

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



“PRODUCCIÓN DE UN COMPLEJO ENZIMÁTICO DE *Aspergillus niger* ATCC 9642 POR FERMENTACIÓN EN SUSTRATO SÓLIDO PARA LA SACARIFICACIÓN DE CÁSCARAS DE MANGO (*Mangifera indica* L.)”

**TESIS PARA OBTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO
EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTADO POR:

Bach. Yupanqui Mendoza Sergio Luis

ASESOR

M. Sc. Ángel Castro Alvarado

NUEVO CHIMBOTE – PERÚ

2021

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



“PRODUCCIÓN DE UN COMPLEJO ENZIMÁTICO DE *Aspergillus niger* ATCC 9642 POR FERMENTACIÓN EN SUSTRATO SÓLIDO PARA LA SACARIFICACIÓN DE CÁSCARAS DE MANGO (*Mangifera indica* L.)”

TESIS PARA OBTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: Bach. Yupanqui Mendoza Sergio Luis

Revisado y aprobado por el asesor

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized initial 'A' followed by a series of loops and a long horizontal stroke extending to the right.

M. Sc. Ángel Pablo Castro Alvarado

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



“PRODUCCIÓN DE UN COMPLEJO ENZIMÁTICO DE *Aspergillus niger* ATCC 9642 POR FERMENTACIÓN EN SUSTRATO SÓLIDO PARA LA SACARIFICACIÓN DE CÁSCARAS DE MANGO (*Mangifera indica* L.)”

TESIS PARA OBTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: Bach. Yupanqui Mendoza Sergio Luis

Revisado y aprobado por el jurado evaluador



José Manuel Villanueva Carlos
BIOLOGO - MICROBIOLOGO
CSP 4399

Blgo. Mclbgo. José Villanueva Carlos
PRESIDENTE



MSc. Ángel Castro Alvarado
INTEGRANTE



Blgo. Mclbgo. Eterio Alva Muñoz
INTEGRANTE

ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN DE LA TESIS (VIRTUAL)

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en la reunión de video conferencia Vía Zoom Institucional de la UNS, dando cumplimiento a la Resolución N° 014-2021-UNS-CFC Virtual, siendo las 12:00 horas del día 21 mayo del 2021

se reunió el Jurado Evaluador presidido por el Blgo Mblgo José Villanueva Carlos, teniendo como miembros a. M.Sc Ángel Castro Alvarado. (secretario) (a) y al Blgo Mblgo Eterio Alva Muñoz (integrante), para la sustentación de tesis a fin de optar el título de LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA, realizado por él, (la), (los) tesista (as) **Sergio Luis Yupanqui Mendoza** quien (es) sustentó (aron) la tesis “**PRODUCCIÓN DE UN COMPLEJO ENZIMÁTICO DE *Aspergillus niger* ATCC 9642 POR FERMENTACIÓN EN SUSTRATO SÓLIDO PARA LA SACARIFICACIÓN DE CÁSCARAS DE MANGO (*Mangifera indica* L.)**”,

Terminada la sustentación, el (la), (los) tesista (as)s respondió (ieron) a las preguntas formuladas por los miembros del jurado.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como **MUY BUENO** asignándole un calificativo de **Dieciocho** puntos. (Art. 24° inc. a, b, c, d, e, f – Directiva N° 003-2020-UNS-VRAC: ADECUACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS DE OBTENCIÓN DE GRADOS ACADÉMICOS Y TÍTULOS PROFESIONALES MEDIANTE TRABAJO NO PRESENCIAL VIRTUAL EN LA UNS).

Siendo las 13. horas del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad



.....
José Manuel Villanueva Carlos
BIOLOGO - MICROBIOLOGO
CSP 4399

BLGO.MBLGO JOSÉ VILLANUEVA CARLOS
Presidente



.....
MSC. ÁNGEL CASTRO ALVARADO
Secretario



.....
BLGO. MBLGO. ETERIO ALVA MUÑOZ
Integrante

Distribución: Integrantes JE (03), tesistas (01) y archivo FC (02).



DECLARACION JURADA DE AUTORÍA

Yo,Sergio Luis Yupanqui Mendoza

estudiante / docente de la

Facultad:	Ciencias	<input checked="" type="checkbox"/>	Educación		Ingeniería	
Escuela Profesional:	de Biotecnología					
Departamento Académico:	Ciencias					
Escuela de Posgrado:	Maestría			Doctorado		

Programa:

De la Universidad Nacional del Santa; Declaro que el trabajo de investigación intitulado:

Producción de un complejo enzimático de *Aspergillus niger* ATCC 9642 por fermentación en sustrato sólido para la sacarificación de cáscaras de mango (*Mangífera indica* L.).....

presentado en ...123..... folios, para la obtención del Grado académico: ()

Título profesional: (X) Investigación anual: ()

- He citado todas las fuentes empleadas, no he utilizado otra fuente distinta a las declaradas en el presente trabajo.
- Este trabajo de investigación no ha sido presentado con anterioridad ni completa ni parcialmente para la obtención de grado académico o título profesional.
- Comprendo que el trabajo de investigación será público y por lo tanto sujeto a ser revisado electrónicamente para la detección de plagio por el VRIN.
- De encontrarse uso de material intelectual sin el reconocimiento de su fuente o autor, me someto a las sanciones que determinan el proceso disciplinario.

Nuevo Chimbote 21 de junio de 2021

Firma:

Nombres y Apellidos: SERGIO LUIS YUPANQUI MENDOZA

DNI: 72771133

NOTA: Esta Declaración Jurada simple indicando que su investigación es un trabajo inédito, no exime a tesis e investigadores, que no bien se retome el servicio con el software antiplagio, ésta tendrá que ser aplicado antes que el informe final sea publicado en el Repositorio Institucional Digital UNS.

DEDICATORIA

A Dios por guiarme siempre en el camino correcto y ser siempre mi fortaleza en todo momento.

A mi padre, Apolinar Yupanqui, por brindarme su apoyo incondicional y las palabras de aliento e inspiración que yo requería para poder superarme cada día más; y a mi madre Eusebia Mendoza, por demostrarme siempre su cariño y apoyo, incentivándome para terminar y conseguir mis objetivos logrando concluir hoy esta meta.

A mi hermana Katherine, por brindarme su apoyo y cariño, y que junto a mis padres son los pilares más importantes en mi vida.

Sergio Luis Yupanqui Mendoza

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por darme salud y fortaleza durante mis años como estudiante, todo cuanto he conseguido se lo debo a él.

A mi Asesor M. Sc. Ángel Castro Alvarado, Director de la EAP de Biotecnología, por brindarme su experiencia como investigador, así como el apoyo académico que necesitaba para la ejecución de este trabajo.

A mis profesores, M. Sc. Willian Capa Robles, Dr. Roberto Vega Paulino, Mblgo. Eterio Alva Muñoz, Dr. Carlos Azañero Díaz y Mblgo. José Villanueva Carlos, por instruirme, aconsejarme y apoyarme en mis cinco años de formación profesional.

A mis compañeros y compañeras de promoción, por los gratos momentos compartidos dentro y fuera de los laboratorios.

A mi familia por todo su cariño, apoyo y comprensión brindada durante el tiempo de labores y aprendizaje.

A Moisés, Valto, Milko Josué y Brisa del Mar, por su cariño incondicional.

ÍNDICE

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	17
1.1. OBJETIVOS	21
1.1.1. Objetivo General.....	21
1.1.2. Objetivos específicos	21
1.2. HIPÓTESIS.....	21
II. MARCO TEÓRICO	22
2.1. GENERALIDADES DEL MANGO	22
2.1.1. RESIDUOS DERIVADOS DE LA ACTIVIDAD INDUSTRIAL DEL MANGO.....	22
2.1.2. Características de las cáscaras de mango	23
2.2. PECTINA.....	24
2.2.1. DEFINICIÓN	24
2.2.2. ESTRUCTURA	25
2.3. CELULOSA.....	26
2.4. ENZIMAS.....	28
2.4.1. DEFINICIÓN	28
2.4.2. MECANISMOS DE ACCIÓN ENZIMÁTICA	28
2.4.3. CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	30
2.4.4. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	31
2.4.5. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA VELOCIDAD DE LAS REACCIONES ENZIMÁTICAS.....	31
2.4.6. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	33
2.5. PECTINASAS	33
2.5.1. CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS PÉCTICAS	34
2.5.2. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS PECTINASAS.....	35
2.5.3. MICROORGANISMOS PECTINOLÍTICOS	37
2.6. CELULASAS	39
2.6.1. MICROORGANISMOS CELULOLÍTICOS.....	40
2.7. FERMENTACIÓN	42
2.7.1. FERMENTACIÓN EN SUSTRATO SÓLIDO	42
2.7.2. FACTORES INFLUYENTES EN LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO43	
2.7.3. <i>Aspergillus niger</i>	45
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	47

