

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción

Evaluación del uso de cáscaras de plátano aplicando una fermentación en estado sólido para la producción de celulasas

INGE-2253

Proyecto Integrador

Previo la obtención del Título de:

Ingenieros en alimentos

Presentado por:

Ericka Andreina Torres Giler

Ronald Orlando Intriago Rengifo

Guayaquil - Ecuador

Año: 2023

Dedicatoria

El presente proyecto lo dedico a mis padres, por su gran esfuerzo durante mi etapa universitario, por todo el apoyo económico y emocional que me brindaron cuando más lo necesitaba en esta etapa así mismo le quiero dedicar este proyecto a Dios que siempre estuvo pendiente de mi en todo momento

Ronald Intriago.

A mis padres quienes me brindan siempre su amor incondicional y apoyo en cada nuevo desafío que me propongo; por la guía que me brindan, por su dedicación, paciencia y sus valiosas enseñanzas que han forjado la persona que soy hoy en día. A mis abuelitas quienes con sus palabras de aliento me motivaban a no rendirme y luchar por mis metas.

Ericka Torres

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento a mi tutor de tesis el Doctor Sócrates Palacios que siempre estuvo pendiente de nuestro trabajo, avances en cada etapa del proyecto y por apoyo en todo momento para que este proyecto sea posible, también quiero agradecer a las técnicas de investigación por su ayuda en el proyecto

Ronald Intriago

Agradezco a Dios por darme la fortaleza y la sabiduría que me ha permitido alcanzar este logro. A mi tutor de tesis Ph.D Sócrates Palacios por todo su apoyo en este proyecto, por todas sus enseñanzas y por compartir cada una de sus experiencias en el campo de la investigación. Y a mis amigos que han apoyaron a lo largo mis estudios universitarios.

Ericka Torres

Declaración Expresa

Nosotros Ronald Orlando Intriago Rengifo y Ericka Andreina Torres Giler acordamos y reconocemos que: La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá los autores, sin perjuicio de lo cual la ESPOL recibe en este acto una licencia gratuita de plazo indefinido para el uso no comercial y comercial de la obra con facultad de sublicenciar, incluyendo la autorización para su divulgación, así como para la creación y uso de obras derivadas. En el caso de usos comerciales se respetará el porcentaje de participación en beneficios que corresponda a favor del autor o autores. La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, software o información no divulgada que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada por nosotros durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que nos corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de nuestra innovación, de ser el caso.

En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique a los autores que existe una innovación potencialmente patentable sobre los resultados del proyecto de graduación, no se realizará publicación o divulgación alguna, sin la autorización expresa y previa de la ESPOL.

Guayaquil, 24 de enero del 2024.



Ericka Andreina Torres
Giler



Ronald Orlando Intriago
Rengifo

Evaluadores

Tania M. Guzmán, PhD.

Profesor de Materia

A Sócrates. Palacios, PhD.

Tutor de proyecto

Resumen

El proyecto evaluó la producción de celulasas a partir de cáscaras de plátano verde mediante fermentación en estado sólido. La investigación se justifica por la creciente importancia de obtener enzimas a partir de residuos que contienen material lignocelulósico. Los objetivos incluían la obtención de extractos enzimáticos a partir de fermentaciones en estado sólido, cuantificar actividad enzimática celulítica, así como, estimar costos de producción a escala piloto. Se partió de la hipótesis de que la fermentación con cáscaras de plátano daría lugar a la presencia de enzimas celulasas. Las técnicas utilizadas incluyeron la cuantificación de las enzimas celulasas, el análisis estadístico, el diseño factorial y la estimación de costos.

Los materiales y equipos utilizados incluyeron bandejas de aluminio, el software estadístico Minitab, el reactivo DNS y hojas de cálculo Excel. Los resultados obtenidos indican una viabilidad en la aplicación de la técnica de fermentación en bandejas de aluminio. Se observó una mayor actividad enzimática en los extractos provenientes de los tratamientos con 600 μm y 50% de humedad, así como en los tratamientos con 600 μm y 30% de humedad se estimaron los costos de producción del extracto enzimático, obteniendo un precio de venta al público (PVP) del producto de aproximadamente \$20. En conclusión, el proyecto demostró la viabilidad de la producción de celulasa a partir de cáscaras de plátano, con importantes implicaciones para futuras investigaciones en este campo.

Palabras Clave: Fermentación en estado sólido, actividad enzimática, DNS, cáscaras de plátano verde.

Abstract

The project evaluated the production of cellulases from green plantain peels through solid-state fermentation. The research was justified by the growing importance of obtaining enzymes from residues containing lignocellulosic material. The objectives included obtaining enzyme extracts from solid-state fermentations, quantifying cellulolytic enzyme activity, and estimating production costs on a pilot scale. The hypothesis was that fermentation with green plantain peels would result in the presence of cellulase enzymes. The Techniques used included cellulase enzyme quantification, statistical analysis, factorial design, and cost estimation.

The materials and equipment used included aluminum trays, Minitab statistical software, DNS reagent, and Excel spreadsheets. The results obtained indicate that the aluminum tray fermentation technique was feasible. Higher enzyme activity was observed in treatments with 600 μm and 50% moisture and in treatments with 600 μm and 30% moisture. The production costs of the enzymatic extract were estimated, obtaining a retail price product (RRP) of approximately \$20. In conclusion, the project demonstrated the feasibility of cellulase production from green plantain peels, with important implications for future research in this field.

Keywords: Solid state fermentation, enzyme activity, DNS, green plantain peels.

Índice general

Resumen.....	I
Abstract.....	II
Índice general.....	III
Abreviaturas.....	V
Simbología.....	VI
índice de figuras.....	VII
Índice de tablas.....	VII
Capítulo 1.....	1
1 Introducción.....	1
1.1 Descripción del problema.....	1
1.2 Justificación del problema.....	2
1.3 Objetivos.....	2
1.3.1 <i>Objetivo general</i>	2
1.3.2 <i>Objetivos específicos</i>	2
1.4 Marco teórico.....	3
1.4.1 <i>Generalidades de Cascara de Plátano</i>	3
1.4.2 <i>Hongos filamentosos</i>	3
1.4.3 <i>Aspergillus spp</i>	4
1.4.4 <i>Enzimas</i>	5
1.4.5 <i>Fermentación en estado sólido</i>	6
1.4.6 <i>Métodos de cuantificación</i>	7
Capítulo 2.....	9
2 Metodología.....	9
2.1 Diseño de experimento.....	10
2.2 Cuantificación enzimática.....	11
2.2.1 <i>Espectrofotometría</i>	11
2.2.2 <i>Curva de calibración</i>	12
2.3 Fermentación en medio solido.....	12
2.3.1 <i>Adaptación de la cepa</i>	12
2.3.2 <i>Concentración de esporas</i>	13
2.3.3 <i>Montaje de fermentación</i>	13
2.4 Estimación de costos.....	16
2.4.1 <i>Diagrama de flujo de proceso</i>	16
2.4.2 <i>Diagrama de relación de actividades</i>	16

2.4.3	<i>Capacidad de producción</i>	17
2.4.4	<i>Diagrama de relación de espacios</i>	17
2.4.5	<i>Costos</i>	18
Capítulo 3	19
3	Resultados y análisis	19
3.1	Adaptación de cepas	19
3.2	Diseño factorial	20
3.3	Cuantificación enzimática.....	26
3.4	Diseño de planta.....	28
3.4.1	Diagrama de flujo de proceso	28
3.4.2	Diagrama de relación de actividades (TRA).....	30
3.4.3	Estimación de espacios.....	30
3.4.4	Plano de diseño de instalaciones	31
3.5	Estimación de costos	32
Capítulo 4	33
4	Conclusiones y recomendaciones	33
4.1	Conclusiones	33
4.2	Recomendaciones.....	33
Referencias	35
APÉNDICE	38

Abreviaturas

DNS	Acido 3.5 dinitrosalicílico
ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
FCB	Fehling Causse Bonnans
FES	Fermentación en estado solido

Simbología

μ	Velocidad específica de crecimiento
FPU/g	Actividad enzimática celulítica por gramo de sustrato
Kg	Kilogramo
μ l	Microlitro
ml	Mililitro
Cu	Cobre
L	Litro
Kw	Kilowatts

Índice de figuras

Figura 1	Curva de calibración azúcares reductores	8
Figura 2	Reacción característica del método de Fehling	8
Figura 3	Extractos previamente obtenidos de investigaciones anteriores	9
Figura 4	Extractos.....	11
Figura 5	Extracción de esporas	13
Figura 6	Determinación del contenido de humedad.....	15
Figura 7	Preparación de bandejas para FMS.....	15
Figura 8	Extracción por medio de papel filtro	15
Figura 9	Crecimiento de <i>Aspergillus Flavus</i> en cáscaras de plátano verde	19
Figura 10	Diagrama de Pareto de cada variable independiente.....	22
Figura 11	Diagrama de relación de variables independiente.....	25
Figura 12	Actividad enzimática celulasa total de extractos	27
Figura 13	Diagrama de flujo de proceso para la obtención del extracto enzimático	29
Figura 14	Diagrama de relación de actividades.....	30

Índice de tablas

Tabla 1	Tratamientos experimentales obtenidos del diseño arreglo factorial	10
Tabla 2	Simbología para la elaboración de diagrama de relación de actividades	17
Tabla 3	Corridas experimentales y las variables de respuesta	21
Tabla 4	Resultados de la actividad enzimática por cada tratamiento evaluado.....	26
Tabla 5	Estimación de espacios	31
Tabla 6	Estimación de costos de producción por batch.....	32

Capítulo 1

1 Introducción

1.1 Descripción del problema

La producción de plátano representa gran importancia económica y seguridad alimentaria en muchos países especialmente en centro América y ciertas regiones de Latinoamérica, por lo general el plátano se produce en países que tiene un desarrollo industrial bajo siendo Europa y Estados Unidos lo principales importadores de este fruto (Álvarez Morales et al., 2020). El cultivo de plátano representa unas de las actividades agrícolas más importante en el Ecuador, en el 2010 Ecuador exporto aproximadamente 265 millones cajas de 18,14 kg lo que se aproxima a 4 millones de toneladas (Cedeño, 2015). Ecuador representa uno de los mayores exportadores de producto agrícola en el mundo siendo una de las más importante la comercialización del plátano, representando un 32 % del comercio de este fruto en el mundo (Melo Sabogal et al., 2015). Un estudio realizado por investigadores de la Universidad Politécnica de Madrid determinó que la relación entre el residuo y la producción de plátano es de 2:1, sin considerar el residuo generado por el fruto descartado, rechazo que puede variar entre el 8% y el 20 % (Guerrero et al., 2016).

La cascara de plátano, representa entre el 35 % y 40 % del fruto generando residuos que se podrían usar para crear otros productos con valor agregado (Melo Sabogal et al., 2015). Este subproducto en la industria o del mismo cultivo no se aprovecha rentablemente, a veces se usa como abono para el suelo, pero se ha demostrado que usarlo así no ayuda a la nutrición del suelo, sino a la proliferación de plagas, esto afecta de forma negativa al ambiente y se convierte en pérdidas económicas para la industria. Sin embargo, varios estudios afirman que es posible usar este subproducto en la industria de la transformación como son las industrias de biocombustibles, biopolímeros, bioquímicos, textiles, artesanales, alimentarias, químicas, entre otros (Ibarra & Márquez, 2022).

