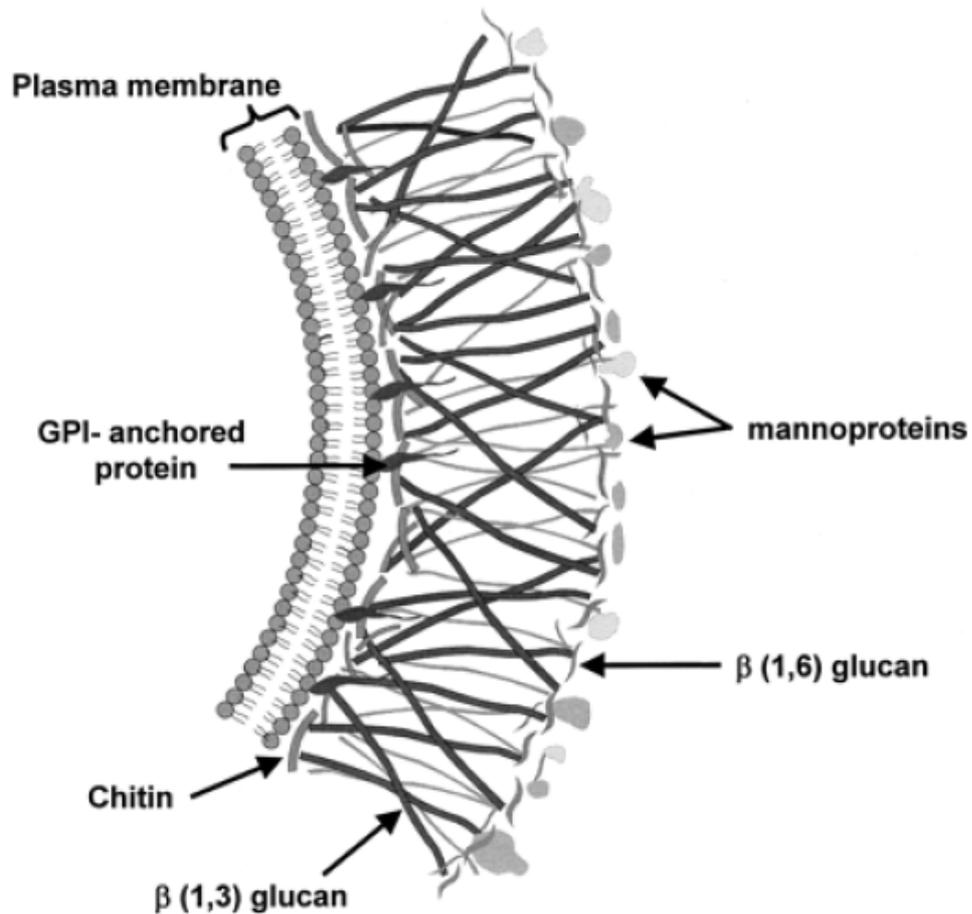


Figura 20. Esquema de la pared celular de los hongos.

Fuente: Gholizadeh, (2010).

En los últimos años, numerosos microorganismos han sido utilizados para la obtención de quitosano. Sin embargo, para la producción del quitosano fúngico permanecen aún algunos inconvenientes, como los altos costos de los medios de cultivo. Es por ello, que



muchos investigadores han centrado sus estudios en la producción de quitosano producidos a partir de la quitina obtenida de las paredes celulares de hongos lignocelulolíticos utilizando materiales de desechos ricos en estos carbohidratos complejos. En el cuadro 6 se puede observar que se ha reportado desde desechos de papa hasta cascarilla de arroz. La biomasa a partir de hongos puede ser producida por fermentación en estado sólido o sumergida. Entre los microorganismos comúnmente utilizados con este fin tenemos *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Pleurotus* sp, *Fusarium*, entre otros.

Cuadro 6. Microorganismos productores de quitina/quitosano y sus condiciones de fermentación

Sustrato	Microorganismos	Condiciones	Referencia
Caldo papa dextrosa ó Extracto de malta	<i>Aspergillus niger</i> <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Lentinus edodes</i> <i>Pleurotus sajo-caju</i> ,	30°C 180 rpm 15-21 días	Pochanavanich y Suntornsuk, (2002)
Desecho papas dulces + 5 g (NH ₄) ₂ SO ₄ 1 g K ₂ HPO ₄ 1 g NaCl 0,5 g MgSO ₄ · 7H ₂ O 0,1 g CaCl ₂ · 2H ₂ O	<i>Gongronella butleri</i>	pH 4,5 26°C	Nwe y Stevens, (2002)
cascarilla de arroz + 0,2% extracto de levadura 1% peptona 2% glucosa	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , <i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i> <i>Rhizopus oryzae</i>	60% humedad 30°C 3-15 días	Khalaf (2004)



En este sentido, Khalaf (2004), estudió un método para la producción, aislamiento y caracterización a escala de laboratorio de quitosano por fermentación en estado sólido a partir de diferentes cepas de hongos (*Aspergillus niger*, *Penicillium citrinum*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizopus oryzae*). Los resultados mostraron que el rendimiento máximo de quitosano fue de 5,63g/kg de medio de fermentación, el cual fue alcanzado por la creciente cepa del hongo *Rhizopus oryzae* en la paja de arroz fermentación solida. Así mismo, Nwe y Stevens, (2002), obtuvieron quitosano a partir del micelio del hongo *Gonglonera butleri*, crecido por fermentación en estado sólido en batata. El rendimiento obtenido fue de 4-6g por cada 100 g de micelio

Entre los hongos comúnmente utilizados para la extracción de quitina a partir de sus paredes celulares y su posterior transformación en quitosano se encuentra *Aspergillus niger*. Esto debido a su importancia industrial en la producción de etanol, enzimas y ácido cítrico donde es desechado gran cantidad del micelio en las plantas biotecnológicas, en el cual la mayor parte de estos residuos se descarta al sistema de tratamiento de aguas residuales o son quemados (Adámek *et al.*, 2001).

La pared celular de *Aspergillus niger* se compone principalmente de quitosano, quitina y beta glucanos, con una preponderancia significativa de (1,3)- β -D-glucano. La quitina se cree que está presente físicamente en microfibrillas incrustado en el β -glucano de la matriz (Adámek *et al.*, 2001). La quitina contribuye a la resistencia mecánica de la pared celular de *Aspergillus niger* (Ikram *et al.*, 2004). Se ha reportado la producción de quitosano a partir de sustratos lignocelulolíticos por *A. niger* debido a su amplia



capacidad de excretar enzimas lignocelulolíticas que permiten la bioconversión de este tipo de sustratos tanto en fermentación líquida como en fermentación sólida.

En este sentido, Kucera (2004), utilizó el micelio del hongo *Aspergillus niger* como materia prima para la preparación de quitosano microbiano. El micelio de *Aspergillus niger* contiene aproximadamente 15% de quitina, que se puede separar, transformándolo en quitosano, y puede ser utilizado como sorbentes para cromatografía. La principal ventaja de este material en comparación con quitosano comercial es la uniformidad de tamaño de partícula. La otra ventaja es el hecho de que la estructura fibrosa original de pellets micelial podría estabilizarse antes de la preparación de quitosano por reticulación con glutaraldehído.

5.2.1.1.- FACTORES QUE AFECTAN LA OBTENCIÓN DE QUITOSANO FÚNGICO

Las variaciones en las cantidades de quitina en la pared celular pueden depender de parámetros fisiológicos en ambientes naturales, así como sobre las condiciones de fermentación en procesos biotecnológicos. Por ejemplo, Nwe y Steve (2004), indican que dado que el quitosano es un biopolímero que contiene nitrógeno, lo mismo ocurre con los hongos, los cuales requieren fuentes de nitrógeno orgánico e inorgánico para la síntesis de quitina en la pared celular. Así mismo, Nadarhad y Abdul (2009), indican que el nitrógeno ha sido reportado como catalizador, así como un componente que participa activamente en la actividad y síntesis de las enzimas involucradas en el proceso. Por tal razón, el nitrógeno es considerado uno de los factores más importantes



para la obtención de quitosano fúngico producto de la quitina extraída de las paredes celulares de los hongos.

En este sentido, Maghsoodi (2008), estudio el efecto de utilización de fuentes de nitrógeno de diferentes sustratos (residuos de soya, canola y semillas de maíz) en relación al rendimiento de producción de quitosano por *A. niger*. Después de la extracción de quitosano, los resultados indicaron que el mayor rendimiento de quitosano se obtuvo utilizando los residuos de soya como sustrato el cual mostraba el mayor contenido de nitrógeno, haciendo determinante este factor. Así mismo, el autor indica que el contenido de humedad y tiempo de incubación también afectan significativamente el rendimiento de obtención de quitosano en fermentación solida.

Por otra parte, Nadarahad y Abdul (2009), indican que la glucosa es un precursor de quitosano. En este sentido, Maghsoodi *et al.*, (2009), evaluaron el efecto de la concentración de glucosa en la producción de quitosano en un proceso de fermentación sumergida por *A. niger* dado su efecto en el crecimiento microbiano. Obteniendo un rendimiento optimo de 0,91g de quitosano por litro de medio de fermentación con un 8% de glucosa. Los autores concluyen que *A. niger* es un buen candidato y la producción de quitosano producto de la quitina extraída de las paredes celulares de los hongos parece ser económico.

5.2.1.2.- PROPIEDADES DEL QUITOSANO FÚNGICO

Se ha demostrado que la aplicación del quitosano está determinada por sus propiedades fisicoquímicas. Debido a su origen natural, tanto la quitina como el



quitosano, no se pueden definir como una estructura única, sino como una familia de polímeros que presentan una alta variabilidad en sus propiedades químicas y físicas. Esta variabilidad no se relaciona solo a la procedencia de las muestras, sino también a su método de extracción. Como ya se ha mencionado anteriormente, la quitina y el quitosano presentan una amplia gama de aplicación. Sin embargo el éxito, en cada una de estas aplicaciones está directamente relacionado con las investigaciones profundas de sus propiedades fisicoquímicas. Sin embargo, partir de los datos en la literatura es posible dar recomendaciones generales respecto a las propiedades de la quitina y el quitosano para una aplicación específica. Estas recomendaciones se muestran en el Cuadro 7 (Nadarahad y Abdul, 2009).

El grado de desacetilación es un parámetro importante que afecta las propiedades fisicoquímicas del quitosano. El quitosano con alto grado de desacetilación tienen una alta carga positiva y es más adecuado para aplicaciones en alimentos como coagulantes, clarificantes, quelantes o agente antimicrobiano. De igual forma el peso molecular, afecta el uso del quitosano, por ejemplo quitosano con peso molecular bajo podría tener una potencial aplicaciones en la industria medica y agrícola (Pochanavanich y Suntornsuk, 2002).

Así mismo, Aranaz *et al.*, (2009), indica que los principales parámetros que afectan a las propiedades del polímero son el grado de desacetilación, el peso molecular, la polidispersidad y cristalinidad. Para las aplicaciones relacionadas con el consumo humano, como alimentos y aplicaciones médicas, la pureza (contenido de cenizas), la



humedad y el contenido de metales pesados, endotoxinas y proteínas debe ser determinado. Se ha informado que el grado de desacetilación es una de las características químicas más importantes características químicas, la cual podría influir en el desempeño del quitosano en muchas de sus aplicaciones. Por su parte, la influencia del peso molecular en el desarrollo de la viscosidad de las soluciones acuosas juega un papel importante en la bioquímica y la importancia biofarmacológico del quitosano. Como se muestra en la Cuadro 8, varios métodos han sido reportados para la determinación de las características de la quitina y el quitosano.

Cuadro 7. Recomendaciones generales para el uso de quitosano y sus aplicaciones

Aplicación	Recomendaciones generales
Salud	Alto grado de desacetilación Bajo peso molecular
Ingeniería de tejidos	Grado de desacetilación 85% Alto peso molecular
Inmovilización de células	Alto grado de desacetilación
Inmovilización de enzimas	Bajo contenido de cenizas Depende de la enzimas, método de inmovilización y reacción
Ingrediente dietético	Alto peso molecular, alta viscosidad, partículas finas
Conservante de alimentos	Alto grado de desacetilación y bajo-medio peso molecular
Agente Emulsificante	Alta viscosidad y bajo grado de desacetilación
Tratamiento de aguas residuales	Depende de las condiciones contaminantes y condiciones del agua En general, alto grado de desacetilación y baja cristalinidad
Reducción de metales	Alto grado de desacetilación y bajo peso molecular parece estabilizar las nano partículas

Fuente: Aranaz *et al.*, 2009



Cuadro 8. Características fisicoquímicas del quitosano y sus métodos de determinación

Características fisicoquímicas	Métodos de determinación
Grado de desacetilación	Espectroscopia infrarroja Espectrofotometría UV Valoración conductométrica Valoración potenciométrica
Peso molecular	Viscosimetría Cromatografía de gel
Cristalinidad	Difracción rayos X
Contenido de humedad	Análisis gravimétricos
Contenido de cenizas	Análisis gravimétricos
Proteínas	Método de Bradford

Fuente: Aranaz *et al.*, 2009.

En este sentido, Pochanavanich y Suntornsuk, (2002), caracterizaron el quitosano producido a partir de la biomasa microbiana de diferentes especies fúngicas (*A. niger*, *R. oryzae*, *L. edodes* y *Pleurotus sajocaju*), mediante su peso molecular, grado de desacetilación y viscosidad. Así mismo, Khalaf (2004) caracterizó el quitosano producido a partir de la biomasa microbiana de *R. oryzae* de acuerdo a su grado de desacetilación, viscosidad y actividad antibacteriana frente a microorganismos patogénicos. Mientras que Balanta *et al.*, (2010), caracterizó el quitosano producido a



partir de la biomasa microbiana de *Aspergillus niger* mediante las determinaciones de rendimiento, grado de desacetilación, peso molecular, viscosidad, y grado de absorción de iones metálicos como cobre, plomo y níquel, para su utilización como material bioadsorbente en el tratamiento de aguas residuales.

En la actualidad muchas investigaciones han centrados sus trabajos en la búsqueda de estrategias que permitan mejorar la productividad de los metabolitos obtenidos por procesos biotecnológicos (Bu'Lock y Kristiansen, 1991).

6.- OPTIMIZACIÓN DE PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS

Según Ertola *et al.*, (1994), para la obtención de los diferentes productos a través de procedimientos biotecnológicos, pueden ocurrir situaciones en las cuales sea imperativa la optimización de los factores químicos (medio de cultivo) y físicos (pH, temperatura, agitación, etc) del cultivo. Entre ellas podemos mencionar las siguientes:

1. No existencia de información respecto a coeficientes de rendimiento de macro y micro elementos para el cultivo del microorganismo determinado.
2. Limitaciones de conocimiento en relación a las condiciones físicas de crecimiento del microorganismo en un sustrato desconocido.
3. Existencia de limitaciones nutricionales ocultas, especialmente de microelementos y factores de crecimiento.



4. Uso de medios de cultivo conteniendo elementos en exceso respecto de los requerimientos nutricionales del microorganismo en cuestión, que pueden causar inhibición del crecimiento.
5. Ensayo de sustancias estimulantes, activadoras e inhibidoras del crecimiento y formación del producto.
6. Empleo de fuentes nutricionales no convencionales.

En la literatura, existe muy poca literatura en relación a cuáles deben ser las técnicas más apropiadas para determinar las condiciones físicas, las materias primas adecuadas y las proporciones en que deben estar en un medio, para que el resultado sea óptimo desde el punto de vista global de la tecnología (Ertola *et al.*, 1994).