3.1.	MÉTODO DE ESTUDIO	47
3.2.	LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO.....	47
3.3.	MATERIAL DE ESTUDIO	47
3.3.1.	BIOLÓGICO	47
3.4.	MÉTODOS	48
3.4.1.	DESCRIPCIÓN DE LA MATERIA PRIMA	48
3.4.2.	ANÁLISIS QUÍMICO DE LA MATERIA PRIMA.....	48
3.4.3.	PRETRATAMIENTO DE LA CÁSCARA DE MANGO	53
3.4.4.	OBTENCIÓN Y MANTENCIÓN DE CEPA DE <i>Aspergillus niger</i>	54
3.4.5.	DISEÑO EXPERIMENTAL	54
3.4.6.	CONDICIONES DE FERMENTACIÓN	55
3.4.7.	ANÁLISIS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	57
3.4.8.	APLICACIÓN DEL COMPLEJO ENZIMÁTICO.....	58
3.4.9.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	60
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
4.1.	DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE LA CÁSCARA DE MANGO	61
4.2.	PRETRATAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA.....	64
4.3.	OPTIMIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	65
4.3.1.	Efecto del tiempo de fermentación en la actividad enzimática celulasa (CMCasa y FPasa) y pectinasa.....	70
4.3.2.	Efecto del pH en la actividad enzimática celulasa (CMCasa y FPasa) y pectinasa.....	72
4.3.3.	Efecto del porcentaje de humedad del medio sólido en la actividad enzimática celulasa (CMCasa y FPasa) y pectinasa.....	73
4.3.4.	Análisis Estadísticos de la optimización de la actividad enzimática.....	75
4.4.	VALIDACIÓN DEL MODELO OPTIMIZADO.....	84
4.5.	SACARIFICACIÓN DE LAS CÁSCARAS DE MANGO.....	85
V.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	88
5.1.	CONCLUSIONES	88
5.2.	RECOMENDACIONES	89
VI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
	ANEXOS	102

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición porcentual en base húmeda de las cáscaras de mango	24
Tabla 2. Composición mineral aproximada de cáscara de mango.....	24
Tabla 3. Microorganismos implicados en la síntesis de enzimas péctinolíticas.....	38
Tabla 4. Producción de celulasas microbianas usando diferentes sustratos	41
Tabla 5. Matriz de variables independientes utilizadas en el modelo Experimental DCCR	54
Tabla 6. Diseño experimental según DCCR para las variables pH inicial, tiempo y porcentaje de humedad del medio.	55
Tabla 7. Medio salino suplementado en los experimentos de fermentación en sustrato sólido.	56
Tabla 8. Composición Química de la cáscara de mango variedad Kentt en porcentual en base seca.	61
Tabla 9. Composición química en valores porcentuales en base seca de cáscara de mango luego del tratamiento con ebullición.	64
Tabla 10. Matriz del Planeamiento experimental (DCCR 2 ³) con valores reales y codificados de las variables de estudio y actividad enzimática expresadas en (U/g).	67
Tabla 11. Valores de actividad enzimática en las condiciones óptimas de fermentación sólida.....	85
Tabla 12. Rendimientos de azúcares monoméricos obtenidos luego del tratamiento térmico con ebullición.	86
Tabla 13. Rendimientos de azúcares monoméricos durante el proceso de sacarificación utilizando extracto enzimático a diferentes horas de tratamiento.....	86
Tabla 14. Distribución de rendimientos de azúcares monoméricos en ambas etapas de tratamiento (Etapa de tratamiento con ebullición + Etapa de Sacarificación enzimática). .	87
Tabla 15. Resultados del porcentaje de humedad de la muestra de cáscara de mango. ...	103
Tabla 16. Resultados del porcentaje de cenizas de la muestra de cáscara de mango.	104
Tabla 17. Resultados del porcentaje de proteínas de la muestra de cáscara de mango seca	106
Tabla 18. Resultados del porcentaje de grasa de la muestra de cáscara de mango seca. .	107
Tabla 19. Resultados del porcentaje de pectina en la muestra de cáscara de mango seca	108
Tabla 20. Resultados del porcentaje de lignina en la muestra de cáscara de mango seca	109

Tabla 21. Resultados del porcentaje de holocelulosa en la muestra de cáscara de mango seca	110
Tabla 22. Resultados del porcentaje de celulosa en la muestra de cáscara de mango seca	111
Tabla 23. Resultados del porcentaje de almidón en la muestra de cáscara de mango seca	112
Tabla 24. Datos del padrón obtenidos de la concentración de glucosa para curva de calibración.	115
Tabla 25. Datos del padrón utilizado de ácido D- galacturónico en función de la absorbancia en 540 nm	116
Tabla 26. Efectos estimados del modelo de regresión para la actividad enzimática CMCasa	118
Tabla 27. Efectos estimados del modelo de regresión para la actividad enzimática FPasa	118
Tabla 28. Efectos estimados del modelo de regresión para la actividad enzimática Pectinasa	119
Tabla 29. Análisis de Varianza (ANOVA) para el modelo de segundo orden de la actividad CMCasa	119
Tabla 30. Análisis de Varianza (ANOVA) para el modelo de segundo orden de la actividad FPasa.....	119
Tabla 31. Análisis de Varianza (ANOVA) para el modelo de segundo orden de la actividad Pectinasa	120

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la pectina (Pawar, 2014).	25
Figura 2. Estructura esquemática de la pectina (Harholt et al., 2010).....	26
Figura 3. Estructura lineal de la celulosa, formada por varias unidades de β - glucosa (Festucci-Buselli et al., 2007).....	27
Figura 4. Representación gráfica del curso de una reacción enzimática.....	29
Figura 5. Cambio de las concentraciones de producto y sustrato con respecto al tiempo.	30
Figura 6. Ionización del ácido glutámico frente a un cambio de pH.....	32
Figura 7. Estructura de pectinasas microbianas. A. Pectinesterasa de <i>E. chrysanthemi</i> (1 QJV), B. Poligalacturonasa (PG) DE <i>Aspergillus aculeatus</i> (1IA5), C. Endo-poligalacturonasa de <i>Fusarium moniliforme</i> (1HG8).....	34
Figura 8. Modo de acción de las pectinasas: A. R = H para PG y CH ₃ para PMG; B. PE; y C. R = H para PGL y CH ₃ para PL. La flecha indica el lugar donde la pectinasa reacciona con las sustancias pécticas. PMG, polimetilgalacturonas; PG, poligalacturonas (EC 3.2.1.15); PE, pectinesterasa (EC 3.1.1.11); PL, pectina liasa (EC-4.2.2.10) (Pedrolli et al., 2009).....	37
Figura 9. Representación esquemática de las etapas secuenciales en la acción de celulasas.	40
Figura 10. Cepa fúngica de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642 en agar papa dextrosa (PDA); B. Vista microscópica del conidióforo de <i>A. niger</i> a 100 X, con tinción Safranina.	47
Figura 11. Cáscara de mango sin tratamiento utilizadas en la experimentación.....	48
Figura 12. Gráfica de Pareto para la Actividad enzimática Endoglucanasa (CMCasa). (L): Efecto lineal, (Q): Efecto cuadrático, 1Lby3L: Interacción lineal (Tiempo de fermentación y humedad), 1Lby2L: Interacción lineal (Tiempo de fermentación y pH del medio), 2Lby3L: Interacción lineal (pH del medio y Humedad). Gráficos obtenidos con Statistica v10.0....	69
Figura 13. Gráfica de Pareto para la Actividad enzimática Celulasa Total (FPasa). (L): Efecto lineal, (Q): Efecto cuadrático, 1Lby3L: Interacción lineal (Tiempo de fermentación y humedad), 1Lby2L: Interacción lineal (Tiempo de fermentación y pH del medio), 2Lby3L: Interacción lineal (pH del medio y Humedad). Gráficos obtenidos con Statistica v10.0....	69
Figura 14. Gráfica de Pareto para la Actividad enzimática Pectinasa. (L): Efecto lineal, (Q): Efecto cuadrático, 1Lby3L: Interacción lineal (Tiempo de fermentación y humedad),	

1Lby2L: Interacción lineal (Tiempo de fermentación y pH del medio), 2Lby3L: Interacción lineal (pH del medio y Humedad). Gráficos obtenidos con Statistica v10.0.....	70
Figura 15. Superficie de respuesta y gráficas de contorno de la actividad Endoglucanasa (CMCasa) de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642. (A) Efecto del tiempo y la Humedad, (B) Efecto del pH y el tiempo y (C) Efecto de la Humedad y pH.	79
Figura 16. Superficie de respuesta y gráficas de contorno de la actividad Celulasa total (FPasa) de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642. (A) Efecto del tiempo y la Humedad, (B) Efecto del pH y el tiempo y (C) Efecto de la Humedad y pH.....	81
Figura 17. Superficie de respuesta y gráficas de contorno de la actividad Pectinasa de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642. (A) Efecto del tiempo y la Humedad, (B) Efecto del pH y el tiempo y (C) Efecto de la Humedad y pH.	83
Figura 18. Secado de la muestra de cáscara de mango en horno de convección a 105 °C.	103
Figura 19. Incineración de las muestras de cáscara de mango en mufla a 550 °C para el análisis de ceniza	104
Figura 20. Representación gráfica para la determinación de proteína. A. Balones de vidrio con muestra tratada luego de la digestión; B. Proceso de destilación; C. Titulación de la muestra.....	106
Figura 21. Representación gráfica de la extracción de grasa de la cáscara de mango a través del equipo Soxhlet.	108
Figura 22. Extracción de pectina de la muestra de cáscara de mango. A. Imagen en reposo de la extracción por filtración utilizando etanol 70%, (B) Pectina extraída sobre papel filtro luego del secado en horno.	109
Figura 23. Determinación del contenido de lignina. A. Matraz conteniendo cáscara de mango desfibrilada luego del proceso de autoclavado, B. Residuo húmedo de lignina sobre papel filtro.....	110
Figura 24. Residuo de Holocelulosa de la cáscara de mango seca.....	111
Figura 25. Residuo de celulosa extraída a partir de holocelulosa de cáscara de mango seca.	112
Figura 26. Representación gráfica de la determinación de azúcares reductores con Método DNS	114
Figura 27. Curva de Calibración de azúcares reductores por DNS	115
Figura 28. Curva de Calibración para la concentración de ácido D- galacturónico por DNS.	116