1.2 Justificación del problema

Gracias a estudios realizados por expertos se ha determinado que en Ecuador existe aproximadamente 224.137 hectáreas dedicadas a la producción de plátano, otros estudios afirman que el material aprovechable de esta producción es tan solo de 38.604 hectáreas, esta generaría aproximadamente unas 190.102 toneladas de fruto descartado (Guerrero et al., 2016). Considerando la generación y desperdicio de subproductos, dicha situación se convierte en un problema de índole mundial ya que en muchas industrias este material no es procesado o desechado de la forma correcta, lo cual contribuye a la contaminación ambiental y a la formación de gases de efecto invernadero. A pesar de esto, se ha demostrado que estos residuos tienen un alto potencial para usarse en diferentes procesos como es la fermentación y de esta forma obtener compuestos de interés para otras industrias como la de combustibles (Vargas Corredor & Pérez Pérez, 2018). Se conoce que la cáscara de verde está compuesta por una matriz que contiene celulosa, hemicelulosa y lignina conocida como matriz lignocelulósica, lo que permite que sea considerada como un material aprovechable en procesos de fermentación en estado sólido para la obtención de metabolitos de interés, como enzimas del tipo hidrolasas (celulasas), que pueden ser aprovechables por el ser humano (Aguiar et al., 2022).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Evaluar el uso de cáscaras de plátano verde como sustrato en una fermentación en estado sólido para la producción de enzima celulasas.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Producir extractos mediante un proceso de fermentación en estado sólido con cáscaras de plátano verde.
2. Determinar la actividad enzimática de los extractos provenientes del proceso de fermentación en estado sólido.

3. Estimar costos de producción en bandejas de 1.5 kg para la obtención del extracto enzimático.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Generalidades de Cascara de Plátano

El plátano pertenece a la familia de las *Musaceae*, del género *Musa*, a nivel mundial es muy difícil indicar la cantidad exacta de tipos de plátanos comestibles que existen, para su mejor comprensión y estudio siempre se ha tratado de dividir por grupos a los plátanos comestibles (Marcelino et al., 2012). De manera general la composición fisicoquímica aproximada del plátano es la siguiente 66.2% de agua, 1.3% de proteínas, 0.3% grasas, 0.8% vitaminas y cenizas, 1.1 % de fibras y 30.7% de carbohidratos. Dentro de la composición del plátano el almidón es el carbohidrato característico cuando la fruta esta verde y cuando el fruto está maduro existe mayor presencia de azúcares invertidos, así mismo en el plátano se pueden encontrar ácidos como el málico y el cítrico (Quiceno et al., 2014)

Las cascaras del plátano se puede considerar como el desecho del plátano, el cual a primera instancia no es aprovechable. Sin embargo, se conoce que esta cascara es rica en nutriente como fibra dietética, aminoácidos esenciales, grasas, ácidos graso poliinsaturado y potasio. Su composición química está basada fundamentalmente en una matriz lignocelulósica. Existe evidencia bibliográfica en la cual investigadores han podido obtener a partir de estas moléculas como proteínas, metanol, etanol, enzimas y pectinas, así mismo, otros expertos de la ingeniería de la transformación han investigado el potencial uso medicinal y antimicrobiano de la cascara del plátano (Blasco & Gómez, 2014).

1.4.2 Hongos filamentosos

Los hongos son organismos eucariontes multicelulares formados por hifas que son filamentos finos enlazados entre sí, el conjunto de hifas se llama micelios y las colonias surgen de su agrupación. Los micelios permiten que los hongos puedan crecer en diversos tipos de

sustratos, por ello, estos tienen la capacidad de desarrollarse en distintos tipos de hábitats ya sea en el suelo, agua, alimentos e inclusive pueden adaptarse a condiciones de humedad, temperatura y disponibilidad de nutrientes para poder reproducirse (Yoshimi et al., 2022).

Estos pueden alimentarse a través de la pared celular lo que les permite obtener nutrientes del medio o sustrato en el que se encuentre, logrando así transformar moléculas más complejas en moléculas sencillas. Los sustratos se componen por lo general de macromoléculas como proteínas, azúcares complejos, celulosa entre otras.; estas macromoléculas son digeridas por los hongos lo que permite a su vez la producción de moléculas como enzimas, donde el tipo de enzima que produzcan estos microorganismos dependerá del tipo de macromolécula que se encuentre presente en el sustrato (Cole, 1996).

1.4.3 *Aspergillus spp*

Son hongos filamentosos que pueden crecer en un amplio rango de temperaturas entre 6-55°C según la especie del *Aspergillus*, las condiciones del medio y el tipo de sustrato, por ello es común encontrarlo en la naturaleza como en el suelo, aire, vegetaciones, entre otros ambientes (Krijghsheld et al., 2013). Se conoce aproximadamente 900 especies de *Aspergillus* y fueron clasificadas en 18 grupos, algunas de estas especies de como: *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. versicolor*, *A. nidulans*, *A. glaucus*, *A. clavatus*, *A. cervinus*, *A. candidus*, *A. flavipes* y *A. ustus* son consideradas como patógenos dado que son capaces de producir toxinas que pueden llegar a afectar a la salud humana; siendo *A. fumigatus* la especie causante del 85% de las infecciones por *Aspergillus* (Gómez Rojas et al., 2021).

Los *Aspergillus* tienen gran relevancia en los procesos industriales, estos microorganismos tienen una alta capacidad de producir ácidos orgánicos y enzimas extracelulares como la celulasa, pectinasa, amilasas, beta-glucosidasa, entre otras enzimas capaces de hidrolizar polisacáridos complejos. Este tipo de enzimas son comercializadas, dado

que, tienen diversas aplicaciones en la industria alimentaria con el propósito de mejora de proceso, por ello, cada vez existe una mayor demanda de estas en el mercado (Mojsov, 2016).

1.4.4 Enzimas

Se conoce como enzimas a un conjunto de aminoácidos unidos de forma covalentes es decir una proteína. Estas moléculas tienen la capacidad de catalizar una gran cantidad de reacciones químicas (Ramírez & Ayala, 2014). Las moléculas enzimáticas tienen un lugar de unión llamado sitio activo, este sitio activo se une con el sustrato, la forma de este sitio activo entre otras cosas da la selectividad de la enzima con el sustrato y forma un complejo enzima-sustrato el cual genera energía y un producto libre en específico, es importante tener en cuenta que las enzimas no alteran el equilibrio de la reacción, sino que aumentan la velocidad de estas (Mckee & Mckee, 2003).

Las enzimas pueden obtenerse a partir de microorganismos, animales o plantas; la actividad enzimática de estas depende del sustrato, temperatura y pH. Las enzimas provenientes de microorganismos tienen mayor aplicación que las enzimas de fuentes vegetal o animal, ya que, estas toleran amplios rangos de temperatura y pH (Uçak & Afreen, 2022). Según la Unión Internacional de Bioquímica las enzimas se clasifican según el tipo de reacción que estas promueven y se han identificado seis tipos siendo estas las siguientes: oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas (McKee & McKee, 2016).

En la actualidad, el mercado de producción de enzimas está en constante desarrollo y la biotecnología brinda distintas perspectivas para nuevos hallazgos, innovación, y aplicaciones de estas. Se han desarrollado técnicas en base a la ingeniería genética los cuales están sustituyendo a los procesos químicos tradicionales y a su vez genera que los procesos de obtención de enzimas sean más sostenibles en el tiempo y con el medio ambiente (Wiltschi et al., 2020).

Aproximadamente 18 empresas lideran la producción de enzimas a escala mundial, el 75% de las ventas globales corresponde a la empresa Novo Nordisk en Dinamarca y el 25%

restante corresponde a distintas empresas que se encuentran en distintas partes del mundo. En el 2013 se realizó la estimación del mercado de enzimas a nivel mundial y este se situó en \$4.5 billones de dólares y para el 2020 se proyectó un incremento del 8.3% superando un ingreso de \$7.5 billones (Moral et al., 2015).

Las industrias tienen una gran limitante dado que la producción de enzimas tiene elevados costos por lo que su disponibilidad se ve comprometida por este aspecto, sin embargo, con la exploración de nuevas técnicas como la ingeniería genética se podrían obtener bajo un esquema que sea económicamente viable (Badui Dergal, 2006). La importancia del empleo con frecuencia de enzimas microbianas se debe a que estas son estables, eficientes y sostenible. Su aplicación es de importancia en procesos de las industrias de alimentos, textil, farmacéutica entre otras. (Singh et al., 2019).

1.4.5 Fermentación en estado sólido

La fermentación en estado sólido (FES) es el cultivo de microorganismos ya sean estos bacterias, hongos o levaduras sobre sustratos sólidos con un bajo contenido la de humedad, el cual sirve como fuente de nutrientes para el microorganismo. Esta técnica es empleada en la industria alimentaria con el propósito de la bioconversión de residuos orgánicos agroindustriales los mismos que tienen altos contenidos lignocelulósicos; a partir de estos sustratos ,como la cascara de verde o bagazo de caña de azúcar, es posible producir metabolitos, enzimas, ácidos orgánicos, pigmentos, antibióticos, biocombustibles, alimentos fermentados, entre otros (Yafetto, 2022).

El uso de esta técnica permite la obtención de un producto con valor agregado a bajo costo, ya que, se pueden emplear fermentadores pequeños, lo que requiere de menos gasto de energía y menos consumo de agua, logrando que el proceso sea económicamente viable. Sin embargo, esta técnica aun presenta ciertas dificultades al momento de realizar el procesamiento a

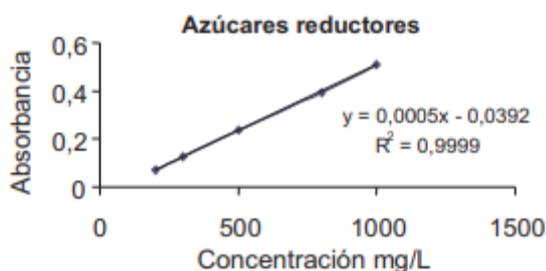
gran escala por la falta de disipación de calor en los biorreactores o contenedores (Srivastava et al., 2019).

1.4.6 Métodos de cuantificación

Cuando se habla de determinación de carbohidratos se refiere a una serie de métodos complejos que nos permite cuantificar o identificar la presencia de carbohidratos ya sean totales o reductores dentro de una solución, sin embargo, para el objetivo de este proyecto se hablara específicamente de la cuantificación de azúcares reductores, ya que son de importancia para la finalidad de este estudio, se hablara específicamente de dos métodos de cuantificación: el método de DNS o ácido dinitrosalicílico y el método de Fehling (Iturbe & Sandoval, 2008).