Julián *et al.*, (2008) indican que varios son los factores que influyen en el crecimiento microbiano y en su actividad. Pandey *et al.*, (2000) señalan que el tamaño de la partícula y nivel de humedad son los factores más críticos en el caso de la fermentación en estado sólido. Mientras que los factores más estudiados en la fermentación sumergida han sido la temperatura, el pH, la concentración de sustrato, disponibilidad del sustrato, la aireación y la forma de inoculación, entre otros.

La optimización de las condiciones de fermentación con fines industriales, en la mayoría de los casos ha sido efectuada mediante procedimientos empíricos de ensayo y error, no sólo en la formulación del medio de cultivo sino también en las condiciones de operación. De cualquier manera es probable que el medio de cultivo original pueda ser



optimizado, modificando el porcentaje de los componentes del medio y las materias primas utilizadas, siendo factible en muchos casos optimizar un medio de tal manera que no sea solamente más productivo, sino de menor o igual costo que el original, para lo cual se requiere del uso de varios métodos de optimización (Maddox y Richert, 1977). Así mismo, Díaz *et al.*, (2005), indica que las condiciones de fermentación son tradicionalmente optimizadas por la estrategia de una variable a la vez, es decir, cambiando un factor mientras se mantienen constantes los otros. Aunque esta estrategia es sencilla y no exige aplicar un análisis estadístico, requiere un gran número de experimentos y la interacción entre factores es ignorada. Por el contrario, el análisis estadístico resulta más eficiente ya que proporciona mejores aproximaciones y puede llevarse a cabo con un gran número de variables; además, se puede estimar la interacción entre variables

En este sentido, Grebechoba y Prieto (2006), evaluaron la biosíntesis de enzimas pectinolíticas a partir de los hongos *A. niger* y *A. foetidus* para la aplicación en la industria de alimentos, para esto realizaron procesos de fermentaciones sumergidas a pequeña escala (Erlermeyer 250ml) y a 6 litros en un fermentador, utilizando 12 diferentes medios de cultivos orgánicos sintéticos, la optimización se logro a través de un diseño experimental completamente aleatorizado con diferente número de repeticiones debido a que se experimentaba con diferentes medios de cultivo, evaluando una sola variable dependiente la cual era la producción de enzimas pectinolíticas.



Así mismo, Yegres *et al.*, (2001), optimizó los factores químicos y físicos (tamaño de partícula, humedad, concentración de micelio, concentración de esporas, temperatura, adición de sales) para la obtención de enzimas pécticas biotecnológicamente utilizando las cascaras de la mazorca de cacao fermentadas por *A. niger*. Los resultados mostraron que las condiciones óptimas para el crecimiento de *A. niger* y la producción de la actividad pectinolítica, fueron las siguientes: pH inicial 4,8, temperatura 30°C, 3 gramos de micelio y 70 % de humedad. Así mismo, se demostró que la producción de enzimas pécticas no fue favorecida por la adición de sales (KH_2PO_4 , urea, sulfato de amonio y una mezcla de las 3 sales), lo cual difiere de otras investigaciones. La forma en que se presentan los diferentes medios modificados es típica del método empírico de ensayo y error, donde son optimizadas cada variable por separado.

Esa forma de trabajo tiene, obviamente, algunos inconvenientes, en primer lugar, se omiten las influencias que pudieran tener las interacciones entre los diferentes factores, lo cual puede conducir hacia un resultado que no coincida con el óptimo verdadero, por otro lado, este método normalmente demandará de un gran número de experimentos, trayendo como resultado el encarecimiento del proceso de desarrollo de la tecnología (Julián *et al.*, 2008).

En la actualidad, es comúnmente utilizado la optimización a través de la Metodología de Superficie Respuesta (MSR) la cual es definida como un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas utilizadas para modelar y analizar problemas en las que una



variable de interés es influenciada por otras. El objetivo es optimizar la variable de interés (Dreyer *et al.*, 2000).

Según Mujica (2006), esta metodología a diferencia de otros métodos de optimización, tiene una serie de ventajas que demuestran su conveniencia para ser aplicado en procesos biológicos:

1. Se obtienen procesos óptimos con condiciones precisas, con respecto a las variables utilizadas.
2. Minimiza los costos de tiempo y reactivos ya que minimiza el número de ensayos con respecto al método de Plackett-Burman.
3. Genera una respuesta de buena aproximación sobre las regiones donde se encuentra el óptimo a diferencia de Plackett-Burman el cual genera solo una respuesta cercana al óptimo.
4. Se puede obtener una respuesta de las interacciones de dos variables en un mismo ensayo.

Esta técnica ha sido aplicada exitosamente para optimizar gran cantidad procesos biotecnológicos. En este sentido, Dustet y Falony (2006) en el trabajo para optimizar la actividad enzimática de lipasas obtenidas por fermentación sólida, hacen uso del método de superficies de respuestas, estudiando los factores humedad, concentración de glucosa y de aceite de oliva, a tres niveles, y utilizando tres fuentes de nitrógeno,



realizando la optimización para cada una de las fuentes de nitrógeno, en función solamente de la actividad enzimática.

Morocoima (2008), desarrollo una investigación donde evaluó los factores que influyen en la producción de etanol (pH, concentración inicial del sustrato, tiempo de inoculación de *S. cerevisiae*, porcentaje de inóculo de *A. niger* e inóculo de *S. cerevisiae*) obtenido a partir de los residuos del procesamiento de papa utilizando el cocultivo de *A. niger* (ANM-1) y *S. cerevisiae* mediante un diseño factorial 2^5 . Una vez obtenidas las variables significativas, logró optimizar las condiciones del cultivo mediante la metodología de superficie respuesta con lo que se podría obtener 2,7587 % p/v de etanol basado en esas condiciones. Así mismo, Mujica (2006), a través de la metodología de superficie respuesta logro optimizar las condiciones de cultivo obteniendo un 55,8% más de azúcar al hidrolizar los residuos del pastificio con *A. niger* (ANM-1) para posteriormente obtener etanol utilizando *S. cerevisiae*. Por su parte, Rodríguez (2007), logró optimizar las condiciones del cultivo mediante esta técnica, logrando la obtención de 75% de incremento del contenido proteico de la cáscara de banana fermentada con *A. niger*.

Así mismo, Yu cao *et al.*, 2008, evaluaron en su investigación a través de la metodología de superficie de respuesta los efectos del tiempo de cultivo, pH y concentración de sustrato (residuos de salvado de trigo) en la producción de xilanas por un aislado de *A. niger*. Los resultados mostraron que las mejores condiciones para la obtención de esta enzima por fermentación sumergida fue de 53,5 horas, pH 7,92, y



54,2 g/l de sustrato obteniendo 127,12 U/ml de actividad enzimática xilanasa, logrando un 96,22% de mejora con respecto a la actividad enzimática inicial.

Es importante resaltar que los componentes empleados en las industrias de fermentación son generalmente complejos, siendo importante considerar diferentes aspectos como el costo de los mismos, la disponibilidad y la estabilidad en su composición química. Si tenemos en cuenta que el costo de los nutrientes representa entre el 10 y el 60% del costo total de muchos productos obtenidos por fermentación, se hace prioritario disminuir el costo de los medios (Ertola *et al.*, 1994).

Sin duda alguna, los residuos lignocelulolíticos constituyen materias primas de bajo costo y fácil adquisición que pueden ser utilizados como sustratos fermentables en la preparación de medios de uso microbiológico, para la obtención de azúcares fermentables los cuales posteriormente pueden ser utilizados en procesos de fermentación para la producción de insumos de interés industrial tales como el quitosano, enzimas, proteína microbiana, antibióticos, alcohol, entre otros. Sin embargo, para la utilización de sustratos cuyos reportes en la literatura es escasa tal como es el caso de la cascarilla de cacao, se hace necesario definir cuáles son los factores que afectan el proceso biotecnológico para así obtener un óptimo rendimiento de los metabolitos de interés.



C.- MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Caracterización del sustrato

Los desechos fueron suministrados por una empresa del Estado Aragua, estos son generados durante la transformación del cacao fermentado y seco. Estos fueron trasladados a las instalaciones de la planta de vegetales del Instituto de Química y Tecnología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, donde se llevó a cabo el proceso de acondicionamiento para su posterior análisis físico-químico. Este acondicionamiento consistió, en someter la muestra a un proceso de secado, en un secador de bandejas a 60°C y velocidad del aire 5 m/seg por 4 horas, para posteriormente someterla a un molino de martillos para su fraccionamiento (Figura 21).



Figura 21. Cascarilla de cacao posterior al proceso de acondicionamiento.



Los análisis practicados a esta materia prima fueron los siguientes:

- **Humedad**, según método 925-23 (AOAC, 1990).
- **Grasa**, según el método gravimétrico 954-02 (AOAC, 1990).
- **Cenizas**, según el método 925-46 (AOAC, 1990).
- **Proteínas**, según el método Kjeldahl 955-04 (AOAC, 1990).
- **Análisis estructural**, por el método de Van Soest (Van Soest y Wine, 1967).
- **Análisis mineral**, según el método absorción atómica (AOAC, 2000).
- **Fibra cruda**, por el método de Weendel (Hart y Fisher, 1991).

ETAPA I

FASE DE SELECCIÓN DEL AISLADO CON MAYOR CAPACIDAD DEGRADATIVA

2.- Microorganismos empleados

Se emplearon dos aislados de *Aspergillus niger* ANM-1 y ANG, pertenecientes al cepario del Laboratorio de Micotoxicología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela. Estos microorganismos fueron aislados a partir de granos de maíz y semillas de girasol respectivamente (Rodríguez, 2007).

2.1.- Medio de cultivo: En fiolas de 500 ml, se incorporaron 100 ml de agua y sustrato (cascarilla de cacao), para luego ser esterilizado a 121°C por 15 minutos.

2.2.- Cultivo de *A. niger*: Por cada 100 ml de esta solución se inocularon 10 ml de agua destilada con esporas de *Aspergillus niger* ANM-1 o ANG en suspensión, la cual



se obtuvo por raspado de superficie de una colonia en crecimiento en tubo de ensayo. Este raspado fue arrastrado con agua destilada y la suspensión formada se filtró eliminando los restos de micelios y conidióforos, para unificar el inóculo con la presencia de los conidios. La siembra del hongo fue de 1×10^6 esporas por mililitro, contabilizadas a través de la cámara de Newbauer. La fiola ya inoculada fue sometida a 38°C y 150 oscilaciones por minuto durante 48 horas, en condiciones aeróbicas.

En el transcurso del proceso, se tomaron muestras de la fermentación, esto para el seguimiento de los cambios producidos durante la fermentación mediante las determinaciones de:

- **Biomasa microbiana:** el crecimiento de los microorganismos (micelio) se monitorearon mediante la determinación del nitrógeno total o proteína según el método Kjeldahl 955-04 (AOAC, 1990).
- **Actividad enzimática de las xilanasas** (Loera y Cordova, 2003). La actividad enzimática de las xilanasas fue determinada mediante la cuantificación espectrofotométricamente usando ácido dinitrosalicílico de los azúcares reductores (xilosa) liberados por la hidrólisis del xilano por las enzimas presentes en el caldo de cultivo. Esta actividad fue expresada en BXU/ml definida como la cantidad de enzima que produce carbohidratos reductores con un poder reductor correspondiente a 1 nmol de xilosa en 1 segundo bajo las condiciones del análisis.



3.- Diseño Experimental

En la mencionada etapa se utilizó un diseño completamente aleatorizado con dos bloques basado en el modelo: $Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$ (Steel *et al.*, 1988).

Cada bloque representó a un aislado. El diseño constó de 2 tratamientos, concentración de sustrato (T1 = 30 g/L y T2=2,5 g/l del sustrato) a diferentes niveles (N) los cuales fueron el tiempo del proceso de fermentación (0, 12, 24 y 48 horas), con 3 repeticiones cada uno. Se seleccionó la cepa de acuerdo a su capacidad de producción de biomasa microbiana o crecimiento microbiano a expensas de la degradación del sustrato y la actividad enzimática de las xilanasas del caldo de fermentación (Cuadro 9).

Cuadro 9. Tabla del diseño completamente aleatorizado en bloques

Niveles (Tiempo)	B1		B2	
	ANM-1		ANG	
N1(0h)	T1	T2	T1	T2
N2 (12h)	T1	T2	T1	T2
N3 (24h)	T1	T2	T1	T2
N4 (48h)	T1	T2	T1	T2

Para observar la diferencia de los tratamientos se recurrió a un análisis de varianza (ANAVAR).



ETAPA II

DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO ÓPTIMAS PARA EL CRECIMIENTO MICROBIANO (BIOMASA) Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS XILANASAS

En esta fase se utilizó la metodología de Superficie de Respuesta (MSR). En primer lugar se procedió a la determinación de la significancia del efecto de factores tales como la concentración de sustrato, temperatura, pH, agitación y componentes del medio de cultivo (contenido de glucosa, urea) sobre la producción de biomasa y la actividad enzimática de las xilanasas empleando la cepa escogida en la fase de selección (ETAPA I). Para ello, se utilizó un factorial 2^6 fraccionado con 3 puntos centrales (Cuadro 10).

Cuadro 10. Niveles de estudio de los factores que influyen sobre la producción de biomasa microbiana y actividad enzimática de las xilanasas

Factores		Niveles		
		-1	0	1
X ₁	Concentración inicial del sustrato (g/l)	2,5	15	27,5
X ₂	Temperatura (°C)	30	35	40
X ₃	Agitación (rpm)	100	150	200
X ₄	Urea (g/l)	0	1,5	3
X ₅	Glucosa (g/l)	0	2,5	5
X ₆	Residuos de papa (g/l)	0	2,5	5



Una vez seleccionados estos factores se procedió a definir el diseño final para optimizar la producción de biomasa microbiana y actividad de las xilanasas.

Cuadro 11. Matriz del diseño factorial 2⁶

	Cascarilla	Temperatura	Agitación	Urea	R. papa	Glucosa
Exp	X1	X2	X3	X4	X5	X6
1	-1	-1	-1	-1	1	1
2	-1	-1	0	1	1	0
3	-1	-1	1	0	1	-1
4	-1	0	-1	1	-1	-1
5	-1	0	0	0	-1	1
6	-1	0	1	-1	-1	0
7	-1	1	-1	0	0	0
8	-1	1	0	-1	0	-1
9	-1	1	1	1	0	1
10	0	-1	-1	1	1	1
11	0	-1	0	0	1	0
12	0	-1	1	-1	1	-1
13	0	0	-1	0	-1	-1
14	0	0	0	-1	-1	1
15	0	0	1	1	-1	0
16	0	1	-1	-1	0	0
17	0	1	0	1	0	-1
18	0	1	1	0	0	1
19	1	-1	-1	0	1	1
20	1	-1	0	-1	1	0
21	1	-1	1	1	1	-1
22	1	0	-1	-1	-1	-1
23	1	0	0	1	-1	1
24	1	0	1	0	-1	0
25	1	1	-1	1	0	0
26	1	1	0	0	0	-1
27	1	1	1	-1	0	1
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0



ETAPA III

CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DEL QUITOSANO PRODUCIDO A PARTIR DE LA QUITINA OBTENIDA POR LA BIOCONVERSIÓN DE LA CASCARILLA DE CACAO POR *Aspergillus niger* (ANM-1).