Figura 29. Frasco Erlenmeyer con medio de fermentación sólido utilizados en la producción del complejo enzimático. A. Esporas de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642. B. Cáscara de mango tratada utilizado en el proceso de fermentación.	117
Figura 30. Perfiles de los valores predichos de deseabilidad de las variables independientes de Tiempo, pH y Humedad, frente a las variables respuestas de actividad enzimática de CMCasa, FPasa y Pectinasa.....	121

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo producir un complejo enzimático de *Aspergillus niger* ATCC 9642 por fermentación en sustrato sólido para la sacarificación de cáscaras de mango (*Mangifera indica* L.) de la variedad Kent provenientes de los residuos agroindustriales generados por la empresa “Inversiones Frigoríficas PRC S.A.” ubicada en la ciudad de Santa, Perú. Se utilizó un diseño experimental compuesto central rotatable (DCCR) para estudiar el efecto de las condiciones de fermentación, entre ellas, el tiempo de fermentación, porcentaje de humedad y pH del medio sólido compuesto también por cáscaras de mango como sustrato, sobre la producción del complejo enzimático, obteniendo como variables respuestas las actividades enzimáticas correspondientes a, endoglucanasa (CMCasa), celulasa total (FPasa) y pectinasa. Los ensayos permitieron establecer las condiciones óptimas en 81 h para el tiempo de fermentación, pH del medio en 4.66 y porcentaje de humedad del medio sólido de 59%, estas condiciones resultaron en la producción de un complejo enzimático de actividad enzimática Endoglucanasa (CMCasa) de 6.28 U/g, actividad Celulasa total (FPasa) de 3.29 U/g y actividad Pectinasa de 117.02 U/g. Este complejo producido fue utilizado a su vez, para la sacarificación de cáscaras de mango tratadas previamente térmicamente (tratamiento con el cual se produjo un 23.72% de sacarificación), permitiendo obtener un rendimiento máximo de liberación de azúcares reductores de 0.424 g AR/g de sustrato seco a las 8 h de hidrólisis, siendo estimado un porcentaje de sacarificación del 39.29%. De esta manera se pudo obtener un rendimiento total de sacarificación del 63.01%.

Palabras clave: Actividad enzimática, sacarificación, complejo enzimático, fermentación en sustrato sólido, pectinasas.

ABSTRACT

The objective of this research work was to produce an enzymatic complex of *Aspergillus niger* ATCC 9642 by solid-state fermentation for the saccharification of mango peels (*Mangifera indica* L.) of the Kent variety from agro-industrial waste generated by the company "Inversiones Frigoríficas PRC S.A." located in the city of Santa, Peru. An experimental design rotatable central compound (DCCR) was used to study the effect of the fermentation conditions, among them, the fermentation time, percentage of humidity and pH of the solid medium also composed of mango peels as substrate, on the production of the enzyme complex, obtaining as variable responses enzymatic activities corresponding to endoglucanase (CMCase), total cellulase (FPase) and pectinase. The tests allowed to establish the optimal conditions in 81 h for the fermentation time, pH of the medium at 4.66 and percentage of humidity of the solid medium of 59%, these conditions resulted in the production of an enzyme complex of Endoglucanase (CMCase) enzyme activity of 6.28 U/g, total Cellulase activity (FPase) of 3.29 U/g and Pectinase activity of 117.02 U/g. This complex produced was used in turn, for the saccharification of previously heat-treated mango peels (treatment with which 23.72% saccharification was produced), allowing to obtain a maximum yield of reducing sugars release of 0.424 g AR / g of dry substrate at 8 h of hydrolysis, estimating a saccharification percentage of 39.29%. In this way, a total saccharification yield of 63.01% could be obtained.

Keywords: Enzymatic activity, saccharification, enzyme complex, solid-state fermentation, pectinases,

I. INTRODUCCIÓN

El uso de desechos agroindustriales como materias primas en procesos biotecnológicos puede ayudar a la síntesis de compuestos de valor agregado y de igual forma a reducir la carga de contaminación del medio ambiente. Las industrias agrícolas producen una gran cantidad de residuos cada año generando un gran problema de disposición, contaminación ambiental y efectos nocivos para la salud humana y animal (Bos & Hamelinck, 2014).

Tal es el caso de los desechos industriales de frutas, que hasta el año 2017 abarcaron el 38% de la proporción total de residuos de alimentos desperdiciados a nivel mundial (Statistica, 2018). Estos residuos están constituidos de diferentes composiciones de celulosa, hemicelulosa, lignina, humedad, cenizas, carbono y nitrógeno, etc, que, a su vez, tienen potencial para ser digeridos bioquímicamente para sintetizar productos útiles como la producción de enzimas, biogás y bioetanol (Sadh et al., 2018).

Dentro de los residuos de procesamiento de frutas más infrautilizados, se encuentran las cáscaras de mango (*Mangifera indica* L.) generadas durante la elaboración de mermeladas, bebidas y conservas. Actualmente, los desechos del mango se eliminan mediante vertederos o incineración, lo que genera costos adicionales debido al alto contenido de agua de las cáscaras (Banerjee et al., 2016). Las cáscaras de mango (40-60% del total de desechos) si se fraccionan en una biorrefinería, podrían proporcionar biopolímeros y compuestos bioactivos con un alto valor económico (Banerjee et al., 2018). Por ejemplo, se pueden obtener biopolímeros como hemicelulosa (8,1%), celulosa (9,19%), lignina (4,25%) y pectina (10-21,2%) (Jamsazzadeh Kermani et al., 2015).

En este contexto, una eco-tecnología prometedora que permite obtener bioproductos de interés industrial utilizando biomasa sólida (residuos y subproductos), es la fermentación en estado sólido (FES), la cual permite utilizar residuos orgánicos sólidos como sustratos sin pretratamiento obligatorio, asemejándose a un entorno natural para que los microorganismos prosperen (Cerdeira et al., 2019). La FES se utiliza actualmente en una variedad de aplicaciones que incluyen por ejemplo la producción de enzimas, antibióticos y productos de reciente desarrollo, como compuestos bioactivos y ácidos orgánicos. La producción de enzimas por FES ha sido una referencia para este tipo de procesos, debido a la amplia variedad de enzimas que se pueden producir, incluso en escala industrial. La importancia de la FES en la producción de enzimas se debe a los residuos agroindustriales que generalmente se utilizan

para este propósito (Sadh et al., 2018). Los nutrientes presentes en el sustrato, como los ya mencionados nutrientes característicos de las cáscaras de mango, apoyan el crecimiento de microorganismos y, debido a su metabolismo natural, pueden secretar enzimas mientras crecen en este tipo de sustratos.

Diversas investigaciones abalan el uso de diferentes residuos agrícolas para la producción de complejos enzimáticos, tales como los estudios realizados por Kakde y Aithal, (2018), los cuales mediante la técnica de fermentación en estado sólido (FES), evaluaron el potencial del uso de residuos lignocelulósicos agrícolas para la producción de celulasa por *Aspergillus niger*. En su investigación, los autores utilizaron biomasa de residuos agrícolas tales como, las cáscaras de banano, tallos y hojas de algodón, cáscara de guisantes, hojas y tallos de soja, bagazo de caña de azúcar, hojas de tur y paja de trigo, todas ellas cumpliendo el rol de sustratos durante la fermentación sólida, obteniendo como resultados buenas cantidades de celulosas, cuando los medios de fermentación fueron complementados con fuente de nitrógeno en forma de peptona, caseína, nitrato de sodio y urea.

Abdullah et al., (2018), aislaron diferentes cepas de hongos de un suelo local en Pakistán, identificándose cepas de hongos entre ellos, *Aspergillus niger* IBT-7 productor de enzimas pectinasas. En su estudio, esta cepa fue aislada y sometida a diferentes parámetros físicos y nutricionales para mejorar la producción de pectinasa, incluyendo análisis de optimización. Entre los medios probados, el medio de fermentación sólido conteniendo salvado de arroz, humedecido con el medio nutritivo Czapek, mostró mayor producción de pectinasa a las 72 h de incubación a 30 ml de contenido de humedad, pH 5,0 y 30 °C, agregando xilosa (1,5%) y extracto de levadura (1%) como fuentes adicionales de carbono y nitrógeno respectivamente, esto con el fin de maximizar la respuesta de actividad enzimática (39,1 UI/mL).