1.4.6.1 Método de DNS o ácido dinitrosalicílico. Este método fue propuesto por Miller en el 1959 en donde se usa el ácido 3,5-dinitrosalicílico y por medio de una reacción redox se logra determinar la cantidad de azúcares reductores en alguna sustancia (Burgos, 2020). Este DNS, cuando es sometido a cierta temperatura durante un cierto tiempo, tiene la capacidad de reaccionar con los azúcares reductores produciendo un cambio de color, existiendo variaciones desde el amarillo hasta el café, este cambio de color puede ser analizado por densidad óptica es decir espectrofotometría a una longitud de onda de 540 nm (Núñez et al., 2012). Para determinar la concentración final de azúcares reductores se hace uso de una curva de calibración tomando como sustrato estándar la glucosa (Bello et al., 2006).

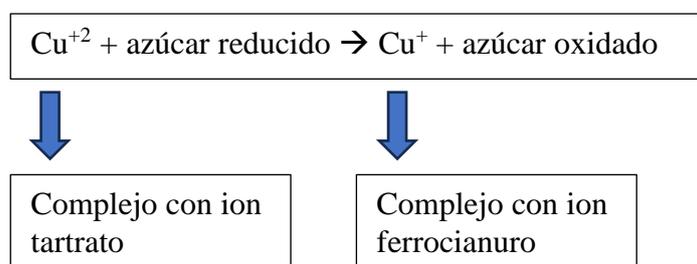
Figura 1 Curva de calibración azúcares reductores



Nota: Ejemplo de curva de calibración de azúcares reductores (Bello et al., 2006)

1.4.6.2 Método de Fehling. También llamado método de Fehling Causee Bonnans (FCB), se usa para cuantificación tanto de azúcares reductores como para azúcares totales en alimentos o en sustancias que se quiere analizar carbohidratos, por lo general los más presentes en alimentos la fructosa, glucosa y sacarosa. Este método se fundamenta que en altas temperaturas azúcares como la glucosa pueden ser reducidos por el Cu^{2+} , se ha demostrado que esta reacción puede ser acelerada. En este método también se usa el reactivo FCB el cual reacciona con el cobre y forma un color azul intenso, así mismo, se usa otro ingrediente para estabilizar el medio el cual es ferrocianuro de potasio, que reacciona con el Cu^+ y da una coloración amarilla verdosa, la reacción general se describe en la imagen (Guiraldes, 1974).

Figura 2 Reacción característica del método de Fehling



Nota: Descripción sencilla de la reacción (Guiraldes, 1974)

Capítulo 2

2 Metodología

La metodología de trabajo fue dividida en cuatro fases. Inicialmente, se llevó a cabo un proceso de adaptación de una cepa de *Aspergillus* spp. al sustrato (cáscaras de plátano verde provenientes de locales en la ciudad de Guayaquil) mediante una curva de crecimiento radial. En este proceso, se obtuvieron extractos y se determinó la presencia de actividad enzimática en los mismos.

Posteriormente, se realizó fermentaciones en estado sólido utilizando bandejas de aluminio, de las cuales se extrajo los extractos como se muestra en la Figura 3 para cuantificar la actividad enzimática presente en los mismos.

Dentro de la metodología, se abordó la capacidad de la cepa para producir enzimas en diferentes condiciones, para lo cual se planteó un diseño factorial. Finalmente, se llevó a cabo un diseño de instalaciones para el tratamiento de 100 kg/día de residuos de cáscaras de plátano, abarcando la fermentación en medio sólido, la extracción y envasado del extracto obtenido de la fermentación, considerando la estimación de costos.

Figura 3 *Extractos previamente obtenidos de investigaciones anteriores*



Nota: Extractos para analizar y cuantificar (independiente)

2.1 Diseño de experimento

Para la obtención de las curvas de crecimiento radial y de los extractos para cuantificar su actividad enzimática, se planteó un arreglo factorial considerando dos variables como factores de estudio: el porcentaje de humedad y el tamaño de partícula. El total de tratamientos experimentales considerando una réplica es de 8 los cuales se detallan en la tabla 1. Las variables de respuesta consideradas fueron 3: la velocidad específica de crecimiento radial (mm/h) y velocidad específica de crecimiento (μ) de las placas Petri y las unidades de papel filtro (FPU/g de sustrato) para los extractos obtenidos de las bandejas de aluminio después de la fermentación en medio sólido (FMS).

Tabla 1 *Tratamientos experimentales obtenidos del diseño arreglo factorial*

# Tratamiento	Humedad (%)	Tamaño de partícula (μm)	Placa	Placa	Bandeja
			mm/h	μ	FPU/g
1	30	300	x	X	x
2	30	600	x	X	x
3	40	300	x	X	x
4	40	600	x	X	x
5	50	300	x	X	x
6	50	600	x	X	x
7	60	300	x	X	x
8	60	600	x	X	x

Nota: corridas experimentales para el análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos de los tratamientos experimentales se realizó con el software estadístico Minitab versión prueba. Se obtuvo una tabla de análisis de varianza (ANOVA) y una gráfica de Pareto, donde se determinó si existen diferencias significativas entre los tratamientos propuestos con respecto a las variables respuestas y de esta

formar focalizar que tratamiento o tratamientos son los que presentan la mayor productividad enzimática.

2.2 Cuantificación enzimática

En la cuantificación enzimática se necesitó que previamente el extracto crudo obtenido de las fermentaciones en estado sólido, pasaran por un proceso de filtración y almacenamiento en frío, hasta el uso posterior en la aplicación de una técnica en micro dilución en microplaca.

Celulasa Total

Se aplicó la técnica de papel filtro en la medición de la actividad enzimática de cada extracto obtenido. Se preparó una solución de 60 μ l de extracto / buffer de citrato en frascos de vidrio de 2 ml, como se muestra en la figura 4. Estos fueron calentados en baño maría a una temperatura de 50 °C durante un total de 5 minutos. Posteriormente, se colocó una unidad de papel filtro de 5.5 mm como sustrato y se dejó incubar junto con el papel filtro durante 2 horas a 50 °C. Seguidamente, se añadieron 120 μ l de DNS y se llevó a ebullición por 5 minutos, finalmente, se colocó en un baño de hielo. (Saldaña, 2020).

Figura 4 *Extractos*



Nota: preparación de los extractos (independiente)

2.2.1 Espectrofotometría

Los extractos previamente tratados con el método de DNS (azúcares reductores), fueron llevados a una microplaca donde se colocaron 36 μ l de la reacción con 160 μ l de agua destilada y

posteriormente realizar una lectura en espectrofotómetro de marca SYNERGY|HTX multi- mode reader a una longitud de onda de 540 nm. Los valores obtenidos se reportaron en (FPU/g.s.) unidades de papel filtro por gramo de sustrato.

2.2.2 Curva de calibración

La curva de calibración se hizo con los pasos mencionados en el apartado 2.2.2, usando glucosa como azúcar estándar en lugar del extracto crudo, y manteniendo las demás condiciones sin variaciones.

2.3 Fermentación en medio sólido

Las fermentaciones en medio sólido se llevaron a cabo bajo un esquema de trabajo que se resumió en tres etapas: la preparación del inóculo, la preparación del sustrato y la inoculación e incubación de los tratamientos, tanto para evaluar la adaptación del microorganismo al sustrato en placas Petri como para las fermentaciones en bandejas de aluminio.

En una primera instancia, se analizaron los resultados obtenidos de las cuantificaciones enzimáticas realizadas a los extractos provenientes de las curvas de crecimiento radial de un trabajo previo. Este análisis tuvo como objetivo establecer las condiciones y parámetros de la fermentación en medio sólido (FMS). Es decir, se determinó qué tamaño de partícula, humedad y concentración de la cepa debían considerarse al realizar una fermentación en las bandejas de aluminio, es decir, a una escala mayor.

2.3.1 Adaptación de la cepa

Antes de la fermentación en medio sólido en placas, la cepa se regeneró en matraces Erlenmeyer que contenían 25 ml de medio de cultivo PDA. Los matraces fueron inoculados en una cámara de flujo y luego se colocaron en incubadoras a una temperatura aproximada de 28 °C durante 7 días y se observó diariamente el crecimiento de la cepa. Después de este periodo, se llevó a cabo la remoción de las esporas como se muestra en la figura 5 para ser utilizadas en los procesos de fermentación.

Figura 5 *Extracción de esporas*



Nota: La extracción de esporas se hace en un cámara de flujo para evitar contaminación

2.3.2 *Concentración de esporas*

Inicialmente, las esporas del hongo fueron removidas dentro de los matraces con una solución de tween 80 al 0.1 %. Se añadió en cada matraz 25 ml de la solución, con un agitador y una plancha de calentamiento, se removieron las esporas y se recolectaron en un matraz madre para su conteo final con la ayuda de una cámara de Neubauer lo que permitió definir la concentración de estas expresadas en esporas/ml de solución.

2.3.3 *Montaje de fermentación*

En una primera etapa, se determinó el porcentaje de humedad del sustrato utilizando una termobalanza, como se ilustra en la figura 6. Con esta información se estimó la cantidad de agua necesaria a añadir al sustrato en cada bandeja para alcanzar el 30%, 40%, 50 % y 60 % de humedad. Además, con la concentración inicial de esporas en la solución, se determinó la cantidad en mililitros necesaria para inocular el sustrato. Cabe mencionar que esta cantidad podría variar considerando las humedades del medio previamente calculadas. (Saldaña, 2020).

Las fermentaciones se realizaron en bandejas de aluminio como se muestra en la figura 7, la cantidad de sustrato usado varió dependiendo del contenido de humedad de este. Para ajustar el contenido de humedad al 50% y 60%, se utilizó una solución previamente preparada de

esporas que fue mezclada con el mismo para posteriormente colocar las bandejas en una incubadora a 28 °C aproximadamente durante 7 días (Saldaña, 2020). Transcurrido el periodo de incubación, se procedió a obtener un extracto como se muestra en la figura 8, utilizando un medio tamponado que fue mezclado con el sustrato fermentado para que aquellas enzimas que se hayan generado puedan usar el líquido como un medio de transporte, luego se procedió con un proceso de filtración con papel filtro y finalmente el extracto filtrado se almacenó en frascos ámbar en congelación hasta su uso en el proceso de cuantificación enzimática de los mismos.

Figura 6 *Determinación del contenido de humedad*



Nota: EL contenido de humedad es un valor necesario para realizar el balance de masa

Figura 7 *Preparación de bandejas para FMS*



Nota: Las bandejas son preparadas previo a la fermentación y se ajusta el contenido de humedad

Figura 8 *Extracción por medio de papel filtro*



Nota: Una vez realizado la extracción es necesario congelar los extractos hasta realizar la debida cuantificación

2.4 Estimación de costos

Previo a la estimación de costos, se realizó una evaluación detallada del área de producción a escala semiindustrial, que se empleará para transformar la materia prima considerando procesar 100 kg por día de cáscaras de plátano. Para llevar esto a cabo, fue necesario establecer: el diagrama de flujo del proceso que detalla cada etapa de la elaboración del producto, la tabla de relación de actividades que permite establecer la proximidad entre las distintas áreas tanto productivas como no productivas y las actividades que se realizan en estas áreas, el diagrama de relación de espacios y capacidad productiva por Batch.