1.- Cinética de fermentación en condiciones controladas

Se procedió a realizar un proceso de fermentación empleando las condiciones optimizadas de cultivo para la obtención de biomasa microbiana en un fermentador (Microferm New Brunswick Scientific, EUA). Para ello se utilizó el procedimiento que se describe a continuación (Figura 22):

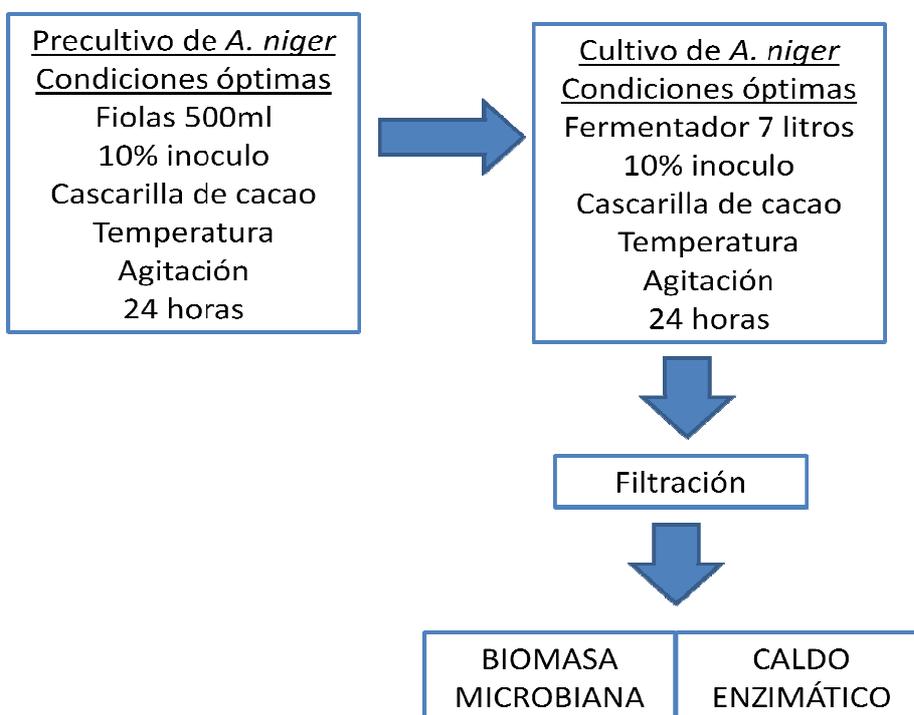


Figura 22. Esquema tecnológico propuesto para obtener biomasa microbiana a partir de la fermentación de la cascarilla de cacao por *A. niger*.



1.1.- Cultivo

El cultivo del microorganismo se realizó en un fermentador de 4 litros de capacidad, con las condiciones óptimas del cultivo (Figura 22). El medio de cultivo fue de acuerdo a los resultados obtenidos en la optimización, con la adición de 2,5 g/l del sustrato.

En el transcurso del proceso, se tomaron muestras del caldo del cultivo, esto para el seguimiento de los cambios producidos durante la fermentación mediante las determinaciones de:

- pH, esta medición se llevó a cabo utilizando un equipo marca Orión modelo 420 A con electrodo de vidrio.
- Actividad enzimática xilanasa (Loera y Cordova, 2003)
- Azúcares reductores, método DNS (Miller, 1959)

Una vez culminado el proceso de fermentación, se procedió a filtrar el caldo de cultivo y luego a pesar la biomasa microbiana obtenida retenida en el medio filtrante.

2.- Proceso de extracción de quitosano fúngico

A partir de la biomasa microbiana obtenida se realizó la extracción de quitosano de acuerdo a la metodología de Balanta *et al.*, (2010) (Figura 23). El cual se describe a continuación:

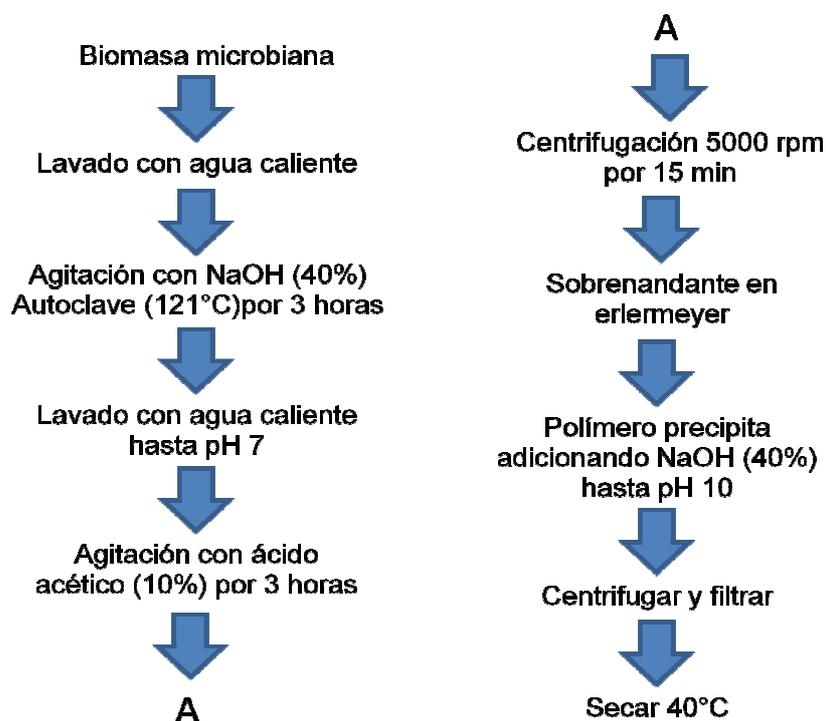


Figura 23. Proceso de extracción de quitosano fúngico.

Después del proceso de fermentación, el micelio del hongo fue recuperado por filtración (Whatman N°1). El micelio fue pesado y lavado para eliminar las impurezas presentes, se transfirió a un balón de fondo redondo de 1 L provisto de una barra magnética para agitación y posteriormente se adicionó NaOH al 40% (500 ml). La reacción en autoclave por 3 horas. Al terminar la reacción se obtuvo una pasta de color café, que se vertió en un Erlenmeyer de 4 L. Se procedió a eliminar todo exceso de NaOH, lavando la pasta resultante con abundante agua caliente, hasta que quedó de color crema, luego se midió el pH de la pasta hasta que fue cercano a la neutralidad. La pasta color crema se mezcló con CH₃COOH al 10% (500 ml) en un vaso de 4 l provisto de una barra magnética, se sometió a agitación durante 3 horas y se midió el pH de la pasta, el cual



osciló entre 3,8-4,5, luego se procedió a verter la mezcla resultante en frascos de plástico, estos se llevaron a centrifugación, a una velocidad entre 5000 rpm durante 10-15 minutos.

Los sobrenadantes de cada frasco se reunieron en Erlenmeyers de 1 L. La operación de extracción se repitió dos veces más adicionando ácido acético al 10% y los tres extractos se reunieron en un mismo recipiente.

Finalmente el polímero precipitó adicionando NaOH al 40% hasta que el pH fue de 10 y posteriormente el sistema se dejó en reposo para una completa sedimentación. El quitosano se recuperó por centrifugación y por filtración, se lavó con agua, etanol y se secó en una estufa a 40°C.

3.- Caracterización preliminar de las propiedades del quitosano fúngico

Posteriormente, se evaluaron propiedades básicas del quitosano obtenido tales como:

3.1.- Grado de desacetilación (Parada *et al.*, 2004)

Para la determinación del contenido de grupos amino de la muestra de quitosano se procedió a la disolución de 0,25 g en 10 ml de HCl 0,3 M. A continuación se tituló con una solución de NaOH 0,1 M.



La valoración se llevó a cabo midiendo el cambio de pH cada 2 ml de base añadida, la adición se realizó de forma lenta y con agitación continua para homogenizar la solución y evitar errores debidos a la posible precipitación del biopolímero (Parada, 2004).

La concentración de los grupos amino del quitosano se determinó utilizando la expresión:

$$\% NH_2 = \frac{16,1 (y-x)}{w} f$$

Donde **y** es el punto de inflexión mayor, **x** corresponde al punto de inflexión menor, ambos expresados como volúmenes, **f** es la molaridad de la solución de NaOH, **w** el peso en gramos de la muestra y 16,1 es un valor relacionado con el peso equivalente del quitosano

3.2.- Rendimiento (Cocoletzi *et al.*, 2009)

El rendimiento global (RG) del proceso se obtuvo utilizando la siguiente expresión:

$$RG = (RR/RT) \times 100$$

Donde RT es la cantidad en gramos de la muestra de biomasa microbiana con la que se comenzó el proceso y RR es igual a la cantidad en gramos del producto final (quitosano).



3.3.- Porcentaje de materia insoluble (Cocoletzi *et al.*, 2009)

El porcentaje de materia insoluble se determinó disolviendo quitosano 0,5 % (p/v) en una solución de ácido acético 0,1M con agitación constante de 200 rpm, durante 24 horas; a continuación, la muestra se filtró (papel filtro grado 610) y se secó en una estufa hasta obtener un peso constante.

3.4.- Contenido de cenizas (Análisis gravimétrico, según el método 925-46. AOAC,1990)

Las cenizas están consideradas, de forma general, como el residuo inorgánico de una muestra que se obtiene al incinerar la muestra seca a 550°C. Están constituidas por óxidos, carbonatos, fosfatos y sustancias minerales.



D.- RESULTADOS Y DISCUSIONES

1.- Caracterización del sustrato

El sustrato empleado para este estudio fue generado durante la transformación del cacao fermentado y seco por una empresa del estado Aragua. Se determinó su composición fisicoquímica, la cual se presenta en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Composición fisicoquímica del sustrato empleado

Composición	Contenido (%) Base seca
Humedad	6,68
Proteína Cruda	10,96
Nitrógeno	1,75
Grasa cruda	1,32
Ceniza	6,84
Análisis Mineral	
Ca	0,40
P	0,20
Mg	0,14
K	1,03
Na	0,06
Fibra cruda	15,30
Análisis Estructural	
Fibra detergente neutra	53,54
Hemicelulosa	14,44
Fibra detergente ácida	38,90
Lignina	15,52
Celulosa	22,71

Como se puede observar en el Cuadro 12, el sustrato en estudio está compuesto principalmente por carbohidratos complejos como la lignina (15,52%), celulosa (22,71%)



y hemicelulosa (14,44%), así como también presenta una fracción importante de minerales (6,84%). Estos resultados coinciden con los reportados por Yegres *et al.*, (2001), el cual indica en su estudio que la cascarilla de cacao está compuesta principalmente por minerales (8,5%) y carbohidratos complejos representados por fibras ricas en compuestos lignocelulolíticos (43,5%). Estos últimos contienen celulosa, hemicelulosa y lignina, polímeros difíciles de atacar por acción enzimática, debido a la ausencia de cadenas laterales que permiten a las moléculas acercarse unas a otras para formar estructuras rígidas.

Con la utilización de estos desechos lignocelulolíticos, es posible aportar una fuente de carbono de bajo costo mediante el uso de *A. niger*, microorganismo especializado en este tipo de sustrato por su alta capacidad de excretar enzimas lignocelulolíticas, obteniendo azúcares fermentables los cuales posteriormente pueden ser utilizados en procesos de fermentación para la producción de insumos de interés industrial tales como el quitosano, enzimas, proteína microbiana, antibióticos, alcohol, entre otros. Adicionalmente la cascarilla de cacao, presenta en su composición una elevada calidad nutricional para el desarrollo de microorganismos debido a su alta composición de minerales.

ETAPA I

FASE DE SELECCIÓN DE LA CEPA CON MAYOR CAPACIDAD DEGRADATIVA

Se recolectaron y analizaron los datos obtenidos a partir de los ensayos correspondientes al diseño completamente aleatorizado al medir los cambios



producidos en la actividad enzimática de las xilanasas y en el crecimiento microbiano (biomasa microbiana). En este sentido, este diseño comprendió la utilización de 2 bloques representados por los dos aislados de *A. niger* (ANM-1 y ANG) en estudio empleando dos concentraciones diferentes del sustrato en el medio (tratamientos $T_1 = 30\text{g/l}$ y $T_2 = 2,5\text{g/l}$) en el transcurso del tiempo de fermentación (niveles 0, 12, 24, 48 horas). A continuación se detallarán los resultados para cada variable.

1.- Actividad enzimática de las xilanasas

El promedio de los datos obtenidos durante el ensayo para la actividad de las xilanasas se muestra en la Figura 24, allí se puede observar que la mayor actividad reportada es de 65,93 BXU/ml con ANM-1 a las 48 horas y una concentración de sustrato de 2,5 g/l.

En el Cuadro 13, se muestran los resultados del análisis estadístico del efecto del tipo de aislado usado ANM-1 o ANG (bloques) y de la concentración del sustrato utilizado ($T_1 = 30\text{g/l}$, $T_2 = 2,5\text{g/l}$) en la producción de actividad enzimática de las xilanasas. El análisis de varianza de los datos reveló diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), en cuanto a la actividad de las xilanasas producida para el aislado ANM-1 con respecto a la obtenida por ANG, siendo superior la producción de esta enzima por ANM-1. Por su parte, no hubo diferencias significativas en relación a los tratamientos ni al tiempo o niveles del proceso (Cuadro 13).

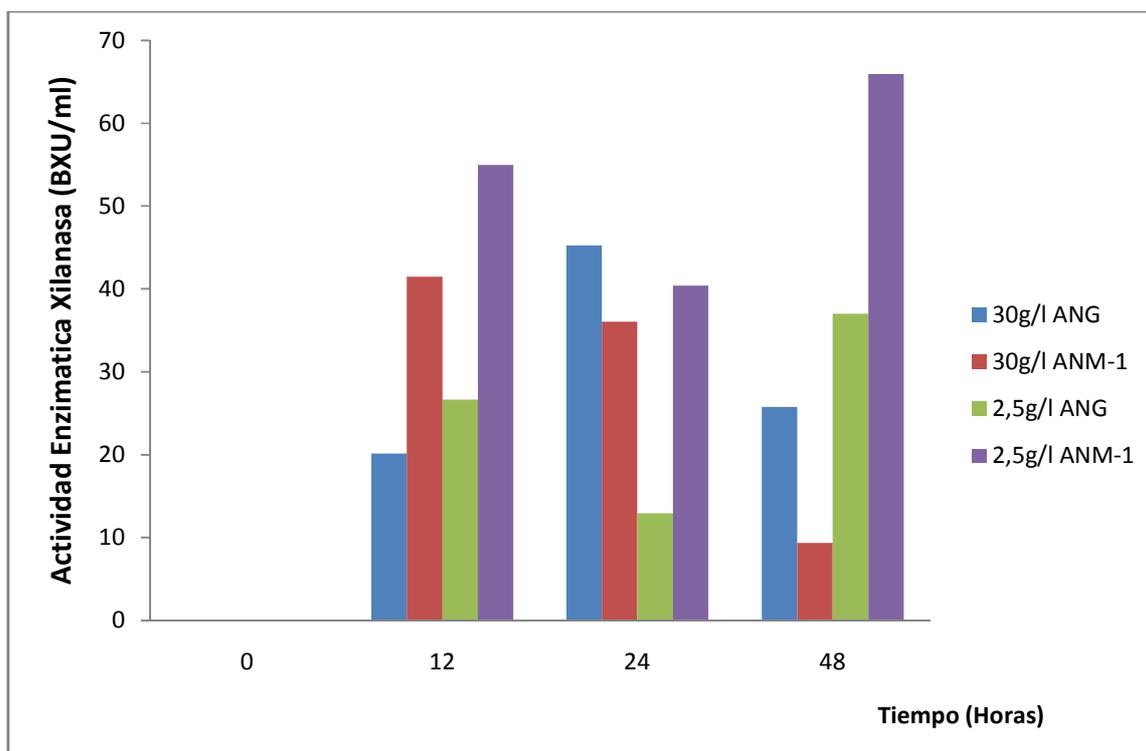


Figura 24. Actividad enzimática de las xilanasas durante el proceso de fermentación microbiana realizada por aislados de *A. niger* (ANM-1 y ANG). (Cada dato es el promedio de 3 repeticiones)

Cuadro 13. Resultados del Análisis de varianza para la actividad enzimática de las xilanasas. Estudio de los tratamientos ($T_1 = 30\text{g/l}$, $T_2 = 2,5\text{g/l}$) y bloques (ANM-1 y ANG)

Factor	p
BLOQUE	0,042*
TRATAMIENTO	0,184
BLOQUE * TRATAMIENTO	0,002**
NIVELES	0,978



Cuadro 14. Análisis de varianza para la actividad enzimática de las xilanasas. Estudio de los tratamientos ($T_1 = 30\text{g/l}$, $T_2 = 2,5\text{g/l}$) y niveles (0, 12, 24, 48 horas).