Del mismo modo, Luz, (2018) evaluó la producción de diferentes enzimas entre ellas, α -amilasa, celulosas e invertasas producidas por el hongo *Aspergillus niger*, a partir de residuos foliares de *C. linearifolius*, mediante fermentación en estado sólido. Las condiciones a la cual se encontró un aumento de la actividad enzimática fue a una temperatura de 30 °C, con 75% de humedad. La mayor actividad enzimática ocurrió a los 13 días, para todas las enzimas estudiadas, presentando actividades entre $44,05 \pm 1,5$ U/g para α -amilasa; celulasa $24,05 \pm 1,14$ U/g e invertasa $21,99 \pm 3$ U/g.

Llenque et al., (2016), investigaron la producción de celulasas por *Aspergillus niger* en un biorreactor de lecho empacado en condiciones de laboratorio, con el objetivo de aprovechar el bagazo, residuo de la caña de azúcar, como soporte y sustrato, logrando producir celulasas desde el segundo día de incubación, obteniendo una producción final de 0,025 U/mL a los 20 días, con tendencia a ir incrementando, lo que permitió evidenciar la producción de enzimas celulasas utilizando el bagazo de caña de azúcar, a pH 6,0 en un biorreactor aireado.

Por otro lado, la síntesis enzimática por FES no solamente implica la utilización inmediata de los componentes estructurales que conforman a las cáscaras de mango u otro residuo agroindustrial, la mayor dificultad para el uso de los residuos lignocelulósicos está representada por la barrera física formada por la lignina, que impide el uso de la celulosa nativa; por lo tanto, las enzimas secretadas por microorganismos no pueden atravesar esta barrera fácilmente (Sartori et al., 2015).

Investigaciones relacionadas al completo uso del material estructural de residuos agroindustriales, son basados en el uso de diferentes técnicas que aumenten la permeabilidad de dichas estructuras, entre ellas, el uso de tratamientos físicos, térmicos, alcalinos, ácidos y enzimáticos, e inclusive en el uso integrado de ellas, partiendo desde la síntesis del coctel enzimático, objeto de estudio de diferentes investigaciones y estudios de optimización, y la aplicación posterior de los mismos, en procesos de sacarificación de biomasa lignocelulósica (Kucharska et al., 2020). Dicho de otro modo, los azúcares simples deben liberarse de la celulosa cristalina y la hemicelulosa mediante hidrólisis enzimática para introducirlos en otros procesos de bioconversión, por lo tanto, la eficiencia de la hidrólisis enzimática es crucial para la conversión de la biomasa.

La utilización de cocteles enzimáticos o también llamados complejos enzimáticos para procesos de sacarificación en biomasa residual es relatada en la literatura. Idrees et al., (2014), evaluaron la producción de azúcares fermentables mediante hidrólisis quimio-enzimática combinada del Jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*), para la producción de azúcares fermentables, con el objetivo de cambiar la naturaleza recalcitrante del material lignocelulósico para obtener el máximo rendimiento de hidrólisis. El complejo enzimático incluyó exoglucanasa, endoglucanasa, hemicelulasa y beta-glucosidasa, con la cual pudieron lograr una alta recuperación de azúcares fermentables del 73.4% y un alto rendimiento de conversión a etanol.

Alrumman, (2016), realizó procesos de sacarificación enzimática y fermentación de los desechos celulósicos de *Palmera datilera* a glucosa y ácido láctico, haciendo uso de un complejo enzimático de *Geobacillus stearothermophilus* la cual estaba conformado por FPasa 8.105 U/mL, CMCasa, 12.84 U/mL y β -glucosidasa 3.74 U/mL. En su estudio de optimización fue determinado que la tasa máxima de sacarificación se encontró a una concentración de sustrato del 4% y una concentración de enzima de 30 FPU/g de sustrato, obteniéndose un grado de sacarificación del 71.03%.

Por otro lado, Mostafa et al., (2013), utilizaron medios de fermentación en estado sólido conformados por mazorcas de maíz, paja de arroz, cáscaras de frutas como limón y naranja, cáscaras de papa y tallos de mulujía, para la producción de un complejo enzimático producidos por *Penicillium pinophilum* Hedg NRRL 3503, *Penicillium funiculosum* NRRL 13033 y *Penicillium funiculosum* NRRL 1768. Dicho complejo enzimático estuvo conformado por CMCasa, pectinasa, xilanasa y α -amilasa, que posteriormente fue utilizado para la sacarificación enzimática de cáscaras de limón. Los resultados encontrados por estos autores evidenciaron la importancia de la sacarificación para la recuperación de azúcares fermentables en frutas obteniéndose un mayor rendimiento de sacarificación y azúcares reductores en cáscaras de limón (86.48% y 26.04 mg/g sustrato de limón), seguido de las cáscaras de naranja (63.66% y 19.16 mg/g cáscara de naranja), respectivamente.

Por lo anteriormente mencionado, se hace evidente la necesidad de invertir esfuerzos para el desarrollo de nuevas tecnologías para la biovalorización de residuos agroindustriales que representan recursos de bajo costo y alta disponibilidad en la provincia del Santa, Áncash. En este sentido, la fermentación en estado sólido catalizada por microorganismos se presenta como una estrategia capaz de promover caminos alternativos para los residuos generados, reduciendo posibles problemas ambientales, así como agregar valor a estas materias primas a través de la producción de sustancias de interés industrial como son los complejos enzimáticos. En base a lo expuesto anteriormente, este trabajo pretende optimizar las condiciones de fermentación en estado sólido para la producción de un complejo enzimático, siendo este último aplicado a la sacarificación de cáscaras de mango. Por lo tanto, es importante considerar la siguiente incógnita: ¿Cuáles son las condiciones óptimas de pH, tiempo de fermentación y porcentaje de humedad de la fermentación en estado sólido de *Aspergillus niger* ATTC 9642, para la producción de un complejo enzimático aplicado a la sacarificación de cáscaras de mango?

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo General

Producir un complejo enzimático de *Aspergillus niger* ATCC 9642 por fermentación en sustrato sólido para la sacarificación de cáscaras de mango (*Mangifera indica* L.).

1.1.2. Objetivos específicos

- Optimizar las condiciones de pH (3-7), tiempo de fermentación (48 h – 96 h), y porcentaje de humedad (50 % - 70 %), del medio de cultivo sólido conformado por cáscara de mango para la producción de un complejo enzimático de *Aspergillus niger* ATCC 9642.
- Determinar la actividad enzimática en las condiciones optimizadas del extracto enzimático en base a su actividad endoglucanasa (CMCasa), celulasa total (FPasa) y pectinasa.
- Evaluar el efecto de las variables de tiempo de fermentación, pH y porcentaje de humedad del medio sólido sobre la actividad enzimática del extracto.
- Determinar el rendimiento de glucosa máximo y el porcentaje de conversión durante la sacarificación.
- Determinar el rendimiento de sacarificación total utilizando el extracto enzimático.

1.2. HIPÓTESIS

Las variables optimizadas mediante el delineamiento compuesto central rotacional, para tiempo, pH y humedad, serán de 72 h, pH 3 y 70% respectivamente. Estos parámetros permitirán obtener un complejo enzimático de alta actividad celulasa y pectinasa, el cual se espera que presente un índice de sacarificación de cáscaras de mango del 50% de azúcares reductores.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. GENERALIDADES DEL MANGO

El mango es indudablemente la especie de mayor importancia de la familia de las Anacardiáceas, tanto por su distribución mundial, como su importancia económica- quinto fruto de consumo mundial y tercero entre los tropicales, inmediatamente detrás del plátano y la piña tropical. La gran mayoría de las plantas pertenecientes a la familia del mango son especies tropicales y entre ellas cabe citar a las llamadas “ciruelas tropicales”, perteneciente al género *Spondias* o a otros géneros como es el caso de la marula (*Sclerocarya birrea spp*). Dentro de las Anacardiáceas se encuentran también dos frutales de gran consumo como frutos secos, el anacardo (*Anacardium occidentale L.*) y el pistacho (*Pistacia vera L.*) (Saúco, 2009).

El género *Mangifera* comprende 69 especies, nativas del sureste de Asia e islas circundantes, salvo la *Mangifera africana* que se encuentra en África. Está reconocido en la actualidad como uno de los tres o cuatro frutos tropicales más finos (Melandani et al., 2017).

La composición química de los frutos cambia de variedad en variedad. Los principales constituyentes del mango son: carbohidratos, ácidos orgánicos, proteínas, aminoácidos, pigmentos, sustancias pécticas, polifenoles, vitaminas, minerales, ácidos grasos y componentes odoríferos. Los azúcares que se encuentran en mayor proporción en el mango son: glucosa, fructosa, sacarosa y xilosa. La sacarosa es la responsable del sabor dulce, y no la fructosa como generalmente sucede. Todos estos azúcares son susceptibles de someterse a un proceso de fermentación alcohólica (Gutiérrez, 2009).