2.4.1 Diagrama de flujo de proceso

Se elaboró el diagrama de flujo basado en las actividades operativas ordenadas mostrando el inicio del proceso, etapas intermedias y finales. Este diagrama especifica las actividades de cada etapa con sus respectivos parámetros específicos, identificando las posibles áreas de contaminación que pueden afectar al flujo del proceso o al producto final.

2.4.2 Diagrama de relación de actividades

El diagrama proporciona una visión detallada de cómo se interconectan las diversas actividades y áreas de producción. Este diagrama identifica y enumera las actividades específicas involucradas en la transformación de materias primas, destacando el orden secuencial en el que se llevan a cabo. Este diagrama se describe con letras y números según su importancia y proximidad entre áreas como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2 *Simbología para la elaboración de diagrama de relación de actividades [Casp, 2005].*

Codificación	Proximidad	Color
A	Absolutamente necesario	Rojo
E	Especialmente importante	Amarillo
I	Importante	Verde
O	Ordinario	Azul
U	Sin importancia	-
X	Rechazable	Café oscuro
Motivo		
1	Proximidad entre procesos	
2	Higiene	
3	Control	
4	Frío	
5	Ruidos, malos olores	
6	Seguridad del producto	
7	Utilización material común	
8	Accesibilidad	

2.4.3 Capacidad de producción

Se estableció la capacidad de procesamiento de 100 kg de cáscaras de plátano por día y mediante un diagrama de Gantt se buscó un balanceo de línea entre la capacidad y otros factores críticos, como la logística y la asignación eficiente de recursos. Dado que, el diagrama de Gantt permite visualizar la duración de cada actividad y la relación que tiene entre estas, es posible establecer tiempos específicos para realizar todas las actividades que involucran la transformación de la materia prima hasta producto terminado.

2.4.4 Diagrama de relación de espacios

Para la determinación del diagrama de relación de espacio, se empleó el método del cálculo, garantizando así un diseño del área alineado con la capacidad de producción establecida. Este método implicó el fraccionamiento de cada actividad y elementos de la superficie, con el objetivo de incrementar la eficiencia del flujo de trabajo entre las áreas productivas y no productivas.

2.4.5 Costos

Para la estimación de los costos de producción, se utilizó una hoja del programa Excel, teniendo en cuenta la capacidad operativa de los equipos y la capacidad de producción de la línea que se había establecido previamente. En la estimación del costo de producción del extracto, se incluyó tanto los costos directos como los indirectos, como la materia prima, servicios auxiliares, material de empaque, entre otros. De esta manera, fue posible estimar el costo de producción por lote o batch producido, así como los costos mensuales y anuales. El precio de venta del producto se calculó considerando un margen de contribución del 35

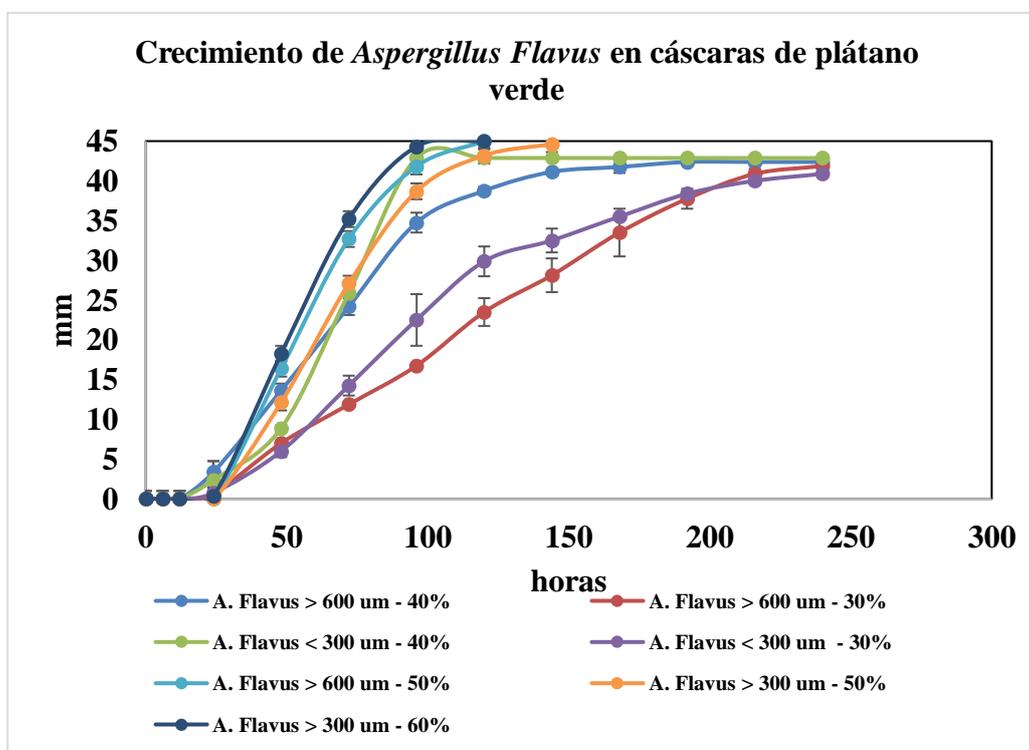
Capítulo 3

3 Resultados y análisis

En el capítulo presente, se muestra todos los resultados obtenidos después de aplicar la metodología detallada en el capítulo 2. Inicialmente se presentan los resultados de la cinética de crecimiento y de la producción de extractos obtenidos producto del arreglo factorial planteado con el respectivo análisis estadístico aplicado. Posteriormente se presenta los resultados relacionados a la distribución de áreas de trabajo con una propuesta de diseño de áreas de trabajo realizada en el software Lucidchart. Finalmente se detalla la estimación de costos de producción por Batch.

3.1 Adaptación de cepas

Figura 9 Crecimiento de *Aspergillus Flavus* en cáscaras de plátano verde



Nota: No se muestra la curva de crecimiento radial del tratamiento 600 μm al 60% ya que la técnica no es la adecuada

En la figura 9 se detalla como la cepa tiene un comportamiento semejante en todos los tratamientos en las primeras 24 horas, sin embargo, a partir de este tiempo la cinética de crecimiento comienza a variar, aquellos tratamiento con humedades más elevada (50 y 60 % de humedad) mostraron un crecimiento mucho más rápido terminando su fase exponencial a las 100 horas aproximadamente, y aquellos tratamientos con humedades del 30 % terminaron su fase exponencial a las 250 horas aproximadamente, estos resultados coinciden con los resultados obtenido del análisis estadístico del factor humedad que se detalla en el apartado 3.2. Este comportamiento concuerda con lo mencionado por (Wirth et al., 2019), donde se menciona que uno de los parámetros que más influye en el crecimiento de hongos esta la humedad, siendo una variable de estudio significativa. Es importante resaltar que de los tratamientos experimentales planteados el de 600 μm y 60 % de humedad, no se pudo tomar datos para su curva de crecimiento, ya la técnica no era la adecuada específicamente para este tratamiento por el contenido alto de humedad.

3.2 Diseño factorial

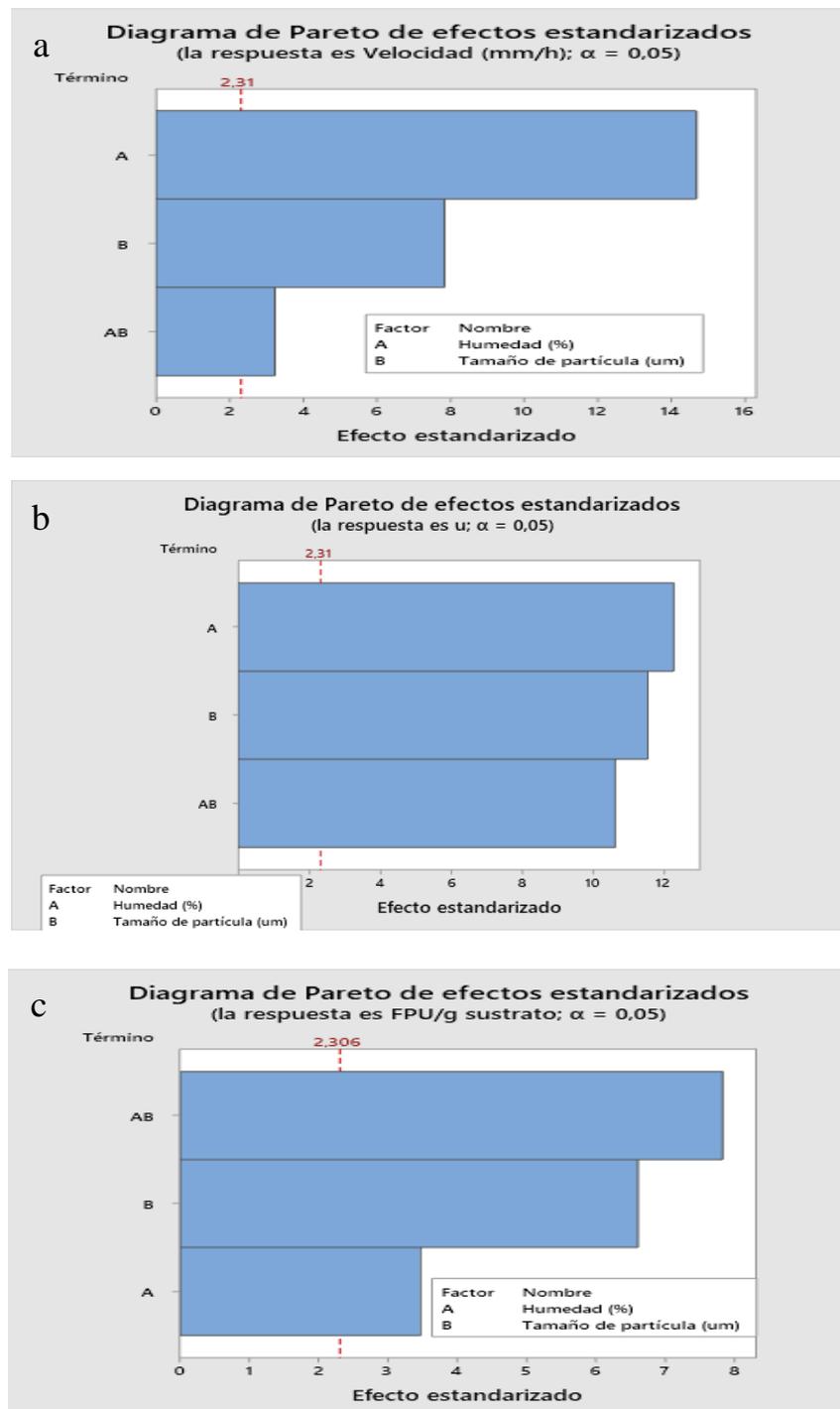
En la tabla 3 detalla los resultados velocidad de crecimiento radial (mm/h), velocidad específica de crecimiento (μ) y la actividad enzimática de las enzimas celulítica (FPU/g.s.). de los ensayos experimentales realizados.