Factor	p
TRATAMIENTO	0,163
NIVELES	0,999
TRATAMIENTO * NIVELES	0,001**
BLOQUE	0,033*

* $p < 0,05$

** $p < 0,025$

2.- Biomasa microbiana

El promedio de los datos obtenidos durante el ensayo para la producción de proteína aportada por la biomasa microbiana se muestra en la Figura 25. Allí se puede observar que el mayor porcentaje de proteína reportada fue de 23,98% con ANM-1 a las 24h y concentración de sustrato 2,5g/l de cultivo.

En el Cuadro 15, se muestran los resultados del análisis estadístico del efecto del tipo de aislado usado ANM-1 o ANG (bloques) y de la concentración del sustrato utilizado ($T_1 = 30\text{g/l}$, $T_2 = 2,5\text{g/l}$) en la producción de biomasa microbiana. El análisis de varianza de los datos reveló diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), en cuanto a la biomasa microbiana producida para el aislado ANM-1 con respecto a la obtenida por



ANG. Se obtuvo un incremento de 9,46% de proteína durante la fermentación (Figura 25). Por su parte, el uso de 2,5 g/l de sustrato en el medio de cultivo (T_2) resultó altamente significativo ($p < 0,01$) en relación al resultado obtenido con T_1 . No se observaron diferencias estadísticamente significativas en relación al tiempo del proceso o niveles (Cuadro 15).

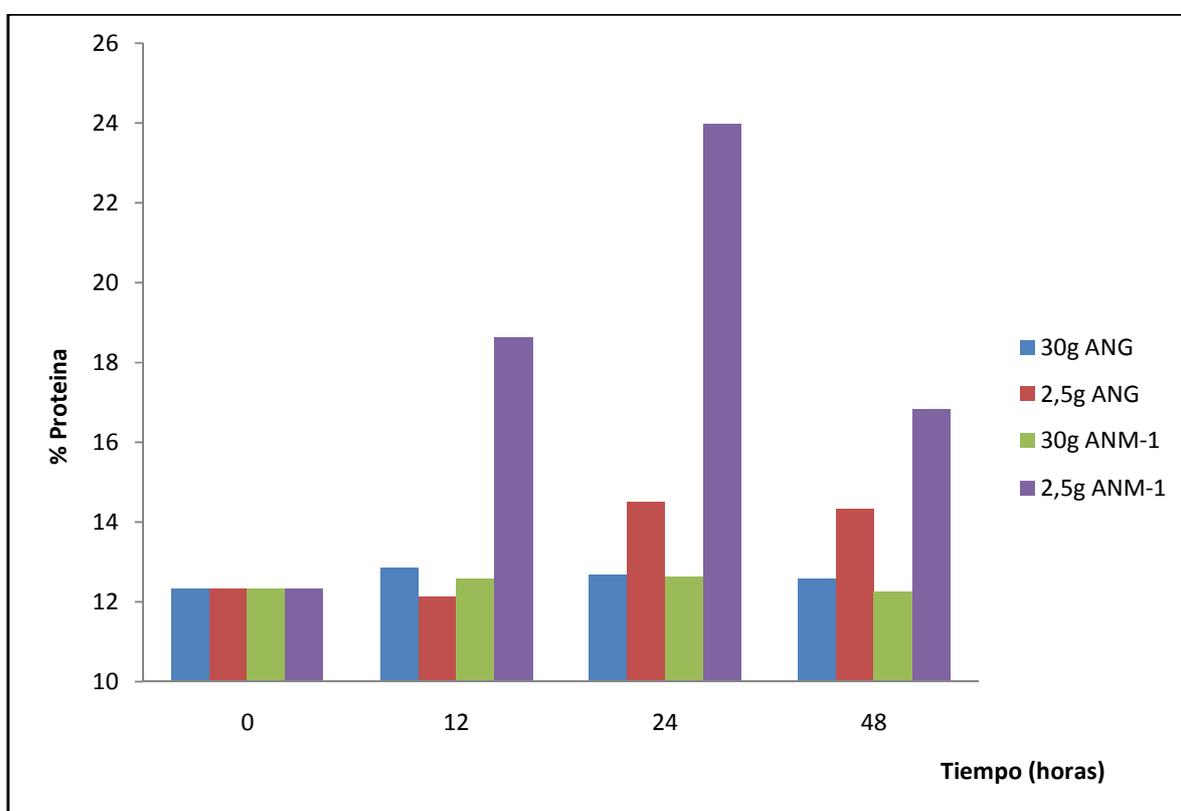


Figura 25. Proteína aportada por la biomasa microbiana durante el proceso de fermentación realizada por los aislados de *A. niger* (ANM-1 y ANG). (Cada dato es el promedio de 3 repeticiones)



Cuadro 15. Análisis de varianza para la biomasa microbiana. Estudio de los tratamientos ($T_1 = 30\text{g/l}$, $T_2 = 2,5\text{g/l}$) y bloques (ANM-1 y ANG).

Factor	p
BLOQUE	0,033*
TRATAMIENTO	0,000**
BLOQUE * TRATAMIENTO	0,022*
NIVELES	0,110

En el Cuadro 16 se puede observar el estudio estadístico del efecto realizado entre la concentración de cascarilla de cacao usada en el medio de cultivo ($T_1 = 30\text{g/l}$, $T_2 = 2,5\text{g/l}$) y el tiempo de fermentación (0, 12, 24, 48 horas). Se puede observar que en el análisis de varianza se detectaron diferencias altamente significativas ($p < 0,01$) entre los tratamientos, resultando el tratamiento T_2 (2,5g/l) superior al T_1 . Por su parte, los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en relación al efecto del tiempo de fermentación, obteniendo la máxima respuesta de producción de biomasa microbiana a las 24 horas.

En este sentido, a partir del análisis de los resultados obtenidos se determinó que el tiempo de fermentación más acorde al propósito del trabajo corresponde a 24 horas. Esto debido a que quedó evidenciado que el máximo nivel de crecimiento microbiano (proteína microbiana) se produjo en dicho tiempo, obteniendo 23,98 % de proteína por



el aislado ANM-1 y una actividad de xilanasas de 40,40 BXU/ml con la concentración de sustrato 2,5g/l.

Cuadro 16. Análisis de varianza para la biomasa microbiana. Estudio de los tratamientos ($T_1 = 30\text{g/l}$, $T_2 = 2,5\text{g/l}$) y niveles (0, 12, 24, 48 horas).

Factor	p
TRATAMIENTO	0,000**
NIVELES	0,022*
TRATAMIENTO * NIVELES	0,049*

Es importante resaltar para el tratamiento 2 ($T_2 = 2,5\text{g/l}$) el enriquecimiento proteico del sustrato fue de 45,70% por parte del aislado ANM-1 luego del proceso de fermentación, esto debido al crecimiento microbiano (biomasa), ya que los mohos y levaduras están compuestos de 25-55% de proteínas (Scragg, 1996). Para efecto de este trabajo es muy importante la determinación del crecimiento microbiano ya que la proporción de quitina es directamente proporcional a este, debido a que se encuentra en las paredes celulares del microorganismo (Maghsoodi, 2008).

La bioconversión de la cascarilla de cacao con este aislado (ANM-1) con una concentración de sustrato de 2,5 g/l durante 24 horas es viable, obteniendo una alta actividad enzimática de las xilanasas las cuales son capaces de degradar el sustrato,



adicional a un gran aporte de biomasa microbiana el cual posteriormente puede ser utilizado para generar otros metabolitos de interés tales como el quitosano.

ETAPA II

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS XILANASAS Y EL CRECIMIENTO MICROBIANO (BIOMASA MICROBIANA)

Se realizó la aplicación del diseño factorial 2^6 fraccionado para estudiar el efecto de la concentración de sustrato (cáscara de cacao) (X_1), temperatura (X_2), agitación (X_3), urea (X_4), glucosa (X_5) y residuos de papa (X_6), sobre la actividad enzimática de las xilanasas y la biomasa microbiana empleando el aislado (ANM-1) (Cuadro 10). Esto con la finalidad de determinar la mejor condición de cultivo para el aislado en mención y obtener de esa manera el mayor nivel de producción de biomasa microbiana con la que se ha reportado una relación directamente proporcional a la producción de quitina.

1.- Actividad enzimática de las xilanasas

Una vez obtenidos los datos del factorial y realizado el análisis de probabilidad y prueba de t-student correspondiente a la regresión, los resultados muestran que hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,025$) para el factor agitación. Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas en los demás factores (concentración de sustrato, temperatura, urea, glucosa y residuos de papa) para la



producción de actividad enzimática de las xilanasas. Por su parte, la regresión resultó no significativa para la variable respuesta, obteniendo un R^2 de 0,041.

Como se puede observar en la Figura 26, los resultados muestran como las variables más influyentes al sustrato (cáscara de cacao) (X_1) y la agitación (X_3), debido a su comportamiento, muestran su influencia en las variables estudiadas. Por su parte el resto de los factores mostraron una tendencia estable y sin variaciones significativas. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Yegres *et al.*, (2001), donde plantean que la adición de sales al medio (urea, sulfato de amonio, fosfato de potasio, etc) no muestran incrementos significativos y parecieran retardar la producción de enzimas pécticas en un proceso de fermentación a partir de cascarilla de cacao por un aislado de *A. niger*. Este efecto es el resultado del gran aporte mineral presente en la composición de la cascarilla, el cual es suficiente para satisfacer las necesidades del microorganismo.

2.- Biomasa microbiana

Los datos del factorial y el análisis de probabilidad y t-student correspondiente a la regresión, muestran que no hubo diferencias estadísticamente significativas en los factores de estudio en relación a la producción de biomasa microbiana. De igual forma, la regresión resultó no significativa obteniendo un R^2 de 0,331. Como se puede observar en la Figura 27, los resultados coinciden con los obtenidos para la actividad enzimática de las xilanasas, donde las variables más influyentes fueron agitación y concentración de sustrato. El resto de las variables mostraron una tendencia estable.

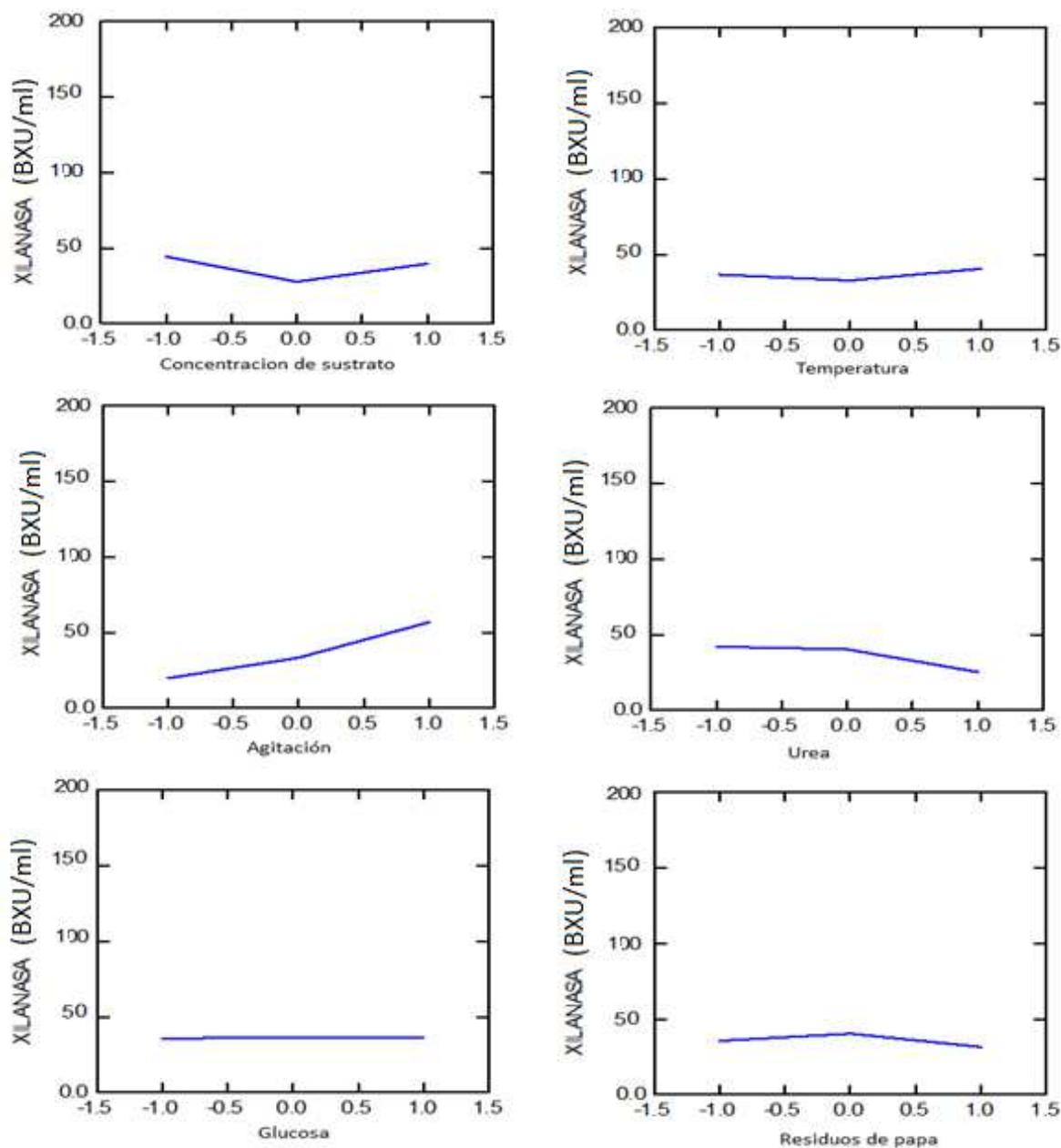


Figura 26. Grafica en función de la variable actividad enzimática de las xilanasas y su respuesta antes los diferentes factores estudiados.