2.1.1. RESIDUOS DERIVADOS DE LA ACTIVIDAD INDUSTRIAL DEL MANGO

La industria de la fruta aborda el carácter perecedero de sus productos y el gran porcentaje de subproductos, como las cáscaras, las semillas y la pulpa no utilizada, que se generan en los diferentes pasos del proceso industrial. En la mayoría de los casos, los subproductos desperdiciados pueden presentar

cantidades similares o incluso más altos hasta el punto de exceder la cantidad de productos finales, lo cual fue demostrado por investigaciones preliminares realizados por Ayala-Zavala et al., (2010), en el que demostró que varios tipos de frutas recién cortadas produjeron cantidades variables de subproductos hasta el punto de exceder al producto terminado, como sucedió en el caso de los mangos, los que produjeron 13.5% de semillas, 11% de cáscaras, 17.94% de pulpa inutilizable y 57.56% de productos finales.

El mango es uno de los frutos representativos de la industria agroalimentaria peruana y su proceso de transformación en diferentes productos como bebidas o conservas, deja una cantidad considerable de material residual. De la producción total anual de mango en la actualidad, que fue hasta el año 2016 de 458 766 t, un 19.7 % fue destinado al procesamiento industrial como elaboración de jugos y conservas, dejando un producto residual de esta actividad del 2.7 % equivalente a 12 386 t, sólo en cáscaras (Casimiro et al., 2017).

Aunque el porcentaje a simple vista es mínimo, la cáscara generada en el procesamiento del mango se utiliza actualmente para la fabricación de concentrados alimenticios para ganado, y en su gran mayoría es considerada como un residuo industrial y termina siendo una fuente de contaminación ambiental (Serna Cock & Torres León, 2014).

2.1.2. Características de las cáscaras de mango

La cáscara de mango constituye alrededor del 15 al 20% de la fruta, destacándose dentro de su composición compuestos valiosos como polifenoles, carotenoides, enzimas y fibra dietética (FD). Su alto potencial agroindustrial se debe a la relativa cantidad porcentual de pectina (15 % del peso seco de la cáscara), proteínas y fibra. En las tablas 1 y 2 se presenta el contenido porcentual aproximado de a composición química de las cáscaras de mango.

Tabla 1. Composición porcentual en base húmeda de las cáscaras de mango

Componente	% Base seca
Masa seca total	23.725 ± 1.322
FDS	1.675 ± 0.078
FDI	16.140 ± 0.240
FDT	17.810 ± 0.250
Lignina	2.755 ± 0.177
Hemicelulosa	3.765 ± 0.346
Celulosa	8.550 ± 0.346

Fuente: Sema-Cock *et al.*, (2015)

Tabla 2. Composición mineral aproximada de cáscara de mango

Elemento	Composición mineral aproximada mg/ 100 g de cáscara seca
Calcio	60.63 ± 4.58
Zinc	0.66 ± 0.06
Hierro	12.79 ± 1.56
Manganeso	4.77 ± 0.22

Fuente: Romelle *et al.*, (2016)

2.2. PECTINA

2.2.1. DEFINICIÓN

La pectina es el principal componente enlazante de la pared celular de los vegetales y frutas. Químicamente, es un polisacárido compuesto de una cadena lineal de moléculas de ácido D-galacturónico, las que unidas constituyen el ácido poligalacturónico. La cadena principal que conforma la pectina puede contener regiones con muchas ramificaciones o cadenas laterales, denominadas “regiones densas”, y regiones con pocas cadenas laterales llamadas “regiones lisas” (Anthon & Barrett, 2006).

Atendiendo al tipo de modificación que sufre la cadena principal o esqueleto de la molécula, el término genérico pectina puede aplicarse a: protopectinas, ácido péctico, ácido pectínico y pectina (BeMiller, 1986). La protopectina es

insoluble en agua, mientras las otras tres sustancias son totalmente o parcialmente solubles en agua (Rosero & Posada, 2007).

La pectina tiene la propiedad de formar geles en medio ácido y en presencia de azúcares. Por este motivo, es utilizada en la industria alimentaria en combinación con los azúcares como un agente espesante, por ejemplo, en la fabricación de mermeladas y confituras. La mayor parte de las frutas contienen pectina, pero no en la cantidad suficiente para formar un gel cuando la mermelada es fabricada, por lo que una cierta cantidad de pectina se añade para mejorar la calidad de la misma, brindándole la consistencia deseada. Cuando la pectina es calentada junto con el azúcar se forma una red, que se endurecerá durante el enfriado. El grupo de frutas que contienen la suficiente cantidad de pectina para formar un gel es reducido; un ejemplo de ellas es el membrillo. Comercialmente, la pectina es fabricada a partir de la pulpa de la manzana y la naranja (Anthon & Barrett, 2006).

2.2.2. ESTRUCTURA

El componente más abundante de las pectinas es el ácido galacturónico, que forma el esqueleto principal de la molécula consistente en una cadena de residuos de ácido D-galacturónico unidos mediante enlaces α -1,4. Estos residuos pueden estar parcialmente metilados, esterificados en el C-6 con alcohol metílico, siendo el grado de metilación variable según el origen de la pectina. La pectina también contiene con frecuencia residuos de ramnosa, arabinosa y galactosa. Generalmente la ramnosa forma parte de la cadena principal, mientras que la arabinosa y la galactosa se encuentran en las cadenas laterales unidas a la cadena principal formando ramificaciones (Zykwinska et al., 2007).

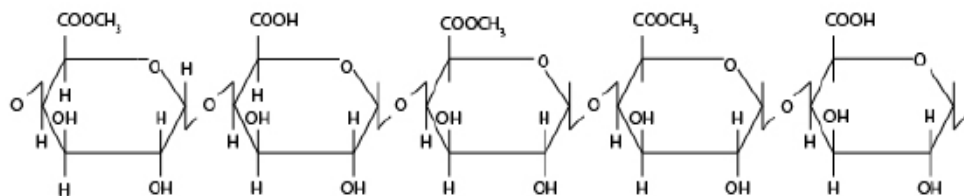


Figura 1. Estructura química de la pectina (Pawar, 2014).

Las pectinas son heteropolisacáridos complejos que contienen dos regiones definidas: La región lisa o homogalacturonano consiste en un esqueleto de residuos de ácido D –galacturónico unidos mediante enlaces (α - 1,4), los cuales pueden estar acetilados en el C-2 o en el C-3, o metilados en el C-6. La región rugosa o Ramnogalacturonano I es un heteropolímero en el que los residuos de ácido D-galacturónico del esqueleto están interrumpidos por residuos de L-ramnosa unidos por enlaces (α - 1,2), a los cuales pueden unirse largas cadenas de arabinano y galactano mediante el C-4 (De Vries & Visser, 2001).

El ramnogalacturonano II es un polisacárido de 30 unidades que contiene un esqueleto de ácido galacturónico, sustituido por 4 cadenas laterales que contienen ramnosa, arabinosa y azúcares poco comunes como apiosa y metilfucosa. Se desconoce si el ramnogalacturonano II está unido covalentemente a la cadena principal de pectina (Bhat, 2000).

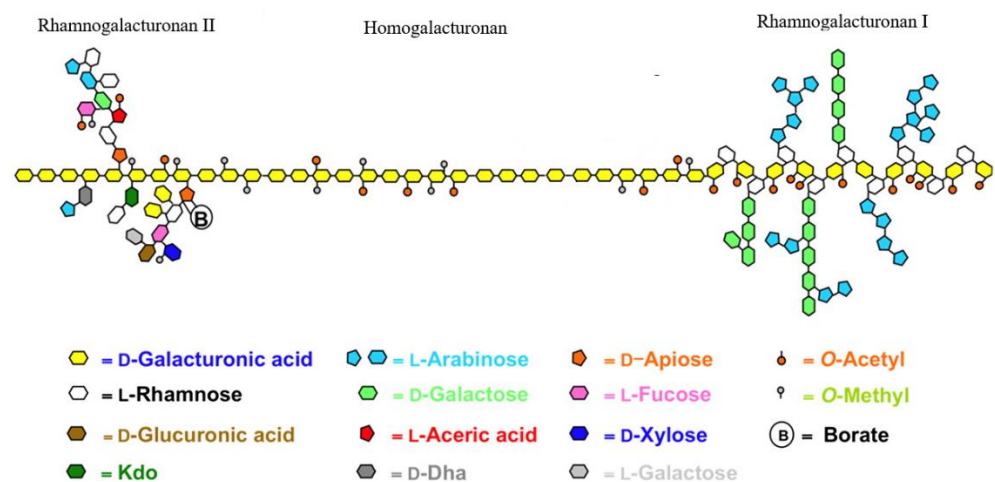


Figura 2. Estructura esquemática de la pectina (Harholt et al., 2010)

2.3. CELULOSA

2.3.1. Definición

La celulosa es el compuesto orgánico más abundante en la naturaleza, es un polímero lineal de celobiosa y posee variable peso molecular (Carreño et al., 2012).

La celulosa, es una molécula formada por unidades de glucosa unidas mediante enlaces β - 1,4. Este tipo de enlaces es la diferencia más clara con respecto al almidón, en que las moléculas de glucosa están unidas mediante enlaces α - 1,4. La diferencia de tipos de enlace y longitud de las cadenas determina que almidones y celulosas tengan propiedades tecnológicas y nutricionales distintas (Festucci-Buselli et al., 2007).