Tabla 3 *Corridos experimentales y las variables de respuesta*

# Tratamiento	Humedad (%)	Tamaño de partícula (μm)	Placa	Placa	Bandeja
			Velocidad de crecimiento radial (mm/h)	Velocidad de crecimiento (μ)	Actividad enzimática (FPU/g.s.)
1	30	300	1.828	0.306	-
2	30	600	1.390	0.222	0.166
3	40	300	3.504	0.577	0.034
4	40	600	2.623	0.436	0.045
5	50	300	2.371	0.553	0.081
6	50	600	1.848	0.530	0.115
7	60	300	1.503	0.543	0.082
8	60	600	-	-	0.061
9	30	300	1.377	0.248	-
10	30	600	1.058	0.217	0.161
11	40	300	3.522	0.546	0.036
12	40	600	2.818	0.437	0.057
13	50	300	2.018	0.453	0.073
14	50	600	1.899	0.531	0.066
15	60	300	1.260	0.531	0.088
16	60	600	-	-	0.075

Nota: Con esta información y con el uso de herramientas informáticas se obtuvo el análisis estadístico que nos permitieron definir la influencia de las variables independiente sobre las variables de respuestas. (Minitab)

Figura 10 Diagrama de Pareto de cada variable independiente



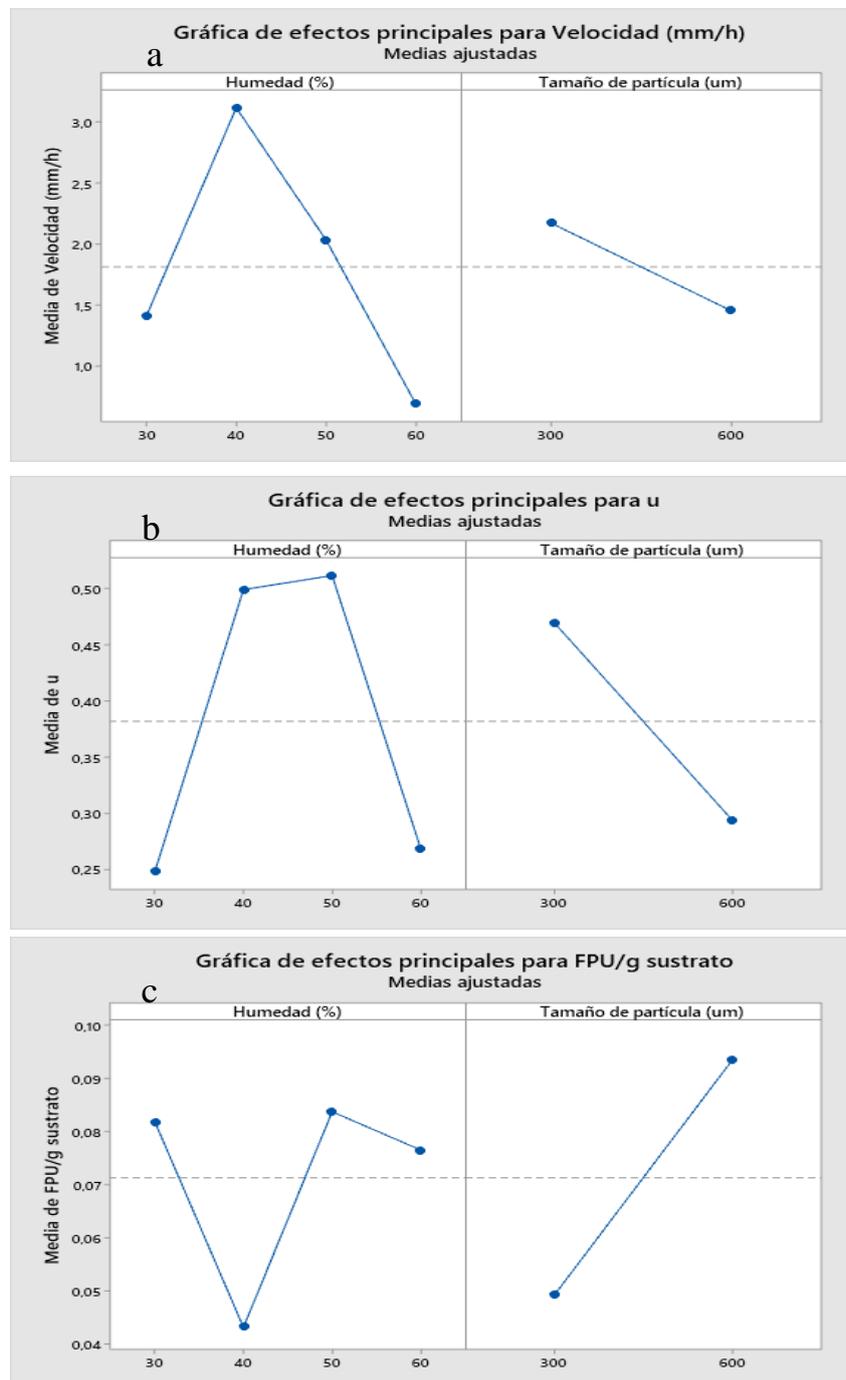
Nota: Diagrama de Pareto de las variables de estudio, (a) velocidad de crecimiento radial, (b) velocidad específica de crecimiento y (c) actividad enzimática celular FPU/g.s. (Minitab).

En la figura 10 se muestra el análisis estadístico sobre la significancia de las variables de estudios en cada una de las variables de respuesta.

Los resultados obtenidos mostraron que todas las variables independientes afectan significativamente a cada una de las variables de estudio con un p menor a 0.05 y un intervalo de confianza del 95 %. Para la velocidad de crecimiento radial (a) la variable que más afecta es el porcentaje de humedad, es decir que la humedad afecta en gran medida a la velocidad final en el crecimiento de la cepa, el segundo diagrama de Pareto (b) se obtuvo que tanto el tamaño de partícula, la humedad y la relación entre estas afectan en gran medida a la velocidad específica de crecimiento teniendo resultados muy cercanos y finalmente en el diagrama (c) la interacción entre las dos variables y el tamaño de partícula son importantes para la producción de enzimas celulíticas, estos últimos resultados son similares a un estudio reportado por (Saldaña, 2020), donde se cuantifica la actividad enzimática de extractos obtenidos a partir de residuos de té negro y café . Según (Salomão et al., 2019) el estudio realizado a partir de bagazo de caña de azúcar , resultó que el contenido de humedad junto con la temperatura afectaron en gran medida a la producción de enzimas celulíticas es decir estos parámetros podrían tener un papel importante en el crecimiento de la cepa y en la producción de enzimas. Los resultados obtenidos mostraron que todas las variables independientes afectan significativamente a cada una de las variables de estudio con un p menor a 0.05 y un intervalo de confianza del 95 %. Para la velocidad de crecimiento radial (a) la variable que más afecta es el porcentaje de humedad, es decir que la humedad afecta en gran medida a la velocidad final en el crecimiento de la cepa, el segundo diagrama de Pareto (b) se obtuvo que tanto el tamaño de partícula, la humedad y la relación entre estas afectan en gran medida a la velocidad específica de crecimiento teniendo resultados muy cercanos y finalmente en el diagrama (c) la interacción entre las dos variables y el tamaño de partícula son importantes para la producción de enzimas celulíticas, estos últimos resultados son similares a un estudio reportado por (Saldaña, 2020), donde se cuantifica la actividad enzimática de extractos obtenidos a partir de residuos de té negro y café . Según (Salomão et al., 2019) y el estudio realizado a partir de bagazo de caña de azúcar , resultó que el contenido de humedad

junto con la temperatura afectaron en gran medida a la producción de enzimas celulíticas es decir estos parámetros podrían tener un papel importante en el crecimiento de la cepa y en la producción de enzimas.(Srivastava et al., 2019)

Figura 11 Diagrama de relación de variables independiente



Nota: (a) la velocidad de crecimiento radial, (b) la velocidad específica de crecimiento y (c) la actividad enzimática celulítica FPU/g (Minitab)

En la figura 11, se muestra como cada una de las variables independiente (Humedad % y tamaño de partícula µm) pueden afectar a la variable de respuesta y se muestra el

comportamiento resultante de las variables de respuesta en cada una de las interacciones y variaciones de las variables independientes

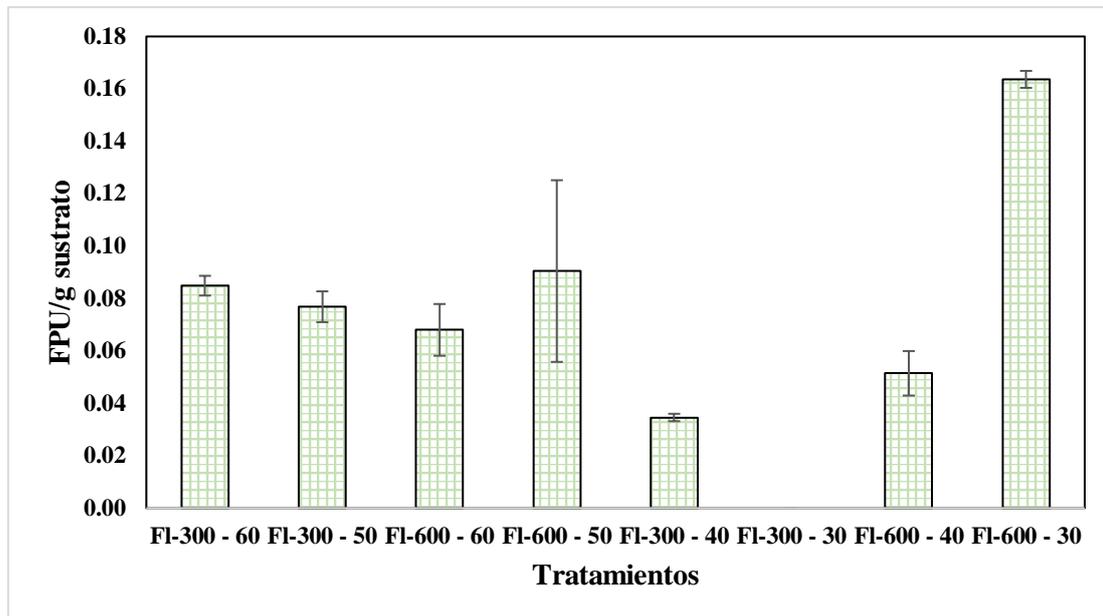
3.3 Cuantificación enzimática

En la tabla 4 se detalla la actividad enzimática celulítica de cada extracto obtenido en cada tratamiento por bandeja, el promedio de las replicas por tratamiento con su respectiva desviación. El diagrama de la figura 13 representa la actividad enzimática del promedio de la réplica de cada tratamiento.