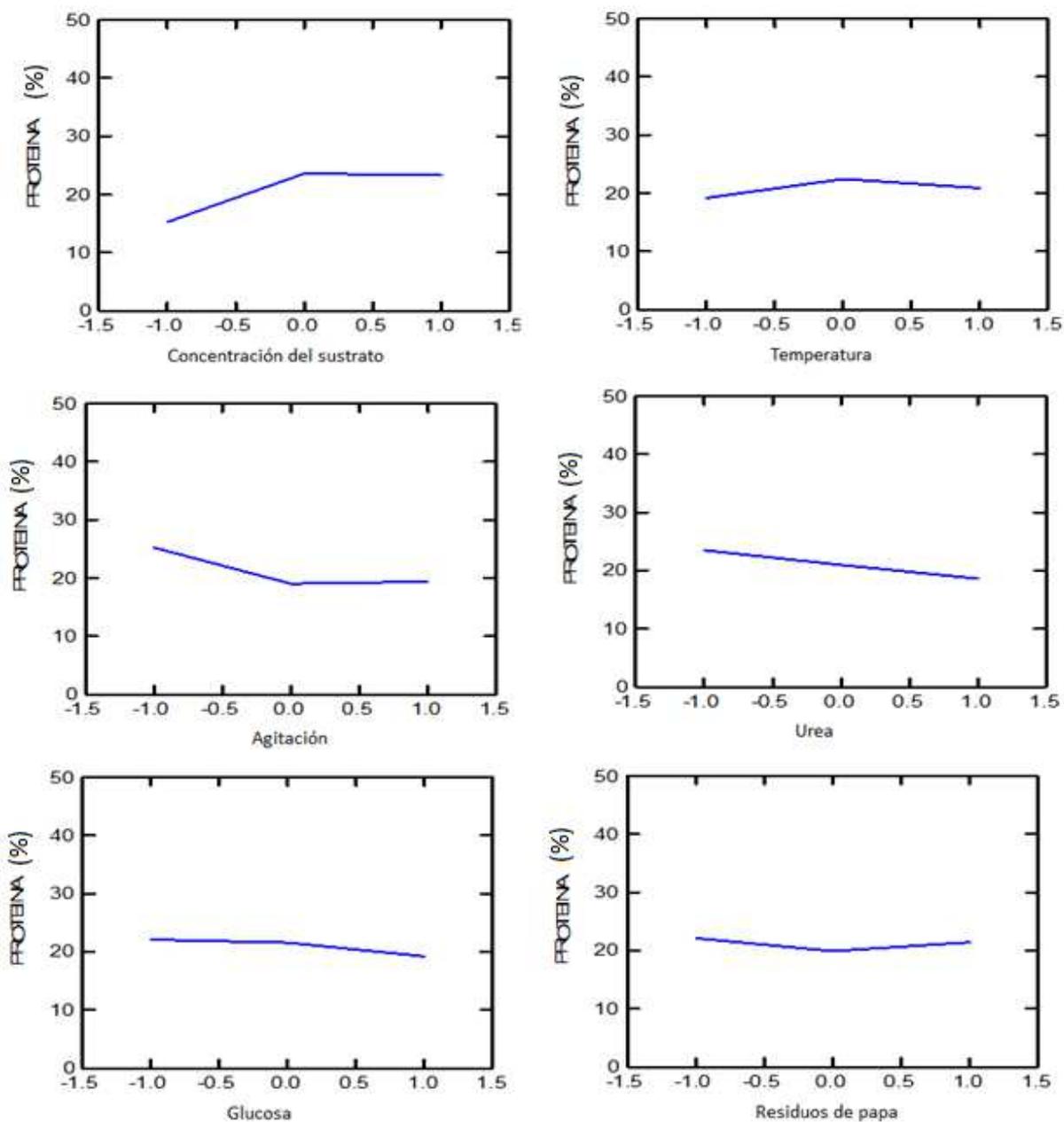


Figura 27. Grafica en función de la variable biomasa microbiana y su respuesta antes los diferentes factores estudiados.



Basado en estos gráficos se procedió a diseñar y desarrollar un nuevo ensayo, considerando la concentración de sustrato y la agitación como las variables regresoras, para establecer el modelo cuadrático que permitiera encontrar las mejores condiciones para la producción de biomasa microbiana y actividad enzimática xilanas. Para ello, se llevo a cabo un factorial 3^2 (Cuadro 17).

Cuadro 17. Niveles de estudio de los factores que influyen sobre la producción de biomasa microbiana

Factores		Niveles		
		-1	0	1
X ₁	Concentración inicial del sustrato (g/l)	2,5	27,5	52,5
X ₂	Agitación (rpm)	50	150	250

Cuadro 18. Matriz del diseño factorial 3^2

Exp	Cascarilla	Agitación
	X1	X2
1	-1	-1
2	-1	0
3	-1	1
4	0	-1
5	0	0
6	0	1
7	1	-1
8	1	0
9	1	1
10	0	0
11	0	0
12	0	0



Realizado el estudio estadístico, se mostró que hay diferencias significativas entre los tratamientos, y la regresión evidenció que el modelo presenta un buen ajuste, con un factor determinístico (R^2) de 0,964 y 0,955 para la producción de biomasa microbiana y actividad enzimática de las xilanasas, respectivamente.

En este sentido, una vez analizados los datos la metodología de superficie respuesta, se establecieron los coeficientes de regresión del modelo estimado para las variables (Cuadro 19). Por su parte, la relación entre las respuestas y las variables independientes se observan en el Cuadro 20.

Cuadro 19. Coeficientes estimados por regresión del modelo polinómico determinado para la variable biomasa microbiana y actividad enzimática xilanasas

Factor	Biomasa microbiana (Y_1)			Actividad xilanasas (Y_2)		
	Coeficiente	t	p	Coeficiente	t	p
Constante	13,112	12,927	0,000	613,480	17,834	0,000
X_1	-6,040	-6,658	0,001**	-218,317	-7,096	0,000**
X_2	-1,077	-1,187	0,280	-12,364	-0,402	0,702
X_1X_1	7,431	5,461	0,002**	114,491	2,481	0,048*
X_1X_2	1,684	1,516	0,180	-140,668	-3,048	0,023*
X_2X_2	-3,744	-2,751	0,033*	-3,428	-0,091	0,930

El análisis de estos resultados muestra una diferencia altamente significativa para el factor lineal concentración de sustrato (X_1) sobre la producción de biomasa microbiana y producción de enzimas xilanasas en el proceso de fermentación por *A. niger* (ANM-1).

De igual forma, los factores cuadráticos X_1X_1 y X_2X_2 presentan diferencias significativa



para la variable biomasa microbiana. Mientras que, los factores de interacción X_1X_1 y X_1X_2 son estadísticamente significativa para la actividad enzimática xilanasa.

Cuadro 20. Resultados observados en los ensayos y valores estimados obtenidos para las variables biomasa microbiana (Y_1) y actividad de xilanasas (Y_2)

X_1 (Concentración de sustrato)	X_2 (Agitación)	Biomasa microbiana (Y_1)		Actividad xilanasa (Y_2)	
		Estimado	Observado	Estimado	Observado
-1	-1	24,758	24,6589	816,27	789,67
-1	0	26,583	29,9581	946,29	901,53
-1	1	20,92	17,6453	794,97	866,33
0	-1	10,445	10,1603	485,18	582,41
0	0	13,112	12,3938	613,48	611,21
0	1	8,291	10,9864	460,45	368,62
1	-1	10,994	11,3806	383,06	312,43
1	0	14,503	13,5388	509,65	559,82
1	1	10,524	11,1044	354,91	375,38
0	0	13,112	12,2785	613,48	603,58
0	0	13,112	12,6666	613,48	630,15
0	0	13,112	12,6988	613,48	603,58

Para cada variable se determinó el modelo cuadrático, con el que se describe la respuesta correspondiente a las variables biomasa microbiana (Y_1) y actividad enzimática xilanasa (Y_2), las ecuaciones del modelo resultante se muestran a continuación:



Proteína microbiana (%) =

$$13,112 + (-6,040 * X_1) + (-1,077 * X_2) + (7,431 * X_1 X_1) + (1,684 * X_1 X_2) + (-3,744 * X_2 X_2)$$

Actividad enzimática de las xilanasas (BXU/ml) =

$$613,480 + (-218,317 * X_1) + (-12,364 * X_2) + (114,491 * X_1 X_1) + (-140,668 * X_2 X_2) + (-3,428 * X_1 X_2)$$

Por su parte, al obtener el polinomio ajustado para las variables dependientes, se estableció la superficie de respuesta con la finalidad de poder observar las condiciones óptimas para la producción de biomasa microbiana y actividad enzimática de las xilanasas. Las graficas de superficie se muestran en la Figura 28.

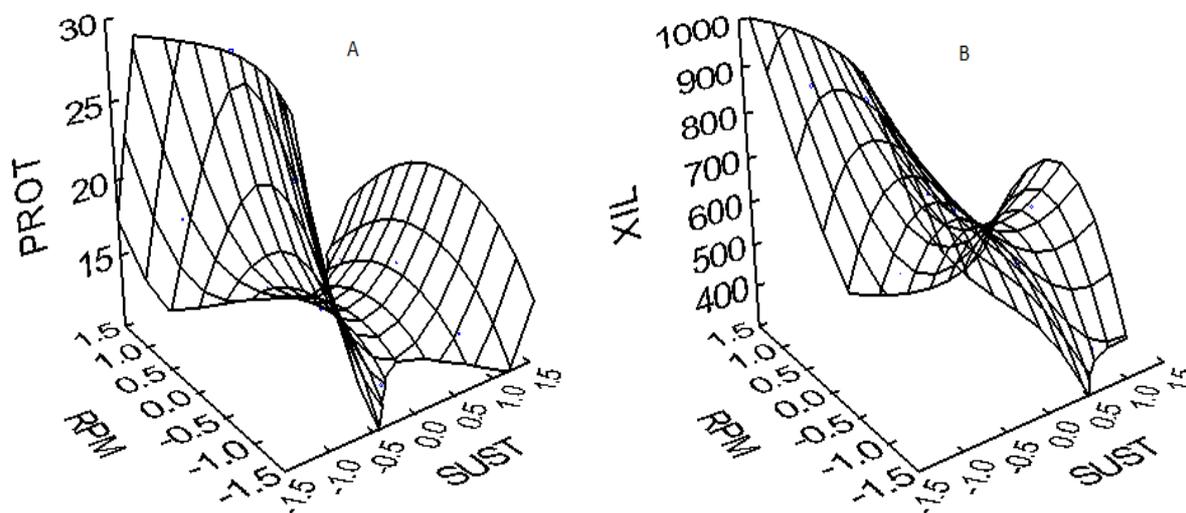


Figura 28. Graficas de superficie de respuesta para la producción de biomasa microbiana (A) y actividad enzimática xilanasas (B), en relación con los factores estudiados (concentración de sustrato y agitación).



Para las variables en estudio (biomasa microbiana y actividad enzimática xilanasa) el punto crítico fue un punto de silla y no un punto máximo por lo que se manifiesta en la grafica (Figura 28). Por tal razón, se procedió a realizar el análisis de Ridge, manteniendo constante el factor agitación (150rpm) debido a que tuvo menos influencia sobre las variables, mediante este análisis se estimo el valor de las variables estudiadas (Cuadro 21).

Cuadro 22. Resultados obtenidos en el punto crítico y punto medio para la caracterización de las superficie de respuesta en la optimización de las variables biomasa microbiana y actividad enzimática xilanasa

	X_0		Y_0	
	BIOMASA MICROBIANA (% Proteína)	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA XILANASA (BXU/ml)	BIOMASA MICROBIANA (% Proteína)	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA XILANASA (BXU/ml)
PUNTO CRÍTICO	$X_1 = 144,89$ rpm $X_2 = 37,805$ g/l	$X_1 = 144,44$ rpm $X_2 = 51,315$ g/l	11,895	509,84
PUNTO MEDIO	$X_1 = 150$ rpm $X_2 = 27,5$ g/l	$X_1 = 150$ rpm $X_2 = 27,5$ g/l	13,112	613,48

Los resultados revelaron que el valor más elevado de la biomasa microbiana dentro de los límites de la región estudiada fue de 26,583% de proteína con una concentración de sustrato de 2,5g/l. Esto coincide con los resultados obtenidos para la variable actividad enzimática de las xilanasas, donde el valor más elevado para esta variable fue de 946,29 BXU/ml con una concentración de sustrato de 2,5g/l.



Cuadro 21. Estimación según el análisis de Ridge para una respuesta máxima en la biomasa microbiana y la actividad enzimática xilanasa en el proceso de fermentación de la cascarilla de cacao por *A. niger* (ANM-1).

Agitación	Sustrato	Xilanasa	Biomasa microbiana
150	27,5	613,48	13,112
150	26,75	620,13	13,3
150	26	626,99	13,501
150	25,25	634,06	13,716
150	24,5	641,33	13,944
150	23,75	648,8	14,185
150	23	656,49	14,44
150	22,25	664,38	14,708
150	21,5	672,47	14,99
150	20,75	680,77	15,285
150	20	689,28	15,593
150	19,25	697,99	15,914
150	18,5	706,91	16,249
150	17,75	716,04	16,598
150	17	725,37	16,96
150	16,25	734,91	17,335
150	15,5	744,65	17,723
150	14,75	754,6	18,125
150	14	764,76	18,54
150	13,25	775,12	18,969
150	12,5	785,69	19,411
150	11,75	796,46	19,867
150	11	807,44	20,335
150	10,25	818,63	20,817
150	9,5	830,02	21,313
150	8,75	841,62	21,822
150	8	853,42	22,344
150	7,25	865,43	22,88
150	6,5	877,65	23,429
150	5,75	890,07	23,991
150	5	902,7	24,567
150	4,25	915,54	25,156
150	3,5	928,58	25,759
150	2,75	941,83	26,375
150	2,5	946,29	26,583



Con la estimación según el análisis Ridge (Cuadro 21) se logró el incremento de la biomasa microbiana y actividad enzimática xilanasa en 54,68% y 45,31% respectivamente con respecto al punto crítico. Así mismo, se logró incrementar las variables en estudio en 50,67% para la biomasa microbiana y 35,17% para la actividad enzimática xilanasa con respecto al punto medio (Cuadro 22).

En este sentido, en un sistema de fermentación sumergido a escala de laboratorio, las condiciones óptimas para la producción de biomasa microbiana y actividad enzimática xilanasa por *Aspergillus niger* (ANM-1) a partir de la degradación de cascarilla de cacao, fueron las siguientes: Concentración de sustrato 2,5 g/l, agitación 150 rpm, pH inicial 4,7, temperatura 35°C, sin adición de sales al medio. Estos resultados coinciden con los planteados por Yegres *et al.*, (2001), donde en su investigación en un sistema de fermentación las condiciones óptimas para el crecimiento de un aislado de *A. niger* a partir de cascara de cacao fue de: 30°C, pH 4,8, sin adición de sales al medio.

ETAPA III

CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL QUITOSANO PRODUCIDO A PARTIR DE LA QUITINA OBTENIDA POR LA BIOCONVERSIÓN DE LA CASCARILLA DE CACAO POR *Aspergillus niger* (ANM-1).

1.- Proceso de fermentación

Una vez obtenidas las condiciones óptimas de cultivo se procedió a realizar el cultivo en fermentador de mayor capacidad para obtener mayor cantidad de micelio y de esa



manera extraer la quitina de las paredes celulares de micelio y su posterior transformación en quitosano. El microorganismos fue cultivado en un fermentador de 4 litros de capacidad empleando las condiciones óptimas, a 35°C, 150rpm, aireación de 3vvm, el inoculo fue del 10%. (Figura 29).



Figura 29. Proceso de fermentación para la obtención de biomasa microbiana a partir de la degradación de cascarilla de cacao por *A. niger* (ANM-1).