2.3.2. Estructura

La celulosa se conforma de β - glucosa mediante enlaces β - 1,4-O-glucosídico. La celulosa es una larga cadena polimérica de peso molecular variable, con fórmula empírica $(C_6H_{10}O_5)_n$, con un valor mínimo de $n= 200$ (Bhat, 2000).

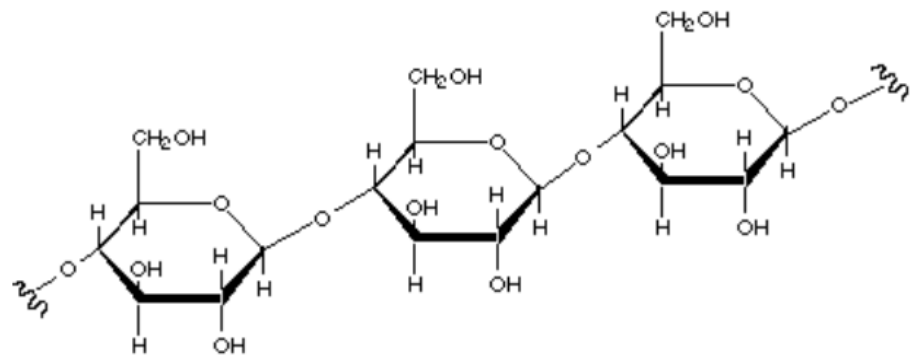


Figura 3. Estructura lineal de la celulosa, formada por varias unidades de β - glucosa (Festucci-Buselli et al., 2007).

La Figura 3 muestra la estructura lineal de la celulosa, en la que se establecen múltiples puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de distintas cadenas yuxtapuestas de glucosa, haciéndolas impenetrables al agua, lo que hace que sea insoluble en agua, y originando fibras compactas que constituyen la pared celular de las células vegetales (Bhat, 2000).

La celulosa es una microfibrilla fuertemente empaquetada de cadenas lineales de P-D-glucosa con enlaces (1,4). Debido a la configuración espacial alternante de los enlaces glucosídicos que unen residuos de glucosa adyacentes, se considera que la unidad de repetición en la celulosa es la celobiosa, un disacárido P-D-glucosa con enlaces (1,4). Las cadenas individuales de glucanos de celulosa están formadas por entre 2.000 y más de 25.000 residuos de glucosa. Cuando la Celulosa es degradada, primero se

degradan las regiones amorfas, lo que provoca la liberación de pequeños dominios cristalinos de la microfibrilla (Taiz & Zeiger, 2006).

2.4. ENZIMAS

2.4.1. DEFINICIÓN

Las enzimas son los catalizadores de procesos biológicos. Como cualquier otro catalizador, una enzima lleva la reacción catalizada a su posición de equilibrio más rápido de lo que ocurriría de otra manera (Aehle, 2007). En las células la actividad secuencial de muchas enzimas permite que las moléculas se degraden, o bien se formen moléculas de mayor tamaño a partir de moléculas sencillas. Desde el punto de vista químico, las enzimas son proteínas globulares, algunas de ellas con estructura cuaternaria. Para cumplir su función requieren conservar su estructura nativa en la que se destaca una región formada por un número reducido de residuos aminoacídicos que poseen afinidad por los compuestos que intervienen en la reacción, o también llamado sitio activo (Cunningham & Lopez, 1994).

El sitio activo tiene una forma determinada por el ordenamiento espacial de los - R que es única y que es reconocida por su sustrato. Esta es la base de otra de las características de las enzimas que es su especificidad. En el sitio activo los grupos - R están próximos debido a los plegamientos originados por las estructuras secundaria y terciaria, a pesar de que están alejados en la estructura primaria de la enzima. Estos - R participan en la reacción, algunos uniendo y orientando el sustrato y otros, formando o rompiendo enlaces (Brahmachari et al., 2017).

2.4.2. MECANISMOS DE ACCIÓN ENZIMÁTICA

Una enzima, por sí misma, no puede llevar a cabo una reacción, su función es modificar la velocidad de la reacción, entendiéndose como tal la cantidad de producto formado por unidad de tiempo. Tal variación se debe a la disminución de la energía de activación (E_a); en una reacción química, la E_a es la energía necesaria para convertir los reactivos en formas moleculares

inestables denominadas especies en estado de transición, que poseen mayor energía libre que los reactivos y los productos (Gacesa & Hubble, 1992).



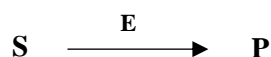
Figura 4. Representación gráfica del curso de una reacción enzimática

En la Figura 4 están representados los niveles de energía, durante el curso de la reacción, de moléculas intervinientes en una reacción tipo: $A + B \rightarrow C$. La curva azul muestra el curso de la reacción en ausencia de una enzima que facilite la reacción, mientras que la curva roja la muestra en presencia de la enzima específica de la reacción. La diferencia en el nivel de energía entre el estado inicial y la necesaria para iniciar la reacción (picos de las curvas) es la energía de activación. Tal como se observa la presencia de enzima baja la energía de activación. El complejo Enzima- sustrato posee menor energía de activación que las especies en estado de transición que la correspondiente reacción no catalizada (Aehle, 2007; Gacesa & Hubble, 1992).

Un fenómeno característico del mecanismo de acción enzimática es la orientación a los sustratos, es decir, parte de la energía de activación se utiliza para que los sustratos roten y se enfrenten con los átomos correctos para formar los enlaces. Agregan cargas a los sustratos: las cadenas laterales de los aminoácidos de las enzimas pueden participar directamente haciendo a los sustratos químicamente más reactivos (Brahmachari et al., 2017).

2.4.3. CINÉTICA ENZIMÁTICA

La cinética enzimática se ocupa de la velocidad de la reacción enzimática y de cómo se ve afectada por diversas condiciones químicas y físicas. Los estudios cinéticos de reacciones enzimáticas proporcionan información sobre el mecanismo básico de la reacción enzimática y otros parámetros que caracterizan las propiedades de la enzima. Las ecuaciones de velocidad desarrolladas a partir de los estudios cinéticos se pueden aplicar al calcular el tiempo de reacción, los rendimientos y las condiciones económicas óptimas, que son importantes en el diseño de un biorreactor eficaz (Dutta, 2008). Supongamos que un sustrato se convierte en un producto (P) con la ayuda de una enzima (E) en un reactor como:



Si se mide las concentraciones de sustrato y producto con respecto al tiempo, la concentración del producto aumentará y alcanzará un valor máximo, mientras que la concentración del sustrato disminuirá como se muestra en la Figura 5. La velocidad de reacción puede expresarse en términos del cambio del sustrato C_s o las concentraciones de producto C_p de la siguiente manera:

$$r_s = - \left(\frac{dC_s}{dt} \right) \quad (1)$$

$$r_s = - \left(\frac{dC_p}{dt} \right) \quad (2)$$

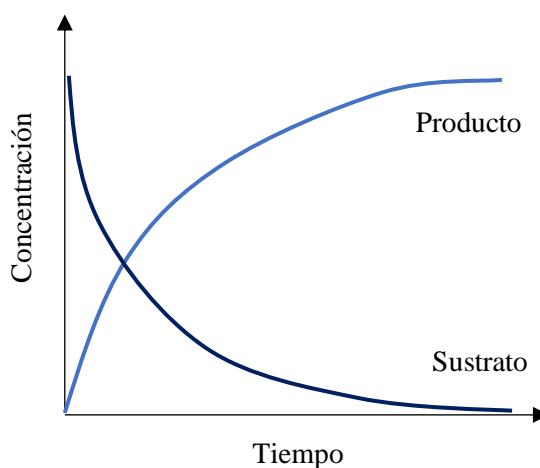


Figura 5. Cambio de las concentraciones de producto y sustrato con respecto al tiempo.

2.4.4. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Se define la unidad de actividad enzimática (UI), como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de un micromol de sustrato por min en condiciones de temperatura, pH y sustrato óptimo. Generalmente la actividad enzimática se mide como la variación que presenta con el tiempo alguna de las concentraciones o propiedades del sustrato o del producto referidas a la cantidad de enzima utilizada (Dutta, 2008).

2.4.5. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA VELOCIDAD DE LAS REACCIONES ENZIMÁTICAS

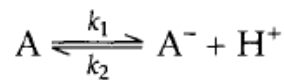
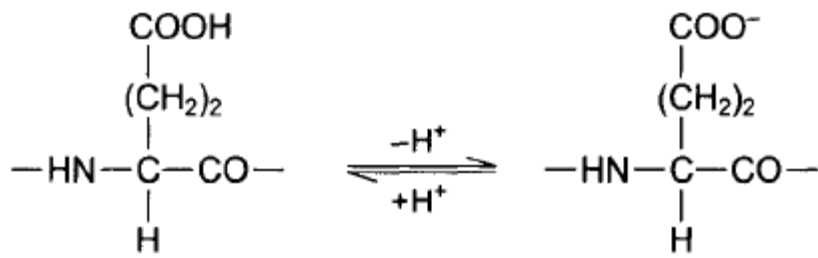
La velocidad de una reacción enzimática está influenciada por diversas condiciones químicas y físicas. Algunos de los factores importantes son la concentración de varios componentes (sustrato, producto, enzima, cofactor, etc.), pH, temperatura y cizallamiento (Dutta, 2008).