Tabla 4 Resultados de la actividad enzimática por cada tratamiento evaluado

Tipo Sustrato	Tratamientos	Bandeja 1	Bandeja 2	Promedio	Desviación Estándar
		FPU/g	FPU/g		
Cáscara Plátano Verde	Fl-300 - 60	0.082	0.088	0.085	0.004
	Fl-300 - 50	0.081	0.073	0.077	0.006
	Fl-600 - 60	0.061	0.075	0.068	0.010
	Fl-600 - 50	0.115	0.066	0.090	0.035
	Fl-300 - 40	0.034	0.036	0.035	0.001
	Fl-300 - 30	0.000	0.000	0.000	0.000
	Fl-600 - 40	0.045	0.057	0.051	0.008
	Fl-600 - 30	0.166	0.161	0.164	0.003

Nota: Es importante resaltar que los datos mostrados son de actividad enzimática celulítica por bandeja y por cada tratamiento

Figura 12 *Actividad enzimática celulasa total de extractos*

Los resultados en la figura 12 mostraron gran similitud entre replicas en donde se destacan dos resultados. En el tratamiento con un tamaño de partícula de 300 micras con 30 % de humedad, no se obtuvo actividad (0 FPU/g de sustrato) Gabriel Vega y colaboradores reportaron que la humedad necesaria para que un hongo crezca en una fermentación estado sólido esta entre 40 y 60 % (Vega, 2021) entonces, existe la posibilidad que bajo estas condiciones el hongo no creció por consiguiente no existe presencia de enzimas celulíticas en los extractos recogidos en las bandejas. En el tratamiento de tamaño partícula de 600 micras con 30 % de humedad, se cuantificaron actividades enzimáticas de 0.166 y 0.161 FPU/g en la bandeja tratamiento y replica respectivamente siendo las actividades más altas en comparación a los otros tratamientos probados.

Se ha encontrado información en bibliografía en donde se reporta que dependiendo de las condiciones en las que se encuentre la fermentación en estado sólido se puede generar diferentes metabolitos (Carrillo, 2003). Este comportamiento presumiblemente se deba a que la cepa estuvo sometida a altos niveles de estrés para su sobrevivencia debido a los bajos contenidos de

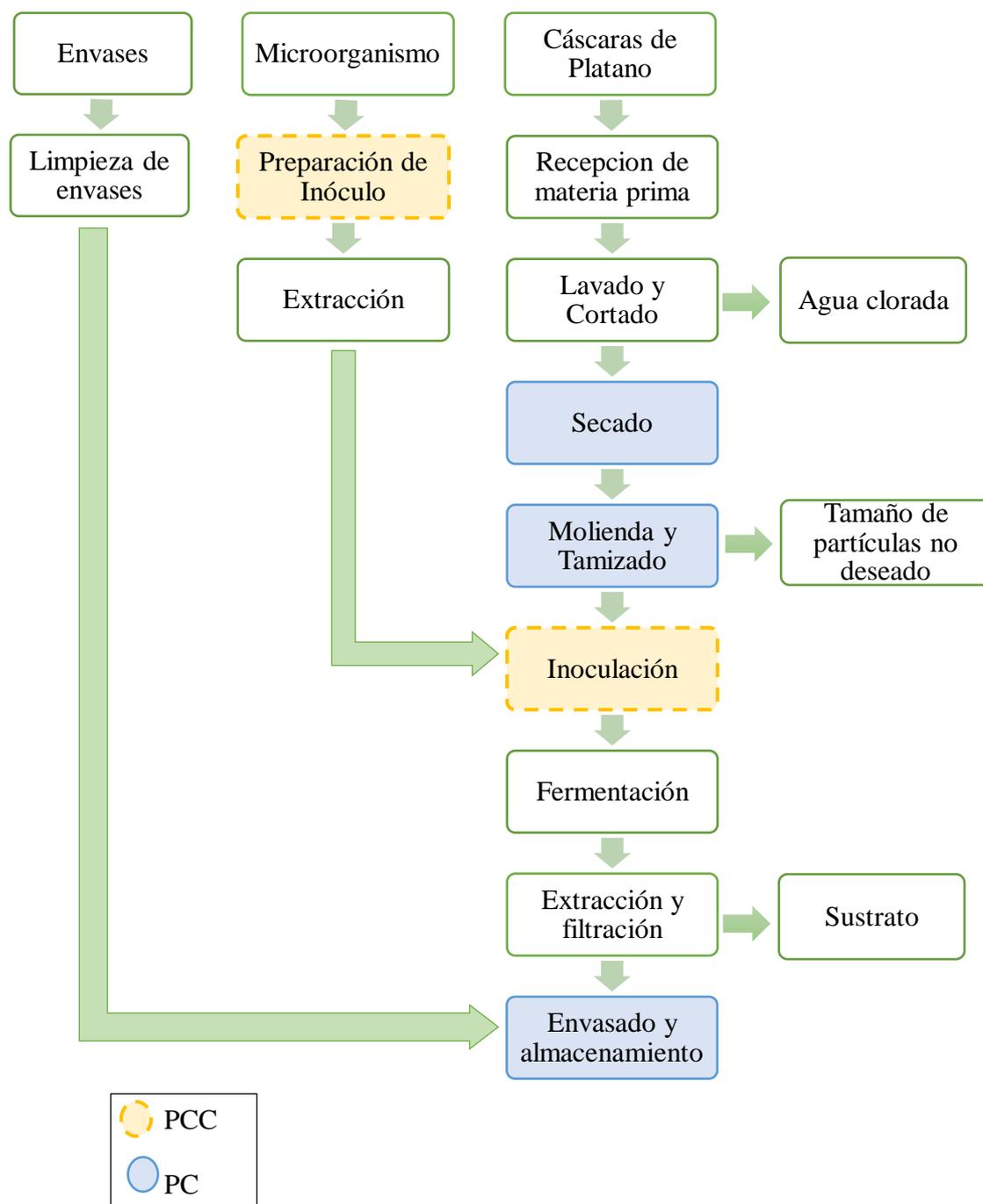
humedad experimentales probados. Los valores reportados guardan cierta relación con un estudio realizado sobre la utilización de residuos de bagazo de caña de azúcar como sustrato para producir celulasas partir de una cepa de *Aspergillus spp* reportándose actividades enzimáticas semejantes a las del presente trabajo (Oliveira et al., 2018). Es importante resaltar que las actividades enzimáticas bajas se pueden dar por varias razones, en un estudio dedicado a la producción de enzimas por medio de fermentación en estado sólido se reportó que la producción de enzimas se puede ver afectada por la pureza del extracto, contaminación por otras bacterias y la forma de extracción (Vahid, 2023).

3.4 Diseño de planta

3.4.1 Diagrama de flujo de proceso

En la figura 13 se presenta el diagrama de proceso que se estableció para la obtención del extracto enzimático. El proceso inicia con la recepción de 100 kg de cáscaras de plátano verde. Posteriormente, se llevó a cabo la etapa de lavado y corte, donde las cáscaras se sometieron a un proceso de limpieza y desinfección; luego, se transportaron a un deshidratador de aire caliente; las cáscaras ya secas, se molieron y tamizaron obteniendo 10 kg de cascara seca la misma que fue utilizada como sustrato y se inoculó con el microorganismo *Aspergillus spp.* que fue previamente regenerado, iniciando así la fermentación en estado sólido. Tras el periodo de incubación de la fermentación, se extrajeron las enzimas con un medio de suspensión el cual fue filtrado, envasado y almacenado en un congelador. Además, se estableció como puntos críticos de control (PCC) a la preparación del inóculo e inoculación y como puntos de control (PC) a las etapas de secado, molienda, tamizado, envasado y almacenamiento.

Figura 13 Diagrama de flujo de proceso para la obtención del extracto enzimático

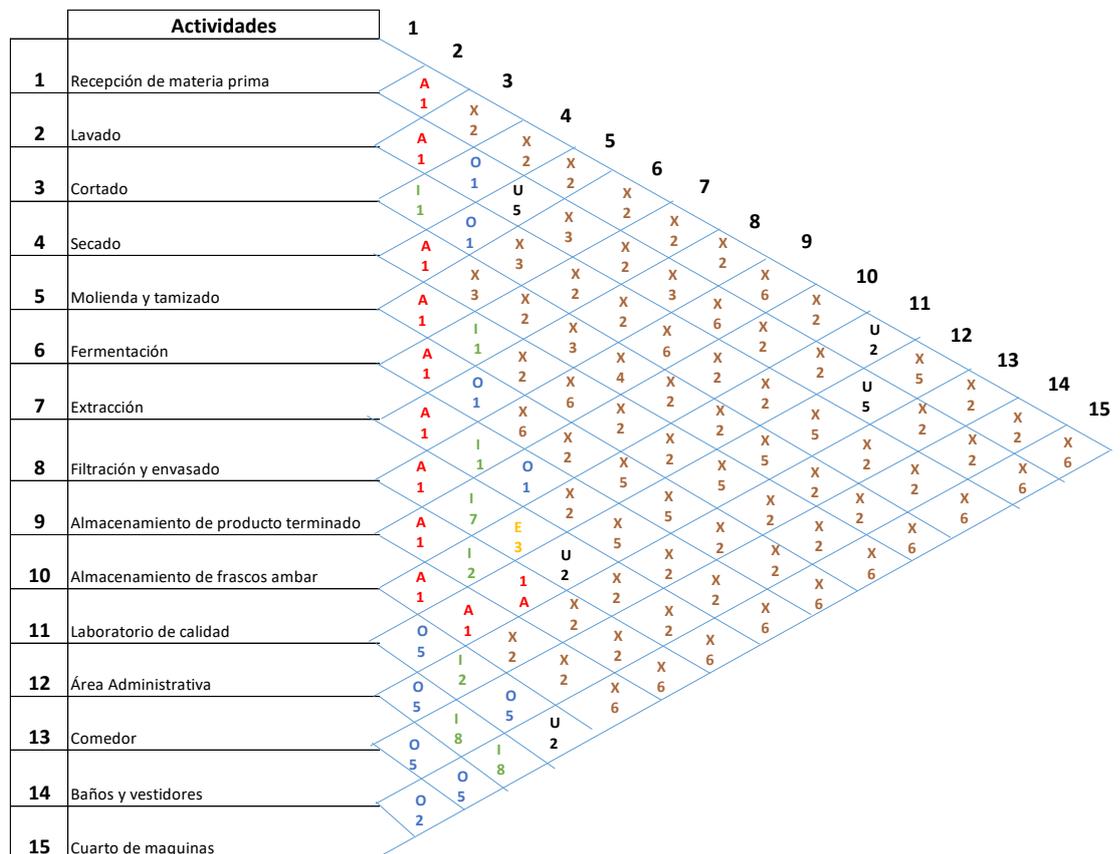


Nota: Diagrama de flujo de proceso para la elaboración de los extractos enzimáticos; se muestran los PCC y PC de coloración amarilla y azul respectivamente.

3.4.2 Diagrama de relación de actividades (TRA)

El diagrama de relación de actividades que se estableció contiene 15 actividades entre áreas productivas y no productivas, como se visualiza en la figura 14 en las cuales se detalla con letras y números la proximidad y el motivo de esta entre áreas, según se definió en la tabla 2. Se identificaron las áreas como baños, comedores y área administrativa con proximidad de rechazo hacia las áreas de producción, ya que estas, pueden llegar a ser fuentes de contaminación o no tienen relación directa con el proceso productivo.