Una vez finalizado el proceso de fermentación, se procedió a filtrar la biomasa microbiana (Figura 30). Durante esta etapa se obtuvo 58,32g de biomasa microbiana en



los 4 litros de cultivo fermentados. Lo que equivale a 14,58g de biomasa por cada litro de fermentación a partir de cascarilla de cacao por *A. niger*. Es importante resaltar que se realizaron 5 tandas de fermentación, obteniendo en total 291,6 g de biomasa, a partir de la cual consecutivamente se realizó el proceso de extracción de quitina y su posterior transformación en quitosano.

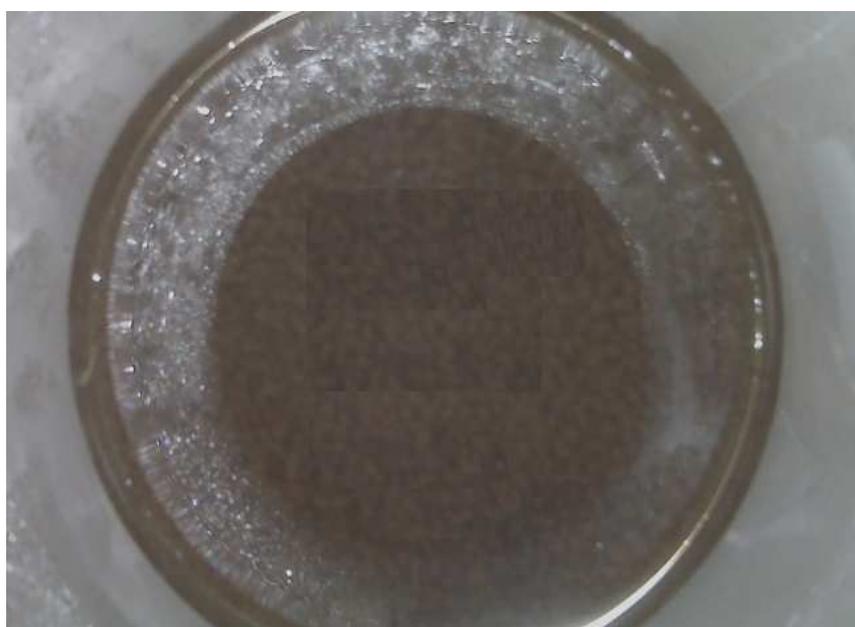


Figura 30. Biomasa microbiana obtenida a partir de la degradación de cascarilla de cacao por *A. niger* (ANM-1).

2.- Estudio de la cinética de fermentación

Durante el proceso de fermentación, se realizó el monitoreo de los cambios producidos mediante las determinaciones de pH, azúcares reductores y actividad enzimática de las xilanasas.



En la Figura 31, se observa que el pH descendió durante el tiempo de fermentación hasta 3,54. Lo anterior coincide con el estudio llevado a cabo por algunos autores donde se reporta que esa disminución es atribuida a la producción de ácidos orgánicos por el microorganismo durante el proceso. Según Wainwright, (1992), *Aspergillus niger* es particularmente importante en la fabricación ácido cítrico y glucónico.

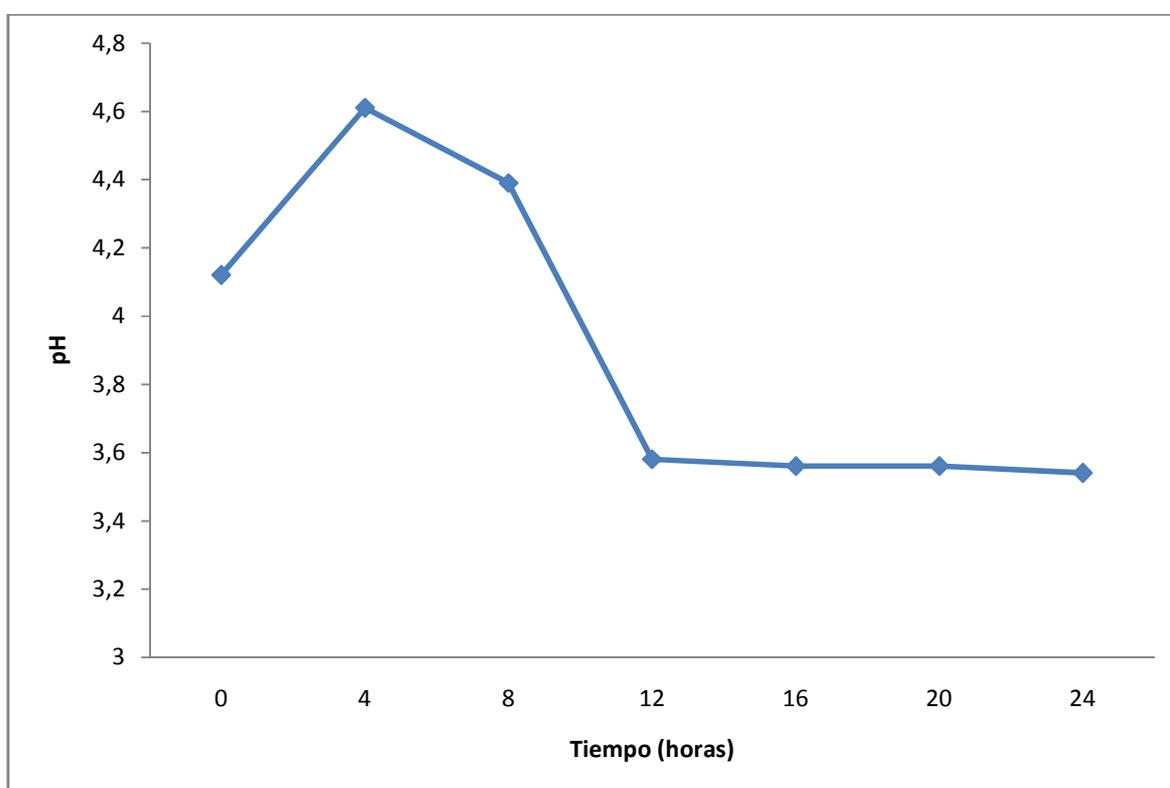


Figura 31. Comportamiento del pH durante el proceso de fermentación de cascarilla de cacao con el aislado de *A. niger* (ANM-1).

Por su parte, se puede observar en la Figura 32 durante el proceso de fermentación el incremento en las primeras 4 horas del 31,5% del contenido de azúcares en el caldo, producto de la hidrólisis de los carbohidratos complejos presentes en el sustrato y su



degradación en azúcares simples. Esta hidrólisis del sustrato es consecuencia de la acción de las enzimas excretadas por *Aspergillus niger*, liberando azúcares fermentables (Monsalve *et al*, 2006). Posterior a este periodo, se observa una disminución de un 39,5% del contenido de azúcares, debido a su utilización por parte del microorganismo para el desarrollo y crecimiento microbiano, debido a que al ser su fuente de energía más fácil de metabolizar el hongo va hacer uso de la misma en primera instancia (Morales *et al.*, 1999). Lo anterior permite que los niveles de azúcares no causen la inhibición, ni se experimenten cambios fisiológicos en *A. niger* producto del mecanismo de regulación fisiológica conocido como represión catabólica (Domínguez, 2008).

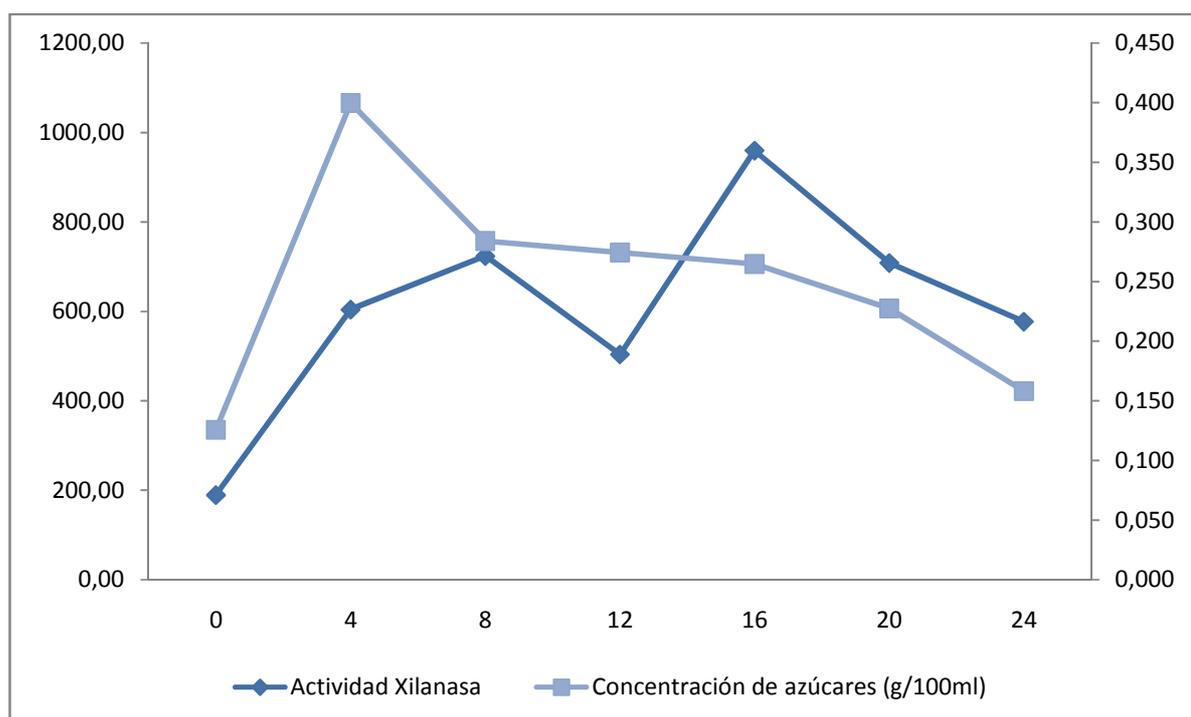


Figura 32. Concentración de azúcares reductores y actividad enzimática de las xilanasas durante el proceso de fermentación de cascarilla de cacao con el aislado de *A. niger* (ANM-1).



De igual forma, este ensayo muestra el comportamiento en la producción de enzimas xilanasas como respuesta a la capacidad degradativa por parte de *A. niger*. En la Figura 32 se evidencia que la actividad enzimática máxima de las xilanasas con un valor de 723,14 BXU/ml se alcanza a las 16 horas de iniciado el proceso fermentación y posteriormente disminuye.

De estos resultados podría considerarse dos aspectos importantes, Por una parte, el comportamiento observado durante las primeras horas del proceso sería consecuencia de que el microorganismo activa la maquinaria enzimática para producir las enzimas xilanasas, observándose un incremento de la concentración de azúcares producto de la hidrólisis enzimática. En segundo lugar, a partir de las 8 horas, el hongo primero consume los azúcares solubles que se encuentran en el medio y, una vez que comienzan a agotarse, vuelven a producir enzimas xilanasas que hidrolicen el sustrato nuevamente. Estos resultados coinciden con lo propuesto por Fondevilla (1998), donde propone que las enzimas hidrolizarían los polisacáridos a azúcares más pequeños (mono y disacáridos) de fácil asimilación.

Estos resultados coinciden con los reportados por Fuentes *et al.*, (2005), donde la mayor producción xilanolítica se presentó en fermentación en estado sumergido a partir de salvado de trigo a 37°C, obteniendo 665,7 BXU/ml de actividad a las 72 horas.

Es importante resaltar, que para la utilización de estas enzimas en la industria, se hace necesario en investigaciones posteriores purificar dichas enzimas, y evaluar sus



propiedades fisicoquímicas y funcionales, además de estudiar sus condiciones óptimas de actividad y su termoresistencia para ser incluida en procesos que impliquen tratamientos térmicos como la pelletización en la alimentación animal

3.- Caracterización preliminar del quitosano obtenido

A partir de los 291,6 g de biomasa obtenidos en el proceso de fermentación, se procedió a realizar el proceso de extracción de quitina y su posterior transformación en quitosano. Durante el proceso de obtención de quitosano se determinó que el rendimiento fue de 1,047% (Figura 33). La tendencia expuesta anteriormente coincide con los resultados obtenidos en otros estudios. Balanta (2010), extrajo quitosano a partir del micelio de *A. niger* y logró un rendimiento de 1,07% en su investigación.



Figura 33. Quitosano obtenido a partir de la quitina obtenida por la bioconversión de la cascarilla de cacao por *Aspergillus niger* (ANM-1).



El cuadro 23 muestra los resultados de la determinación del grado de desacetilación, porcentaje de ceniza y materia insoluble del quitosano fúngico obtenido con la quitina extraída de la biomasa microbiana de *A. niger* (ANM-1), en el mismo cuadro se incluyen valores reportados por otros autores para muestras de quitosano fúngico

Cuadro 23. Porcentaje de cenizas, grado de desacetilación y materia insoluble del quitosano fúngico obtenido con la quitina extraída de la biomasa microbiana de *A. niger* (ANM-1).

Muestra	Procedencia	% Grado de desacetilación	% Cenizas	% Materia insoluble
Este trabajo	Biomasa <i>A. niger</i> (ANM-1)	86,64	1,06	3,531
Cocoletzi et al., 2009	Exoesqueleto de camarón	-	1,40	1,80
Balanta et al., 2010	Biomasa <i>A. niger</i>	77,04	-	-
Khalaf, 2004	Biomasa <i>A. niger</i>	73-90	-	-
Pochanavanich y Suntornsuk, 2002	Biomasa <i>A. niger</i> TISTR3245	90	-	-

El grado de desacetilación indica el contenido de grupos amino presentes en una muestra de quitosano, este fue determinado por titulación potenciométrica (Parada *et al*,



2004). En la Figura 34 se puede apreciar que la curva de titulación obtenida presentó 2 puntos de inflexión, cuyos valores fueron determinados según el criterio de la primera derivada, esto coincide con los resultados reportados por Parada *et al*, (2004). La diferencia entre los puntos de inflexión representa la cantidad de ácido requerido para protonar los grupos aminos del quitosano obtenido.