2.4.5.1. La temperatura

La velocidad de reacción de una enzima está fuertemente influenciada por el pH de la solución de reacción tanto in vivo como in vitro. La relación típica entre la velocidad de reacción y el pH muestra una curva en forma de campana. El pH óptimo es diferente para cada enzima. Por ejemplo, la pepsina del estómago tiene un pH óptimo entre 2 y 3.3, mientras que el pH óptimo de la amilasa, a partir de la saliva, es de 6.8. La quimotripsina, del páncreas, tiene un pH óptimo en la región ligeramente alcalina entre 7 y 8. La razón por la que la tasa de reacción enzimática está influenciada por el pH se puede explicar de la siguiente manera:

- Una enzima es una proteína que consiste en residuos de aminoácidos (es decir, aminoácidos menos agua).
- Los residuos de aminoácidos poseen grupos laterales básicos, neutros o ácidos que pueden cargarse positiva o negativamente a cualquier pH dado. Por ejemplo, se considera un aminoácido ácido, el ácido glutámico, que es ácido en el rango de pH más bajo (Dutta,

2008). A medida que el pH aumenta, el ácido glutámico se ioniza y se puede expresar como:



$$\frac{C_{A^-} \cdot C_{H^+}}{C_A} = \frac{k_1}{k_2} = K$$

Figura 6. Ionización del ácido glutámico frente a un cambio de pH

- Una enzima es catalíticamente activa cuando los residuos de aminoácidos en el sitio activo poseen cada uno una carga particular. Por lo tanto, la fracción de la enzima catalíticamente activa depende del pH (Macarulla & Goñi, 1994).

2.4.5.2. La temperatura

La dependencia de la temperatura de muchas reacciones catalizadas por enzimas se puede describir mediante la ecuación de Arrhenius. Un aumento en la temperatura aumenta la velocidad de reacción, ya que los átomos en la molécula de la enzima tienen "mayores energías y una mayor tendencia a moverse". Sin embargo, la temperatura está limitada al rango biológico habitual. A medida que la temperatura aumenta, los procesos de desnaturalización destruyen progresivamente la actividad de las moléculas de enzima. Esto se debe al despliegue de la cadena de proteína después de la ruptura de los enlaces débiles (por ejemplo, hidrógeno), de modo que la velocidad de reacción general disminuye. Para muchas proteínas, la desnaturalización comienza a ocurrir a una temperatura de 45 a 50 °C. Algunas enzimas son muy resistentes a la

desnaturalización por altas temperaturas, especialmente las enzimas aisladas de organismos termófilos que se encuentran en ciertos ambientes de mayor temperatura (Dutta, 2008).

2.4.6. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

La hidrólisis enzimática es un proceso en el que las enzimas mejoran la separación de enlaces entre las moléculas, con la adición de los elementos de agua (Campbell, 2005).

El proceso de hidrólisis se realiza por la acción de diferentes tipos de enzimas, ya sea de forma individual, como proteasas, lipasas, o en forma de complejos enzimáticos, es decir la acción sinérgica de un grupo de enzimas altamente específicas como pectinasas o celulasas, dando como resultado en ambos casos productos monoméricos como glucosa, xilosa, arabinosa, entre otros (Brahmachari et al., 2017)

Los costos de utilidad de este proceso de hidrólisis son bajos comparados con la hidrólisis ácida porque se realiza bajo condiciones medias (pH de 4.8 y temperatura de 40-50 °C) y no produce problemas de corrosión, a su vez en comparación con la hidrólisis con ácido diluido, la hidrólisis enzimática tiene la ventaja de que puede lograr altos rendimientos y eliminar la formación de subproductos inhibidores (A. Sluiter et al., 2006).

2.5. PECTINASAS

Las pectinasas son un grupo de enzimas que catalizan la degradación de sustancias pécticas a través de la despolimerización (hidrolasas y liasas) y la reacción de desesterificación (esterasas) (Pedrolli et al., 2009). De acuerdo con el modo de división y la especificidad, las enzimas pécticas se dividen en tres tipos principales: pectinesterasas (PE), enzimas despolimerizantes y de escisión (Tapre & Jain, 2014). En la Figura 7 son presentadas las estructuras de pectinasas sintetizadas por tres diferentes microorganismos.

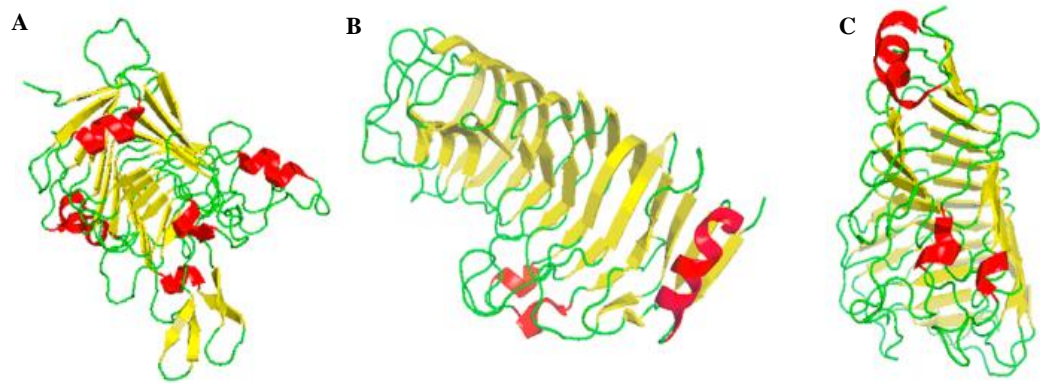


Figura 7. Estructura de pectinasas microbianas. A. Pectinesterasa de *E. chrysanthemi* (1 QJV), B. Poligalacturonasa (PG) DE *Aspergillus aculeatus* (1IA5), C. Endo- poligalacturonasa de *Fusarium moniliforme* (1HG8) (Brahmachari et al., 2017).

Las enzimas pécticas constituyen un grupo único de enzimas que catalizan la degradación de polímeros pécticos en las paredes celulares de las plantas. La despolimerización de la pectina generalmente se asocia con el proceso de maduración de la fruta. Por lo tanto, estas enzimas desempeñan un papel importante en los cambios que se producen en el almacenamiento pos-cosecha de frutas y verduras (D. W. S. Wong, 1995).

2.5.1. CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS PÉCTICAS

Las enzimas pécticas se pueden clasificar de forma general según su modo de acción (Pedrolli et al., 2009).

- Poligalacturonasa (PG): Cataliza la escisión hidrolítica de los enlaces α -1,4-glucosídicos. La exo-PG(exo-poli(1,4- α -D-galacturonido) galacturonohidrolasa, EC 3.2.1.67) escinde al extremo no reductor, y la endo-PG (endo-poli (1,4- α -D-galacturonido) glicanohidrolasa, EC 3.2.1.15) ataca el sustrato al azar.
- Pectinesterasa (PE) (pectina- pectilhidrolasa, EC 3.1.1.11): Cataliza la hidrólisis de los grupos éster metílico, dando como resultado la desesterificación de la pectina. La enzima actúa preferentemente sobre un grupo éster metílico de una unidad de galacturonato junto a una unidad de galacturonato no esterificado.

- Pectin- liasa (PNL): Cataliza la escisión de las unidades de galacturonato esterificado vía eliminación de enlaces β . Todas las PNL estudiadas son endoenzimas.

Actualmente se conocen un total de 13 grupos, entre las cuales están las protopectinasas, pectin metil esterasas (PME), pectin acetil esterasas (PAE), polimetilgalacturonasas (PMG), poligalacturonasas (PG), poligalacturonato liasas (PGL), pectin-liasas (PL), ramnogalacturonano ramnohidrolasas, ramnogalacturonano galacturonohidrolasas, ramnogalacturonano hidrolasas, ramnogalacturonano liasas, ramnogalacturonano acetilesterasas y xilogalacturonasa (Pedrolli et al., 2009).

2.5.2. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS PECTINASAS

Los modos de acción de las enzimas pécticas difieren según el grupo a las cuales pertenecen, ya sea Pectin esterasa, hidrolasas o liasas. Las PME o pectin metil esterasa (EC 3.1.1.11) cataliza la desesterificación del grupo metoxilo de pectina formando ácido péctico y metanol. La enzima actúa preferentemente sobre un grupo éster metílico de la unidad de galacturonato junto a una unidad de galacturonato no esterificado (Kashyap *et al.*, 2001). Las PAE o pectin acetil esterasas (EC 3.1.1) hidroliza el éster de acetilo de la pectina formando ácido péctico y acetato (Shevnik & Hugouvieux-Cotte, 1997).

Las poligalacturonasas (PG) cataliza la hidrólisis de enlaces α -1,4-glucosídicos en ácido poligalacturónico que produce d-galacturonato. Ambos grupos de enzimas hidrolasas (PMG y PG) pueden actuar en modo “endo” o “exo” (Tapre & Jain, 2014).