Figura 14 Diagrama de relación de actividades



3.4.3 Estimación de espacios

En base a la capacidad de producción de 100 kg diarios de cáscaras de plátano, mediante el método del cálculo se realizó la estimación de espacio de procesos. En la tabla 5 se detallan

los valores obtenidos para la estimación de espacio correspondiente a cada actividad de proceso. El área administrativa es la mayor en comparación con las otras actividades mencionadas, ya que, en este caso, se lo menciona de manera generalizada y no se desglosa como en las actividades de producción. En base a los resultados obtenidos se estimó un área total de 132.97 metros cuadrados.

Tabla 5 *Estimación de espacios*

	Actividad	S total Ss+Sg+Se
1	Recepción de materia prima	14.62
2	Lavado	5.99
3	Cortado	8.55
4	Secado	5.65
5	Molienda y tamizado	7.12
6	Fermentación	6.66
7	Extracción	7.71
8	Filtración y envasado	14.25
9	Almacenamiento de producto terminado	3.43
10	Almacenamiento de frascos ámbar	5.91
11	Laboratorio de calidad	14.00
12	Área Administrativa	19.50
13	Comedor	9.00
14	Baños y vestidores	4.20
15	Cuarto de maquinas	6.38
	TOTAL	132.97

Nota: Datos obtenidos de la estimación de espacio de producción, considerando la superficie estática, de gravitación y evolución.

3.4.4 Plano de diseño de instalaciones

La propuesta de lay- out en la cual se procesará los 100 kg de cascaras de plátano por batch para la obtención del extracto enzimático se muestra en el Apéndice E. La propuesta incluye todas las áreas necesarias para la recepción de materia prima y despacho de producto terminado e inclusive el área administrativa, se señaló las rutas de acceso para los vehículos, el flujo para el personal y se identificó las áreas ultrasensibles siendo estas el área de fermentación

y el de preparación del inóculo, dado que se debe de procurar que la cepa aislada no se contamine durante su regeneración ni tampoco en el proceso de fermentación.

3.5 Estimación de costos

La tabla 6, proporciona la estimación de los costos para la producción por Batch de 12 frascos ámbar de capacidad de 750 ml cada uno. El costo estimado de producción por Batch fue de \$211.72 y el margen de contribución establecido fue del 50% obteniendo un valor de \$6.54, en base a estos cálculos se definió el precio de venta al público siendo este de \$19.61 por cada frasco de extracto enzimático.

Tabla 6 *Estimación de costos de producción por batch*

	Ingredientes	Cantidad	*UMB	Costo UMB	Costo/ mes	Costo/ batch	Costo/ frasco
Materia Prima	Cáscara de plátano	100	Kg	\$ 0.00	\$ 0.00	\$ 0.00	\$ 0.00
		100		\$ 0.10	\$ 180.00	\$ 10.00	\$ 0.83
	Buffer	25	L	\$ 1.18	\$ 503.28	\$ 27.96	\$ 2.33
Material de Empaque	Frascos ámbar	12	Unidades	\$ 0.56	\$ 120.96	\$ 6.72	\$ 0.56
	TOTAL				\$ 804.24	\$ 44.68	\$ 3.72
Mano de obra	Mano de obra directa	5	Operarios	\$ 2,962.78	\$ 2,962.78	\$ 164.60	\$ 9.14
Servicios	Agua	0.50	m3	\$ 2.92	\$ 26.28	\$ 1.46	\$ 0.12
	Energía	10.88	KW/h	\$ 0.09	\$ 17.62	\$ 0.98	\$ 0.08
				Total, Costos Directos	\$ 3,767.02	\$ 209.28	\$ 12.87
				Total, Costos Indirectos	\$ 43.90	\$ 2.44	\$ 0.20
				Costo Producción	\$ 3,810.92	\$ 211.72	\$ 13.07
						Costo por Envase	\$ 13.07
						Margen	\$ 6.54
						PVP	\$ 19.61

Capítulo 4

4 Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

- Los hallazgos del presente estudio revelan que se puede obtener extractos enzimáticos a través de una fermentación en estado sólido en bandeja de aluminio de 100 gramos.
- Se determinó la presencia de enzimas celulíticas (celulasa) en los extractos obtenidos a partir de las fermentaciones en estado sólido, donde las variables de estudio tamaño de partícula y contenido de humedad si afectaron la producción enzimática.
- Se puede afirmar que al usar tamaños de partículas de cáscaras de plátano verde menores a 300 μm con bajos contenidos de humedad 30% no favorecen al crecimiento de la cepa en estudio durante la fermentación en estado sólido.
- Tomando en consideración la materia prima para elaborar las bandejas de 1.5 kg, el empaque, mano de obra, servicios, los costos directos e indirectos; el costo de producción por bandeja es de \$30.25, se estima que cada frasco de 750 ml tendrá un PVP aproximado de \$ 20.

4.2 Recomendaciones

- Es necesario que se controle durante la FES los parámetros: temperatura y humedad y así mismo evitar la presencia de microorganismos no deseados. Dado que estos factores pueden afectar de manera directa la producción de enzimas
- En base a la experimentación, se recomienda utilizar otro tipo de técnica para realizar la medición del crecimiento radial de la cepa en el tratamiento con tamaño de partícula 600 μm y 60 % de humedad y a su vez verificar si existe o no producción enzimática en este tratamiento.

- Para obtener mayores títulos de actividad enzimática es necesario que se realice una purificación de los extractos previo a la cuantificación enzimática. Esto permitirá eliminar cualquier residuo, que pueda estar interfiriendo en la lectura de las actividades enzimáticas.
- Se recomienda realizar las mediciones de las otras actividades enzimáticas como son: beta-glucosidasa y exoglucanasa.

Referencias

- Aguiar, S., Enríquez Estrella, M., & Uvidia Cabadiana, H. (2022). Residuos agroindustriales: su impacto, manejo y aprovechamiento. *Axioma*, 1(27), 5–11.
<https://doi.org/10.26621/ra.v1i27.803>
- Álvarez Morales, E. L., León Córdova, S. A., Sánchez Bravo, M. L., & Cusme Macías, B. L. (2020). Evaluación socioeconómica de la producción de plátano en la zona norte de la Provincia de los Ríos. *Journal of Business and Entrepreneurial Studies*, 4–2(2576–0971), 86–95.
- Bello, D., Carrera, E., & Diaz, Y. (2006). Determinación de azúcares reductores en jugos mezclado de caña de azúcar. *Icidca*, 40, 45–50.
- Burgos J. (2020). Cuantificación de azúcares reductores del sustrato en residuos de piña con el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico. *Questionar: Investigación Específica*, 7(1), 57–66.
<https://doi.org/10.29097/23461098.308>
- Carrillo, L. (2003). *Los hongos de los alimentos y forrajes*. (Universida).
- Casp, A. (2005). Diseño de industrias agroalimentarias. *Mundi-Prensa*.
- Cedeño, G. (2015). *Banano, plátano y otras musáceas*. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias.
- Gómez Rojas, M. P., Arboleda Valencia, J. W., & Mosquera Martínez, O. M. (2021). Género *Aspergillus* : fuente potencial de péptidos bioactivos. *Revista Facultad de Ciencias Basicas*, 17(1), 73–89. <https://doi.org/https://doi.org/10.18359/rfcb.5610>
- Guerrero, A. B., Aguado, P. L., Sánchez, J., & Curt, M. D. (2016). GIS-Based Assessment of Banana Residual Biomass Potential for Ethanol Production and Power Generation: A Case Study. *Waste and Biomass Valorization*, 7(2), 405–415. <https://doi.org/10.1007/s12649-015-9455-3>
- Guiraldes, E. (1974). Comparación entre diversos métodos para diagnóstico rápido de malabsorción de hidratos de carbono. *Revista Chilena de Pediatría*, 45(5), 399–404.
<https://doi.org/10.4067/s0370-41061974000500002>
- Ibarra, M., & Márquez, L. (2022). Identificación de usos potenciales para el aprovechamiento de los residuos generados en el proceso de beneficio del plátano (*Musa paradisiaca*) var. Hartón. *CEI Boletín Informativo Ingenierías* , 9(2), 181–188.
- Iturbe, F., & Sandoval, J. (2008). *Análisis de Alimentos Fundamentos y Técnicas*. 282.
- Krijgheld, P., Bleichrodt, R., van Veluw, G. J., Wang, F., Müller, W. H., Dijksterhuis, J., &

- Wösten, H. A. B. (2013). Development in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 74, 1–29.
<https://doi.org/10.3114/sim0006>
- Marcelino, L., González, V., & Ríos, D. (2012). *El cultivo de plátano (Musa paradisiaca L.) en Panamá*.
- Mckee, T., & Mckee, J. (2003). Enzimas. In *Bioquímica: la base molecular de la vida* (pp. 177–179).
- Melo Sabogal, D. V., Torres Grisales, Y., Serna Jiménez, J. A., & Torres Valenzuela, L. S. (2015). *paradisiaca* spp) *Biotechnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 13(2), 76. [https://doi.org/10.18684/bsaa\(13\)76-85](https://doi.org/10.18684/bsaa(13)76-85)
- Mojsov, K. D. (2016). *Aspergillus* Enzymes for Food Industries. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Aspergillus System Properties and Applications*, 215–222. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63505-1.00033-6>
- Moral, S., Ramírez-coutiño, L. P., & García-gómez, M. D. J. (2015). Aspectos relevantes del uso de enzimas en la industria de los alimentos. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 2(3), 87–102.
- Núñez, R., Pérez, B., Motzezak, R., & Chirlino, M. (2012). Contenido de azúcares totales , reductores y no reductores en *Agave cocui* Trelease. *Multiciencias*, 12(2), 129–135.
- Oliveira, S, V Araújo, F Macedo, G (2018). Utilization of agroindustrial residues for producing cellulases by *Aspergillus fumigatus* on Semi-Solid Fermentation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(1), 937–944. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.12.038>
- Quiceno, M., Giraldo, G., & Villamizarhumbea. (2014). Caracterización fisicoquímica del plátano (*Musa paradisiaca* sp. AAB, Simmonds) para la industrialización. *UGCiencia*, 20, 48–54.
- Ramírez, J., & Ayala, M. (2014). Enzimas: ¿Qué son y cómo funcionan? *Revista Digital Universitaria Universidad Autónoma de México*, 15(12), 1–13.
- Saldaña, S. (2020). DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTOS.
- Salomão, G. S. B., Agnezi, J. C., Paulino, L. B., Hencker, L. B., de Lira, T. S., Tardioli, P. W., & Pinotti, L. M. (2019). Production of cellulases by solid state fermentation using natural and pretreated sugarcane bagasse with different fungi. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 1–6. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2018.10.019>
- Singh, R. S., Singh, T., & Pandey, A. (2019). Chapter 1 Microbial Enzymes An Overview. In R. S. Singh, R. R. Singhania, A. Pandey, & C. Larroche (Eds.), *Advances in Enzyme Technology* (pp. 1–40). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64114->