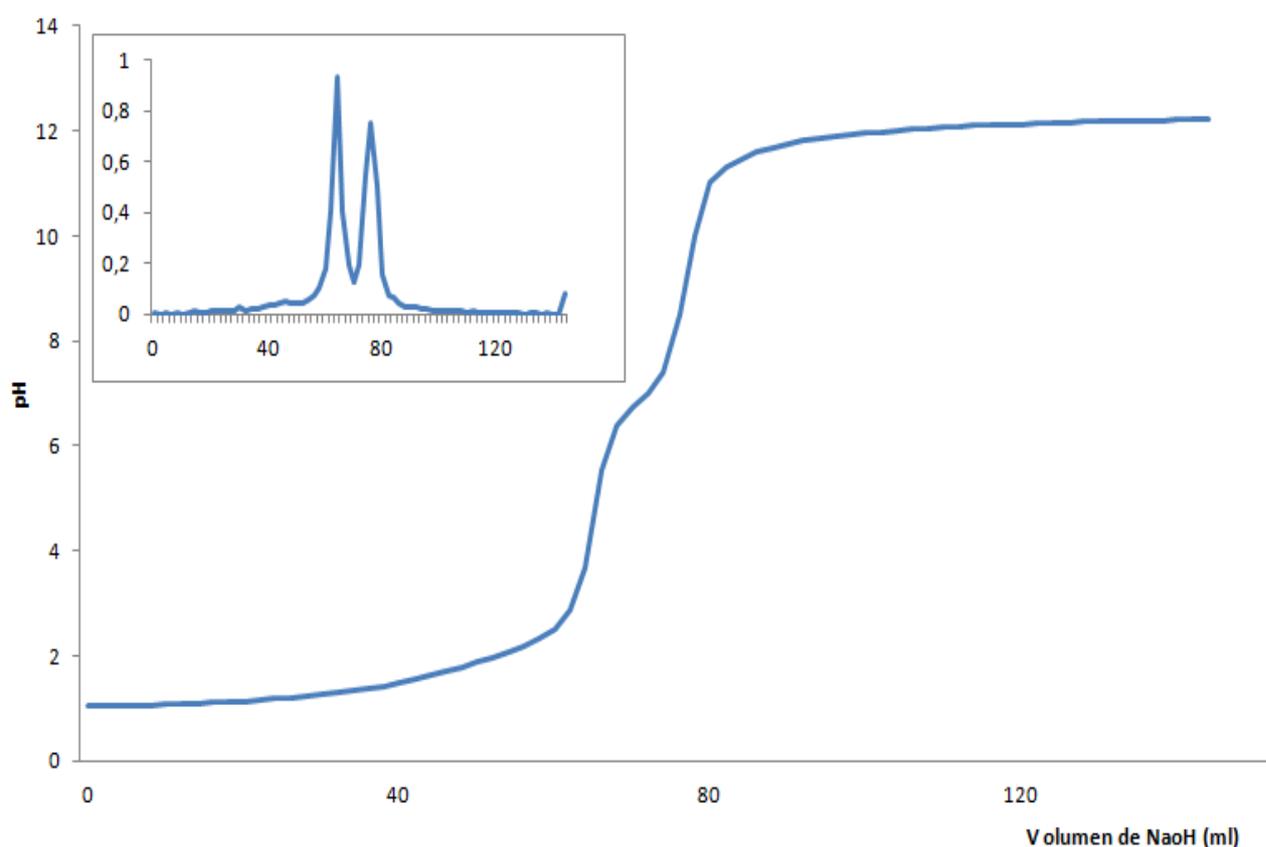


Figura 34. Curva de titulación para el quitosano fúngico obtenido a partir de la quitina producida por la bioconversión de la cascarilla de cacao por *A. niger* (ANM-1). En el recuadro se muestra la primera derivada, los máximos corresponden a los puntos de inflexión.



De esta Figura 34 se ve que $x = 64$ ml y $y = 76$ ml. El grado de desacetilación se obtuvo con la ecuación propuesta por Parada *et al.*, (2004), utilizando 0,223 g de quitosano. Por lo tanto, el grado de desacetilación fue de 86,64%. Es importante hacer notar que el quitosano comercial que se ofrece en el mercado presenta un porcentaje de desacetilación a partir del 60%. Por su parte, como se observa en el cuadro 25, estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores, obteniendo un quitosano con un alto grado de desacetilación.

El grado de desacetilación es un parámetro importante que afecta a las propiedades físico-químicas del quitosano. De hecho, la carga positiva de gran densidad debido al alto grado de desacetilación del quitosano obtenido por biomasa fúngica presenta propiedades únicas para aplicaciones industriales, en particular como el quitosano para la coagulación de agentes físicos y químicos en el tratamiento de aguas residuales, así como también como un agente quelante y clarificante en la industria de alimentos, y como un agente antimicrobiano (Khalaf, 2004).

El resultado correspondiente al porcentaje de ceniza está influenciado por la presencia de impurezas de tipo mineral, como el calcio, contenido en sales de CaCO_3 o incluso la presencia de contaminantes metálicos (Cocoletzi *et al.*, 2009). El contenido de cenizas en el quitosano obtenido fue de 1,06%. El valor obtenido es inferior respecto a las muestras analizadas por Cocoletzi *et al.*, (2009), los cuales reportaron en su investigación un contenido de cenizas de 1,40%. Según este autor, el resultado depende, en gran medida, del origen, propiedades y condiciones de obtención del



quitosano. Durante la transformación de quitosano, se utilizan altas concentraciones de NaOH (40%), debido a las características estructurales de este polímero, es posible la retención de impurezas, las cuales se ven reflejadas en este análisis.

Por su parte, la concentración de material insoluble es superior a la de las muestras obtenidas en su investigación por Cocolletzi *et al.*, (2009) a partir de exoesqueleto de camarón. Este respuesta, podría ser el resultado de que durante el proceso de extracción de quitina, a pesar de todos los procesos químicos a la cual es sometida la biomasa microbiana, no se logra toda la separación del sustrato y la biomasa, es posible que queden restos de cascarilla de cacao los cuales presentan material inorgánico, que son insolubles al ácido acético.

Basado en las propiedades fisicoquímicas del quitosano obtenido el cual presentó un alto grado de desacetilación, bajo contenido de cenizas y bajo contenido de materia insoluble, algunos autores proponen su uso en la industria de alimentos, tratamientos de aguas, industria farmacéutica, entre otros.

En este sentido, Guibal (2004), ha estudiado el efecto del quitosano sobre las propiedades la adsorción de metales, colorantes y compuestos orgánicos entre otros. El proceso de coagulación-floculación, así como la adsorción proceso depende del grado de desacetilación, el quitosano es más eficiente que la quitina para eliminar los iones de metal. Comparando muestras de quitosano con diferentes grados de desacetilación



para la adsorción de un colorante azoico la muestra con el mayor grado de desacetilación mostró la mayor eficiencia.

Así mismo, recientemente, Liu *et al.*, (2008) han informado de que las ratas alimentadas con dietas que contienen el quitosano con mayor grado de desacetilación reduce significativamente el colesterol plasmático LDL-C y aumento el nivel de HDL-C. Adicionalmente, los resultados de los experimentos indican que, en general, el quitosano de bajo peso molecular (27,5 kDa), viscosidad mediana (48 a 78 kDa) y alto grado de desacetilación (85-98%) son efectiva para suprimir el crecimiento de las bacterias gram-positivas y gram-negativas (Aranaz *et al.*, 2009). Por su parte, los estudios sobre el efecto de la solubilidad del quitosano revelan que el quitosano insoluble en agua muestra mayor efecto antimicrobiano. Las muestras con una solución de alto grado de desacetilación extendieron el periodo de vida útil de 5 a 9 días. (Tsai *et al.*, (2002).

Por otra parte, una importante aplicación del quitosano en la industria es en el desarrollo de sistemas de administración de fármacos como las nanopartículas, hidrogeles, microesferas, las películas y tablas. Tres características principales de quitosano a considerar son: peso molecular, el grado de acetilación y la pureza (contenido de cenizas) (Aranaz *et al.*, 2009).

En este sentido, el presente trabajo, constituye un aporte importante en el estudio preliminar de la producción de actividad enzimática xilanasa y biomasa microbiana de



A. niger producida a partir de cascarilla de cacao para la extracción de quitina y su posterior transformación. Mediante la optimización de la biomasa microbiana y la actividad enzimática de las xilanasas, usados como indicadores de la degradación del sustrato y crecimiento microbiano, se logró mejorar la eficiencia del proceso en 50,67% y 35,17% para la biomasa microbiana y actividad enzimática xilanasas, respectivamente. A partir de la biomasa fúngica se extrajo quitina la cual fue transformada en quitosano revelando un gran potencial de acuerdo al estudio preliminar de sus propiedades fisicoquímicas. Por otra parte, con el caldo enzimático obtenido, se hace necesario la purificación de las enzimas xilanasas y su posterior estudio. Así mismo, investigaciones adicionales deben orientarse en la profundización de las propiedades del quitosano fúngico obtenido a partir de la transformación de la quitina extraída de las paredes celulares de microorganismos cultivados a partir de residuos lignocelulolíticos y sus posibles usos en la industria.



E.- CONCLUSIONES

- De los microorganismos evaluados, el aislado de *Aspergillus niger* (ANM-1), demostró de manera significativa tener mayor capacidad de degradación en el proceso de fermentación a partir de cascarilla de cacao según su capacidad enzimática (actividad de las xilanasas) y de crecimiento (proteína microbiana), por lo cual fue seleccionado para las experiencias realizadas en este trabajo.
- Se determinó, a través del diseño completamente aleatorizado que el tiempo de fermentación más acorde al propósito del trabajo fue de 24 horas. Logrando el máximo nivel de crecimiento microbiano (proteína microbiana) en dicho tiempo, obteniendo 23,98 % de proteína por el aislado ANM-1 y una actividad de xilanasas de 40,40 BXU/ml con la concentración de sustrato 2,5g/l.
- Factores físicos y químicos tales como la temperatura, pH, urea, glucosa, residuos de papa, resultan no influenciar significativamente a la actividad de las xilanasas y al crecimiento microbiano (proteína microbiana). En este sentido, la cascarilla de cacao constituye, sin necesidad de añadirles nutrientes, un sustrato adecuado para formular medios de cultivo para el desarrollo microbiano en un sistema de fermentación sumergido.
- Mediante el uso de la metodología de superficie respuesta, se determinaron los factores significativos en las condiciones de cultivo (concentración de sustrato:



2,5g/l; agitación: 150rpm) que permiten incrementar respecto al control, en 50,67% y 35,17% el crecimiento microbiano y la actividad enzimática xilanasa respectivamente, cuando el aislado ANM-1 utiliza los desechos del procesamiento de cacao como sustrato.

- Se desarrolló un esquema del proceso biotecnológico para la obtención de quitosano a partir de la quitina extraída de las paredes celulares de la biomasa microbiana en condiciones optimizadas de la cascarilla de cacao por *A. niger*.
- Se caracterizó en forma preliminar el quitosano obtenido. Este polímero presentó un alto grado de desacetilación (86,64%), bajo contenido de cenizas (1,06%) y bajo contenido de materia insoluble (3,53%).



F.- RECOMENDACIONES

- Se sugiere determinar el peso molecular del quitosano obtenido a partir de la quitina extraída de la biomasa microbiana obtenida por fermentación de la cascarilla de cacao por el aislado ANM-1
- Es necesario purificar las enzimas xilanasas obtenidas, y evaluar sus propiedades fisicoquímicas y funcionales, además de estudiar sus condiciones óptimas de actividad y de termoresistencia.
- Se recomienda evaluar los posibles usos del quitosano obtenido, cuyas propiedades parecen ser potenciales, en industrias tales como alimentos, farmacéutica y sistemas de tratamientos de agua.
- Evaluar los estudios de factibilidad técnico-económico del proceso biotecnológico desarrollado con *A. niger* a partir de la valorización de los desechos del procesamiento de cacao.



G.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adamek, L; Beran, M; Molik, P. 2001. Characterization of chitosan isolated from *Aspergillus niger* industrial waste mycelium. Department of Quality Features and Microbial Products, Food Research Institute Prague. pp. 1-30.
2. Aranaz, I; Mengibar, M; Harris, R; Paños, I; Miralles, B; Acosta, N; Galed, G; Heras, A. 2009. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current Chemical Biology*. 3: 203-230.
3. Association of official Analytical Chemistry. 1990. Official Methods of Analysis of the A.O.A.C. 15ed. Washington, D. C.
4. Balanta, D; Grande, C; Zuluaga, F. 2010. Extracción, identificación y caracterización de quitosano del micelio de *Aspergillus niger* y sus aplicaciones como material bioadsorbente en el tratamiento de aguas. *Revista iberoamericana de biopolímero*. 11(5):297-316.
5. Bertsch, A.; Diaz, I. y Coello, N. 2010. Optimization of shrimp waste fermentation by *Kocuria rosea* to obtain a protein hydrolysate. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería de la Universidad del Zulia*. 33(2):1-8.



6. Bhat, M. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology advances*. 18:355-383.
7. Birch, G; Blakebrough, N; Parker, K. 1981. *Enzymes and Food Processing*. Appl. Sci. Publishers. Pp. 1-15.
8. Blumenthal, C. 2004. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. *Current chemical biology*. 3(2):203-230.
9. Brown, C; Campbell, I; Priest, F. 1989. *Introducción a la biotecnología*. Editorial Acribia, S.A., Zaragoza. pp.80-81.
10. Bu'Lock, J; Fristiansen, B. 1991. *Biotecnología básica*. Editorial Acribia. Zaragoza, España. pp. 97-102.
11. Caprile, M. 2009. *Obtención y Utilización de Quitina y Quitosano a partir de desechos de crustáceos*. Proyecto de investigación 626 – 8000. Universidad de Argentina.
12. Carrera, J. 2003. *Producción y aplicación de enzimas industriales*. Facultad de Ciencias Agropecuarias. 1 (1): 9-15.



13. Carrillo, 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta. pp. 44-60.
14. Casanovas, 1997. Nuevo producto de fibra de cacao a base de cascara de cacao tostada. Oficina española de patentes y marcas. N° publicación ES 2 099676. España.
15. Cocolletzi, H; Águila, E; Flores, A; Viveros, E; Ramos, E. 2009. Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies y Vacío* 22(3) 57-60.
16. Coello, N; Bernal, C; Bertsch, A; Estrada, O; Moccoo, Y; Hasegawa, M. 2003. Las plumas como residuo agroindustrial: su utilización biotecnológica para producir insumos de interés industrial. *Revista de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Central de Venezuela*. 18 (3): 119 – 126. Venezuela.
17. Cuervo, L; Folch, J; Quiroz, R. 2009. Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *Biotecnología*. 13(3):11-25.
18. Delfin, I; Durán, C. 2003. Biodegradación de residuos urbanos lignocelulosicos por *Pleurotus*. *Revista internacional de contaminación ambiental*. 19(1):37-45.



19. Diaz, A; Florez, J; Cotes, A. 2005. Optimización de un medio de cultivo para la producción de la levadura *Pichia onychis*. Revista Colombiana de Biotecnología. 7(1):51-58.
20. Diorio, L; Forchiassin, F; Papinutti, V; Sueldo, D. 2003. Actividad enzimática y degradación de diferentes tipos de residuos orgánicos por *Saccobolus saccoboloides* (Fungi, Ascomycotina). Revista Iberoamericana Micología. 20:11-15.
21. Domínguez, G. 2008. Obtención y evaluación nutricional de un aditivo microbiano a partir de la fermentación del pastificio por *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae* para la alimentación de pollos de engorde. Trabajo de grado. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. pp.25.
22. Dreyer, A.; Coello, N. Y Montiel, E. 2000. Utilización de la metodología de superficie de respuesta en la optimización de un medio de cultivo para la producción de l-lisina por *Corynebacterium glutamicum*. Agronomía Tropical 50(2):167-188.
23. Dustet J. C; Falony, G. 2006. Obtención de lipasas de *Aspergillus niger* por fermentación sólida”, Memorias VI Congreso Internacional de Química e Ingeniería Química, La Habana, Cuba. pp. 1705–1708.



24. Ertola, R; Yantorno, O; Mignone, C. 1994. Microbiología industrial. Ben Gurion University, Israel. pp. 1-15.
25. European Food Safety Authority. 2010. Scientific Opinion on the safety of 'Chitin-glucan' as a Novel Food ingredient. EFSA Journal. 8(7):1687.
26. Fondevila, M. 1998. Procesos implicados en la digestión microbiana de los forrajes de baja calidad. [en línea]. [07 de Septiembre de 2010] <http://images.google.co.ve/imgres?imgurl=http://www.revfacagronluz.org>.
27. Food and Agriculture Organization. 2010. Produccion de cacao en Venezuela. [En línea]. [07 de Julio de 2010].
28. Freedonia Group. 2009. World Enzymes. Industry Study with Forecasts for 2013 & 2013. Pp. 4-6.
29. Freitas S; Lago, R; Jablonka, F; Hartman, L. 1993. Extraction aqueuse enzymatique de l'huile d'avocat á partir de la pulpe fraiche. Revue Francaise descorps Gras. 2: 365-371.
30. Frost y Sullivan. 2005. European Markets for Enzymes in Food Applications. Market Engineering Research.