4.00001-7

- Srivastava, N., Srivastava, M., Ramteke, P. W., & Mishra, P. K. (2019). Solid-State Fermentation Strategy for Microbial Metabolites Production: An Overview. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Secondary Metabolites Biochemistry and Applications*, 345–354. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63504-4.00023-2>
- Uçak, İ., & Afreen, M. (2022). Enzymes. *Nutraceutical and Functional Food Components*, 537–571. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85052-0.00006-4>
- Vargas Corredor, Y. A., & Pérez Pérez, L. I. (2018). Aprovechamiento de residuos agroindustriales en el mejoramiento de la calidad del ambiente. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, V(1), 59–72. <https://doi.org/10.18359/rfcb.3108>
- Vega, G. (2021). *Caracterización cinética de enzimas producidas a partir de fermentación en estado sólido*. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO.
- Wiltschi, B., Cernava, T., Dennig, A., Galindo Casas, M., Geier, M., Gruber, S., Haberbauer, M., Heidinger, P., Herrero Acero, E., Kratzer, R., Luley-Goedl, C., Müller, C. A., Pitzer, J., Ribitsch, D., Sauer, M., Schmölzer, K., Schnitzhofer, W., Sensen, C. W., Soh, J., ... Wriessnegger, T. (2020). Enzymes revolutionize the bioproduction of value-added compounds: From enzyme discovery to special applications. *Biotechnology Advances*, 40, 107520. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107520>
- Wirth, A., Pacheco, F., Toma, N., Valiati, V., Tutikian, V., & Gomes, L. (2019). Análisis sobre el crecimiento de hongos en diferentes revestimientos aplicados a sistemas ligeros. *Revista Ingeniería de Construcción*, 34(1), 5–14. <https://doi.org/10.4067/s0718-50732019000100005>
- Yafetto, L. (2022). Application of solid-state fermentation by microbial biotechnology for bioprocessing of agro-industrial wastes from 1970 to 2020: A review and bibliometric analysis. *Heliyon*, 8(3), e09173. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09173>
- Yoshimi, A., Miyazawa, K., Kawauchi, M., & Abe, K. (2022). Cell Wall Integrity and Its Industrial Applications in Filamentous Fungi. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/jof8050435>

APÉNDICE

Apéndice B

Análisis de varianza de la velocidad de crecimiento radial, velocidad específica de crecimiento y actividad enzimática FPU/g

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	7	15,4552	2,20789	65,69	0,000
Lineal	4	14,7369	3,68423	109,62	0,000
Humedad (%)	3	12,6722	4,22407	125,68	0,000
Tamaño de partícula (um)	1	2,0647	2,06469	61,43	0,000
Interacciones de 2 términos	3	0,7183	0,23944	7,12	0,012
Humedad (%)*Tamaño de partícula (um)	3	0,7183	0,23944	7,12	0,012
Error	8	0,2689	0,03361		
Total	15	15,7241			

Análisis de Varianza

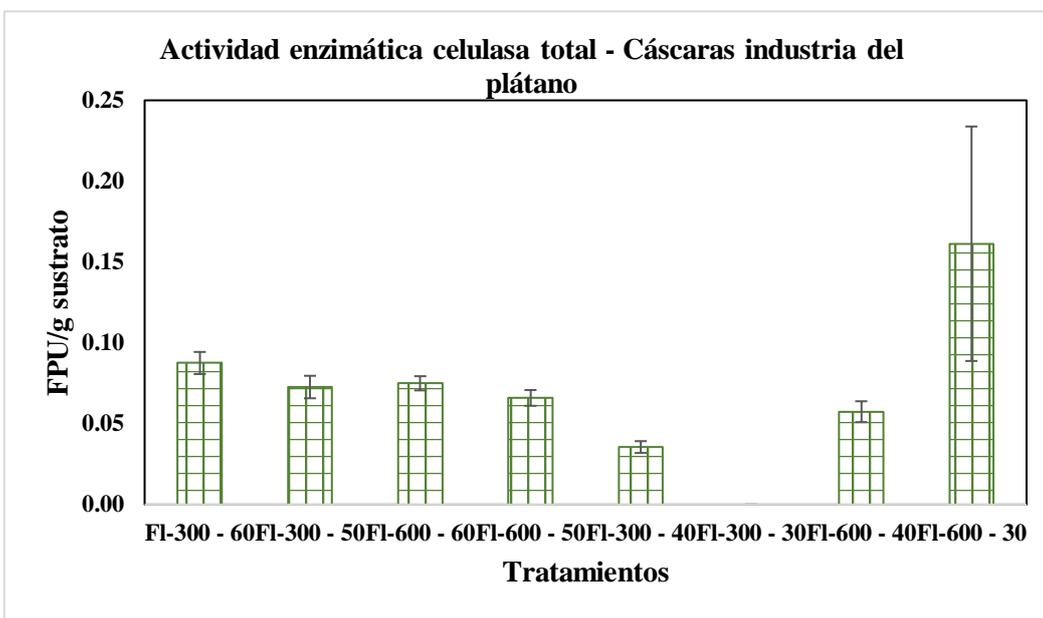
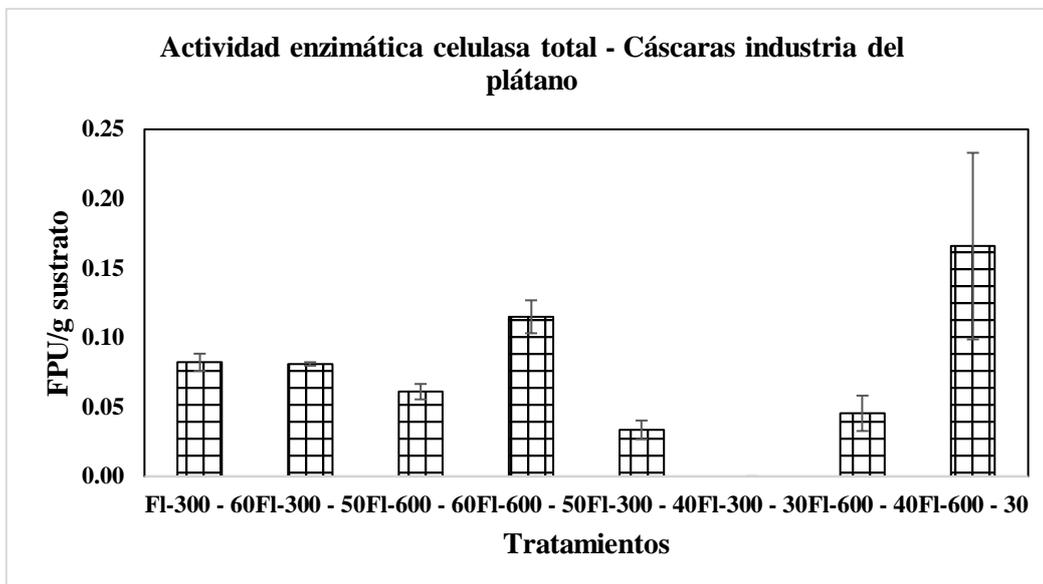
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	7	0,552839	0,078977	85,17	0,000
Lineal	4	0,368445	0,092111	99,33	0,000
Humedad (%)	3	0,245050	0,081683	88,09	0,000
Tamaño de partícula (um)	1	0,123394	0,123394	133,07	0,000
Interacciones de 2 términos	3	0,184394	0,061465	66,28	0,000
Humedad (%)*Tamaño de partícula (um)	3	0,184394	0,061465	66,28	0,000
Error	8	0,007419	0,000927		
Total	15	0,560257			

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	7	0,031850	0,004550	25,42	0,000
Lineal	4	0,012169	0,003042	17,00	0,001
Humedad (%)	3	0,004334	0,001445	8,07	0,008
Tamaño de partícula (um)	1	0,007835	0,007835	43,77	0,000
Interacciones de 2 términos	3	0,019681	0,006560	36,65	0,000
Humedad (%)*Tamaño de partícula (um)	3	0,019681	0,006560	36,65	0,000
Error	8	0,001432	0,000179		
Total	15	0,033282			

Apéndice C

Cuantificación enzimática celulítica de la bandeja 1 y 2



Apéndice D

Costos de producción del extracto enzimático

Mano de Obra Directa	Total Obreros	Costo Mensual (\$)	Costo 13 ero (\$)	Costo 14 to (\$)	Costo Aportaciones (\$)	Costo Anual (\$)	Costo Total Anual (\$)	Costo Total mes (\$)	Costo Total día (\$)
Lavado- cortado- secado- molienda- tamizado- filtración- envasado.	3	\$ 1,380.00	\$ 1,380.00	\$ 1,380.00	\$ 2,012.04	\$ 16,560.00	\$ 21,332.04	\$ 1,777.67	\$ 88.88
Preparación del Inoculo- inoculación	1	\$ 460.00	\$ 460.00	\$ 460.00	\$ 670.68	\$ 5,520.00	\$ 7,110.68	\$ 592.56	\$ 29.63
Fermentación- Incubación- Extracción	1	\$ 460.00	\$ 460.00	\$ 460.00	\$ 670.68	\$ 5,520.00	\$ 7,110.68	\$ 592.56	\$ 29.63
Total	5	\$ 2,300.00	\$ 2,300.00	\$ 2,300.00	\$ 3,353.40	\$ 27,600.00	\$ 35,553.40	\$ 2,962.78	\$ 148.14

Mano de Obra Indirecta	Total Obreros	Costo Mensual (\$)	Costo 13 ero (\$)	Costo 14 to (\$)	Costo Aportaciones (\$)	Costo Anual (\$)	Costo Total Anual (\$)	Costo Total mes (\$)	Costo Total día (\$)
Jefe de producción	1	\$ 1,500.00	\$ 1,500.00	\$ 460.00	\$ 2,187.00	\$ 18,000.00	\$ 22,147.00	\$ 1,845.58	\$ 92.28
Supervisor de Bodegas y distribución	1	\$ 900.00	\$ 900.00	\$ 460.00	\$ 1,312.20	\$ 10,800.00	\$ 13,472.20	\$ 1,122.68	\$ 56.13
Total	2	\$ 2,400.00	\$ 2,400.00	\$ 920.00	\$ 3,499.20	\$ 28,800.00	\$ 35,619.20	\$ 2,968.27	\$ 148.41

Materia Prima Ingredientes	Cantidad x Batch (Kg)	Costo MP (\$/Kg)	Costo Batch	Costo Mes	Costo Año
Cáscara de plátano	100	\$ 0.00	\$ 0.00	\$ 0.00	\$ 0.00
	100	\$ 0.10	\$ 10.00	\$ 180.00	\$ 38,880.00
Buffer (Lt)	25	\$ 1.18	\$ 27.96	\$ 503.28	\$ 6,039.36

Material Empaque	Und	Costo Empaque (\$/Und)	Costo Batch	Costo Mes	Costo Año
Fascos Ambar	12	\$ 0.56	\$ 6.72	\$ 120.96	\$ 1,451.52

Apéndice E

Lay out Diseño de planta [Lucidchart]