31. Fuentes; J; García, M; Pérez, J; Membrillo, I; Martínez, A. 2005. Producción de xilanasas por *Aspergillus niger*: cultivos sumergido y sólido con residuos agroindustriales. Congreso nacional de biotecnología y bioingeniería. VII Simposio internacional de producción de alcoholes y levaduras.
32. Gallardo, O. 2007. Caracterización de nuevas xilanasas bacterianas. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona. pp. 79-135.
33. García, M; Quintero, R; López, A. 1999. Biotecnología Alimentaria. Editores Noriega. México. pp. 383-396
34. Gholizadeh, M. 2010. Extraction of chitosan from Fungal cell wall by Sulfuric acid Studying the effect of Deacetylation degree and temperature on recovery chitosan. Trabajo de grado. Universidad de Bora. Facultad de Ingeniería Química. pp. 13-25.
35. González. 2007: Manual del manejo de cacao en las costas de Aragua. Fonaiap – Fundacite Mérida. Venezuela.
36. Grebechova, R; Prieto, L. 2006. Biosíntesis de las enzimas pectinoliticas a partir de hongos *Aspergillus niger* y *Aspergillus foetidus* para la aplicación en la industria de alimentos. Revista de investigación. 6(2):153-162.



37. Guibal, E. 2004. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: A review. *Sep Purif Technology*. 38(1): 43-74.
38. Gutiérrez, J; Munguia, L, Tarradellas, J. 1996. Estudios de residuos industriales en Tegucigalpa. Monografía. Dirección general de salud. Tegucigalpa, Honduras. pp. 4-22.
39. Hart, F; Fisher, J. 1991. Análisis moderno de los alimentos. Editorial Acribia S. A. Zaragoza, España. pp. 15-51.
40. Herrera, D; Socarras, U; Rodriguez, Y. 2010. Servicio de vigilancia tecnológica: Quitosana, un caso de estudio. Proyecto IDICT. Industria entre Dragones y San José, La Habana, Cuba. pp. 1-23.
41. Holker, U; Hofer, M; Lenz, J. 2004. Biotechnology advantages of laboratory-scale solid state fermentation. Part I. *Process Biochemistry*. 12:24-27.
42. Howard, R., Abotis, E., Van, J., y Howard, S. 2003. Lignocellulose biotechnology: Issues of bioconversion And anzyme production. *African Journal of Biotechnology*. 2 pp. 602-619.
43. Ikram, H; Tasneem, M; Raana, K; Khan, A; Mukhtar, H; Javed, M. 2004. Optimization of Cultural Conditions for the Production of Xylanase by Chemically



- Mutated Strain of *Aspergillus niger* GCBCX-20. International journal of agriculture and biology. 6(6):1115-1118.
44. Instituto Nacional de Estadística. 2009. Generación de residuos sólidos en Venezuela años 200. 2006 y 2007. 1:1-10.
45. Ismail, A; Yee, C. 2006. Antioxidative effects of extracts of cocoa shell, roselle seeds and a combination of both extracts of the susceptibility of cooked beef to lipid oxidation. J. Food Technology. 4 (1):10-15.
46. Julián, M; Ramos, L; Suarez, Y. 2008. Fermentación en estado sólido (II). Optimización de medios de cultivo. Tecnología Química. 28(1):5-10.
47. Kalvatchev, Z; Garzaro, D; Guerra, F. 1998. *THEOBROMA CACAO L.*: Un nuevo enfoque para nutrición y salud. Agroalimentaria. 6:23-25.
48. Keen, C; Holt, R; Oteiza, P; Fraga, C; Schmitz, H. 2005. Cocoa antioxidants and cardiovascular health. Journal Clinical Nutrition. 81(1):298-303.
49. Khalaf, F. 2004. Production and Characterization of Fungal Chitosan Under Solid-State Fermentation Conditions. Journal Agriculture Biology. 6(6):1034-1036.



50. Kucera, J. 2004. Fungal mycelium—the source of chitosan for chromatography. *Journal of Chromatography B*, 808:69–73.
51. Labala, J. 2007. Aditivos en alimentación porcina. Publicaciones especializadas. *Vetinews* 2007(1):1-3.
52. Lares, C. 2008. Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. *Revista UDO Agrícola* 8 (1): 1-22.
53. Lechurdi, G. 2006. Obtención de enzima fitasa a partir de una cepa del hongo *Aspergillus ficuum*, por medio de fermentación en sustrato sólido y sumergido. *Revista colombiana de biotecnología*. 6(1): 73-83.
54. Lemus, J. 2007. Obtención y uso de quitosano para tratamientos dérmicos a partir de exoesqueleto de camarón. *Boletín electrónico. Facultad de Ingeniería, Universidad Rafael Landívar*. 7:1-13.
55. Liu, J; Zhang, J; Xia W. 2008. Hypocholesterolaemic effects of different chitosan samples in vitro and in vivo. *Food Chemistry*. 107(1): 419-25.



56. Loera O; Córdova, J . 2003. Improvement of xylanase production by a parasexual Cross between *Aspergillus niger* strains. Braz. Archive Biology Technology. 46: 177-181.
57. López, R. 2007. Las paredes celulares de levadura *Saccharomyces cerevisiae*: Un aditivo natural capaz de mejorar la productividad y salud del pollo de engorde. Trabajo especial de grado. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. pp. 78-94.
58. Maddox, I., Richert, S. 1977. Use of response surface methodology for the optimization of microbiological media. Journal Applied Bacteriology. 43: 197-204.
59. Maghsoodi, V. 2008. Influence of Different Nitrogen Sources on Amount of Chitosan Production by *Aspergillus niger* in Solid State Fermentation. Journal Chemical Engineer. 27(1):47-52.
60. Maghsoodi, V; Razavi, J; Yaghmaei, S. 2009. Production of Chitosan by Submerged Fermentation from *Aspergillus niger*. Chemistry and Chemical Engineering. 16(2): 145-148.
61. Márquez, A, Mendoza, G; González, S; Buntinx, S; Loera, O. 2007. Actividad fibrolítica de enzimas producidas por *Trametes sp EUM1*, *Pleurotus ostreatus*



- IE8*, y *Aspergillus niger* AD 96, en fermentación sólida. *Interciencia*. 32(11): 780-785.
62. Matute, L. 2010. Estudio comparativo del proceso de obtención de un aditivo enzimático mediante fermentaciones microbianas sólidas y sumergida de afrechillo de trigo. Trabajo de grado. Universidad de Carabobo. Facultad de Ingeniería de Procesos. Postgrado Ingeniería Química, pp. 194.
63. Medina, 1999. Obtención de proteína unicelular mediante la acción de *Chaetomium cellulolyticum* en lodos de papelería. Tesis Ing. Agr. Maracay, Venezuela. Universidad Central de Venezuela. pp.2-19.
64. Miller, G. 1959. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*. 31:426.
65. Miyadi, V. 2010. Caracterización de un aditivo enzimático destinado a la alimentación de cerdos. Trabajo de grado. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Pp.55
66. Monsalve, J; Medina, V; Ruiz, A. 2006. Producción de etanol a partir de la cáscara de banano y de almidón de yuca. *Dyna*. 150:21-27. Medellín, Colombia.



67. Morales, P; Trejo, B; Salazar, A; Aguilar, G. Efectos de las Xilanasas de *Aspergillus* sp. Fp-470 sobre las Propiedades Reológicas de Masas. Journal Universidad del Valle. 1:1-5.
68. Morocoima, J. 2008. Caracterización del cocultivo de *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae* para la obtención de etanol a partir de los residuos del procesamiento agroindustrial de la papa (*solanum tuberosum*). Trabajo de grado. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. pp.60.
69. Moulay; L. 2007. Proceso para preparar un extracto de cacao altamente soluble. Patente p20050108. España.
70. Mujica, M. 2005. Bioconversión de los residuos del procesamiento de pasta alimenticia en etanol por *Aspergillus Níger* y *Saccharomyces cerevisiae*. Trabajo de grado. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. pp.75.
71. Murillo, 2008. Evaluación de 2 Dietas Experimentales con Diferentes Niveles de Cascarilla de Cacao (*Theobroma cacao* L.) en las Fases de Crecimiento y Acabado de Cuyes (*Cavia porcellus* L.) de Raza Andina. Trabajo de grado. Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción, Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL). Ecuador. pp. 1-8.



72. Nadarajah, K; Abdul, J. 2009. Characterization of chitosan from *Absidia butleri* dr. Malaysian Applied Biology. 38 (1): 55-60.
73. Narasimha, G., Sridevi, A., Buddolla, V., Chandra, S., y Reddy, R. 2005. Nutrient effect on production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger*. African Journal of Biotechnology.. 5 pp. 472-476.
74. Negrín, S; Sosa, A; Ayala, M; Diosdado, E; Pérez, M; Pujol, M; Fernández, J; Muzio, V; Castellanos, L; González, L; Cremata, J; Quintana, M; Pérez, G; Valdés, J; Rodríguez, M; Borroto, M; González, C; Morales, J; Duarte, C; Pérez, R; Ubieta, R; Costa, L; Rosales, I; Herrera, L; Lage, A. 2007. Enseñanza popular de la biotecnología. Revista Biotecnología Aplicada. 24:53-57.
75. Nigam, P. y Singh, D. 1995. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. Enzyme and Microbial Technology 17:77-778. Nueva York, Estados Unidos.
76. Norma Salvadoreña. 2006. Agua. Agua potable. NSO.13.49.01.09. Ministerio de Salud Pública y Asistencia. El Salvador.
77. Nwe, N y Stevens, W. 2002. Production of fungal chitosan by solid substrate fermentation followed by enzymatic extraction. Biotechnology Letters. 24:131-134.



78. Nwe, N. y Stevens, W. 2004. Effect of urea on fungal chitosan production in solid substrate fermentation. *Process Biochemistry*. 39:1639-1642.
79. Olubamiwa, I; Hamzat, R; Oluwalan, O; Oladunjoye, A. 2000. Producción de mermelada usando patina extraída de la vaina de cacao. 13a sesión: Utilización eficiente del cacao / nuevos usos del cacao y sus subproductos. 15e Conferencia Internacional sobre investigaciones del cacao. pp.101.
80. Ovando, S; Waliszewski, K. 2005. Preparativos de celulasas y xilanasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Red de Rev. científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal*. 21(42):113-122.
81. Pandey, A; Soccol, C; Mitchell, D. 2000. New Developments in Solid State Fermentation: IBioprocesses and Product. *Process Biochemistry* 35: 1153–1169.
82. Parada, L; Crespín, G; Miranda, R; Katime, I. 2004. Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica. *Revista iberoamericana de biopolímero*. 5(1):1-16.
83. Pochanavanich, P; Suntornsuk, W. 2002. Fungal chitosan production and its characterization. *Letters in Applied Microbiology*. 35:17–21.



84. Ponce, T; Pérez, O. 2002. Celulasas y xilanasas en la industria. *Avance y Perspectiva*. 21:273-277.
85. Quintero, M; Cartay, R. 2000. El circuito del cacao en Venezuela, 1990 - 1999: caracterización y estrategias para mejorar la competitividad. *Agroalimentaria*. 11: 61-70.
86. Rodríguez, D. 2007. Selección y caracterización de aislados de *Aspergillus niger* capaces de degradar los residuos del procesamiento de banano. Trabajo de grado. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. pp.1-13.
87. Rodríguez, L; Rodríguez, M; Rocio, N. 2008. Estudio de la inhibición de la enzima tanasa producida por *Aspergillus Niger* Gh1 en fermentación en estado sólido. *Rev. Ciencia UAT*. 7:50-53.
88. Sáez, A., Flores, L. y Cadavid, A. 2002. Caracterización de una cepa nativa de *Aspergillus niger* y evaluación de la producción de ácido cítrico. *Revista Universidad EAFIT*. 128:33-40. Medellín, Colombia.
89. Sánchez; R; Najul, M; Ortega, E. 2009. El manejo de los residuos en la industria de agroalimentos en Venezuela. *INCI*. 34(2): 91-99.



90. Schuster, E; Duna-Coleman, N; Frisvad, J. 2002. On the safety of *Aspergillus niger* - a review. *Applied Microbiology Biotechnology*. 59:426-435.
91. Scragg, A. 1996. *Biotecnología para ingenieros. Sistemas biológicos en procesos tecnológicos*. Limusa Noriega Editores. México D.F. pp. 197-307.
92. Steel, R., y Torrie, J.(1988). *Bioestadística: Principios y procedimientos* . 2 ed. México. 622 p.
93. Tsai, G; Su, W; Chen, H; Pan, C. 2002. Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. *Fisheries Science*. 68:170-7.
94. Valeri, D. 2006. *La magia de las enzimas*. Unicamp. Énfasis Alimentación. San Pablo, Brasil. pp. 73-78.
95. Van Soest, J; Wine, R. 1967. Use of detergents in analysis of fibrous feeds. LV. Determination of plant cell wall constituents, *Journal of the A.O.A.C.* 50:50.
96. Vega, A., Flores, L., y Cadavid, A. 2002. Caracterización de una cepa nativa de *Aspergillus niger* y evaluación de la producción de ácido cítrico. *EAFIT*. 128 pp. 33-42.



97. Wainwright, M. 1992. Introducción a la biotecnología de los hongos Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. pp. 217-220.
98. Walker, J; Gingold, E. 1997. Biología molecular y biotecnología. 2da edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España. pp. 11-15.
99. Wu, T; Zivanovic, S; Draughon, A; Conway, W; Sams, C. 2005. Physicochemical properties and bioactivity of fungal chitin and chitosan. Journal agriculture food chemistry. 53:3888-3894.
100. Yegres, S; Sánchez, J; Belmar, M; Riveros, W; Belmar, D. 2001. Producción de enzimas pécticas ensayos preliminares. Revista Saber. 13(1):55-59.
101. Yegres, S; Sánchez, J; Belmar, M; Riveros, W; Belmar, D. 2005. Producción de enzimas pécticas ensayos preliminares. Revista Saber. 13(1):55-59.
102. Yu Cao, Y; De-jing, M; Jian, L; Jie, L. 2008. Statistical optimization of xylanase production by *Aspergillus niger* AN-13 under submerged fermentation using response surface methodology. African Journal of Biotechnology. 7(5):631-638.



ANEXO 1

Anexo 1a. Estudio estadístico de los diferentes factores estudiados en función de la actividad enzimática xilanasa

	Factor	t	p
X1	Concentración de sustrato	-0,306	0,762
X2	Temperatura	0,330	0,744
X3	Agitación	2,407	0,025*
X4	Urea	-1,089	0,288
X5	Glucosa	0,218	0,830
X6	Residuos de papa	-0,263	0,795

Anexo 1b. Estudio estadístico de los diferentes factores estudiados en función de la biomasa microbiana

	Factor	t	p
X1	Concentración de sustrato	0,130	1,687
X2	Temperatura	-0,548	0,599
X3	Agitación	-0,802	0,446
X4	Urea	-1,030	0,333
X5	Glucosa	0,434	0,676
X6	Residuos de papa	-0,263	0,795