- Endo-PG: También conocido como poli (1,4- α -D-galacturonida) glicanohidrolasa, cataliza la hidrólisis aleatoria de enlaces α (1,4) - glicosídicos en ácido péctico.
- Exo-PG: también conocida como poli (1,4- α -D-galacturónido) galacturonohidrolasa, cataliza la hidrólisis de forma secuencial de enlaces α -1,4-glucosídicos en ácido péctico.

- Endo-PMG: provoca la segmentación aleatoria de los enlaces α (1,4) - glicosídicos de la pectina, siendo esta altamente esterificada.
- Exo-PMG: provoca la escisión secuencial del enlace glucosídico α - (1,4) de la pectina del extremo no reductor de la cadena de pectina.

Endo-PG (EC 3.2.1.15) y endo-PMG catalizan la escisión aleatoria del sustrato, mientras que exo-PG (EC 3.2.1.67) y exo-PMG catalizan la escisión hidrolítica en el extremo no reductor del sustrato produciendo monogalacturonato o digalacturonato en algunos casos (Kashyap et al., 2001)

Las pectin liasas (PL) o enzimas de escisión de enlaces α -(1,4) -glicosídicos por transeliminación, da como resultado un enlace insaturado entre C4 y C5 en el extremo no reductor del ácido galacturónico (Tapre & Jain, 2014).

Dentro de este grupo existen subgrupos dentro de las cuales destacan:

Polimetilgalacturonato liasas (PMGL). Las cuales catalizan la descomposición de la pectina por escisión trans-eliminativa. Pertenecen a este grupo las:

- Endo-PMGL: también conocida como poli (metoxigalacturonido) liasa, cataliza la escisión aleatoria de los enlaces α -1,4-glucosídicos en la pectina.
- Exo-PMGL: cataliza la descomposición gradual de la pectina por escisión trans-eliminativa.

Poligalacturonato liasas (PGL). Catalizan la escisión del enlace α -1,4-glucosídico en ácido péctico por transeliminación. También son de dos tipos:

- Endo-PGL: también conocida como poli (1,4- α -Dgalacturonide) liasa, cataliza la escisión aleatoria de los enlaces α -1,4-glucosídicos en el ácido péctico.
- Exo-PGL: también conocida como poli (1,4- α -D-galacturonida) exoliasa, cataliza la escisión secuencial de enlaces α -1,4-glicosídicos en ácido péctico.

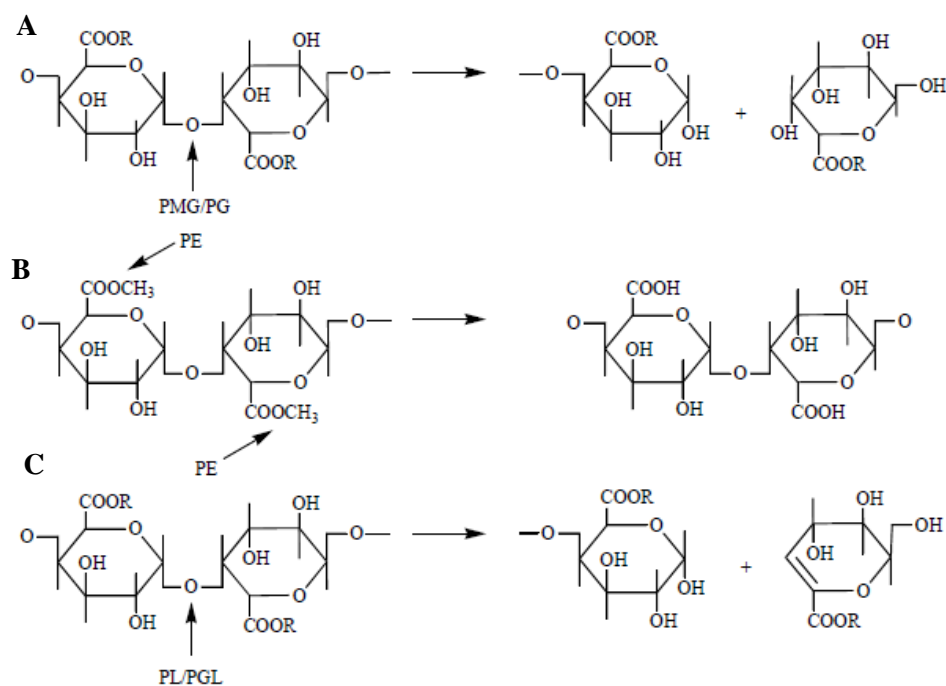


Figura 8. Modo de acción de las pectinasas: A. R = H para PG y CH₃ para PMG; B. PE; y C. R = H para PGL y CH₃ para PL. La flecha indica el lugar donde la pectinasa reacciona con las sustancias pécticas. PMG, polimetilgalacturonasas; PG, poligalacturonasas (EC 3.2.1.15); PE, pectinesterasa (EC 3.1.1.11); PL, pectina liasa (EC-4.2.2.10) (Pedrolli et al., 2009).

2.5.3. MICROORGANISMOS PECTINOLÍTICOS

Los microorganismos implicados en la síntesis de enzimas pectinolíticas son principalmente hongos y bacterias. Las enzimas más frecuentes son poligalacturonasas (PG), pectato liasas (PeL), pectina liasas (PL) y pectina metilesterasas (PME). La mayoría de las preparaciones de enzimas pectinolíticas comerciales se producen por fermentación con *Aspergillus spp.* y son mezclas de enzimas pectinolíticas. La degradación eficiente de polisacáridos en la industria alimentaria requiere interacciones cooperativas o sinérgicas entre estas enzimas responsables de dividir los diferentes enlaces en la estructura de la pectina (Dinu et al., 2007). En la Tabla 3 se muestran algunos ejemplos de microorganismos implicados en la síntesis de diferentes tipos de enzimas pectinolíticas, a pH y temperatura óptima.

Tabla 3. Microorganismos implicados en la síntesis de enzimas péctinolíticas.

Microorganismo fuente	Enzima	Óptimo pH	Temperatura óptima (°C)	Referencia
<i>Aspergillus carbonarius</i>	Endo-PG I	4.0	55	(Devi & Rao, 1996)
	Endo-PG II	4.1	50	
	Endo-PG III	4.3	55	
<i>Streptomyces lydicus</i>	Exo-PG	6.0	50	(Jacob et al., 2008)
<i>Aspergillus giganteus</i>	Exo-PG	6.0	55	(Pedrolli, 2008)
<i>Aspergillus kawakii</i>	Endo-PGI	4.5	50	(Contreras et al., 2004)
<i>Aspergillus niger</i>	PG	4.6	50	(Dinu et al., 2007)
<i>Bacillus</i> sp.	Exo-PG	7.0	60	(Kobayashi et al., 2001)
<i>Fusarium moliniforme</i>	Endo-PG I	4.8	45	(Niture & Pant, 2004)
	Endo-PG II	5.3	40	
<i>Mucor flavus</i>	Endo-PGL	3.5-5.5	45	(Gadre et al., 2003)
Pectinase CCM*	PG	4.0	50	(Ortega et al., 2004)
Pectinex 3XL*	PG	4.7	50	
<i>Penicillium frequentans</i>	Exo-PG I	3.9	50	(Barense et al., 2001)
	Exo-PG II	5.0	50	
	Exo-PG III	5.8	50	
Rapidase C80*	PG	4.0	55	(Ortega et al., 2004)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Endo-PG	4.5	45	(Saito et al., 2004)
<i>Teramoascus aurantiacus</i>	Endo-PG	5.5	60-65	(Martins et al., 2007)

*Enzima comercial

Fuente: Pedrolli *et al.*, (2009)

2.6. CELULASAS

Las celulasas son un grupo de enzimas que tienen la capacidad de hidrolizar los enlaces β -1,4-glucosídicos de la celulosa a productos de bajo peso molecular, que incluyen hexosas y pentosas (Singhania et al., 2013). Sin embargo, un sistema de enzimas celulósicas tiene una organización compleja, que consta de tres componentes principales: endo- β -glucanasas (EC 3.2.1.4), exo- β -glucanasas (EC 3.2.1.91) y β -glucosidasas (EC 3.2.1.21). El modo de acción de cada uno de estos es el siguiente:

- Endo- β -glucanasa, 1,4- β -D-glucano glucanohidrolasa, CMCase, trabaja en la escisión "aleatoria" de cadenas de celulosa que producen glucosa y celo-oligosacáridos.
- Exo- β -glucanasa, 1,4- β -D-glucano celobiohidrolasa, Avicelasa, actúa en el extremo no reductor de la celulosa con celobiosa como producto primario.
- β -glucosidasa, celobiasa: hidrólisis de celobiosa a glucosa.

Estas tres enzimas trabajan sinérgicamente para hidrolizar completamente el polímero de celulosa en sus monómeros de glucosa. Primero la endo- β -glucanasa actúa al azar, entre las fibras de celulosa para generar extremos reductores y no reductores, que son atacados posteriormente por exo- β -glucanasa, liberando celobiosa (dímeros de glucosa unidos por enlaces β -1,4-glicosídicos). Finalmente, la celobiosa es hidrolizada por β -glucosidasa en monómeros de glucosa, el producto final (Wong et al., 2016; Fariq, 2016). En la Figura 9, se muestra la representación esquemática de la acción de celulasas en el proceso de hidrólisis de celulosa

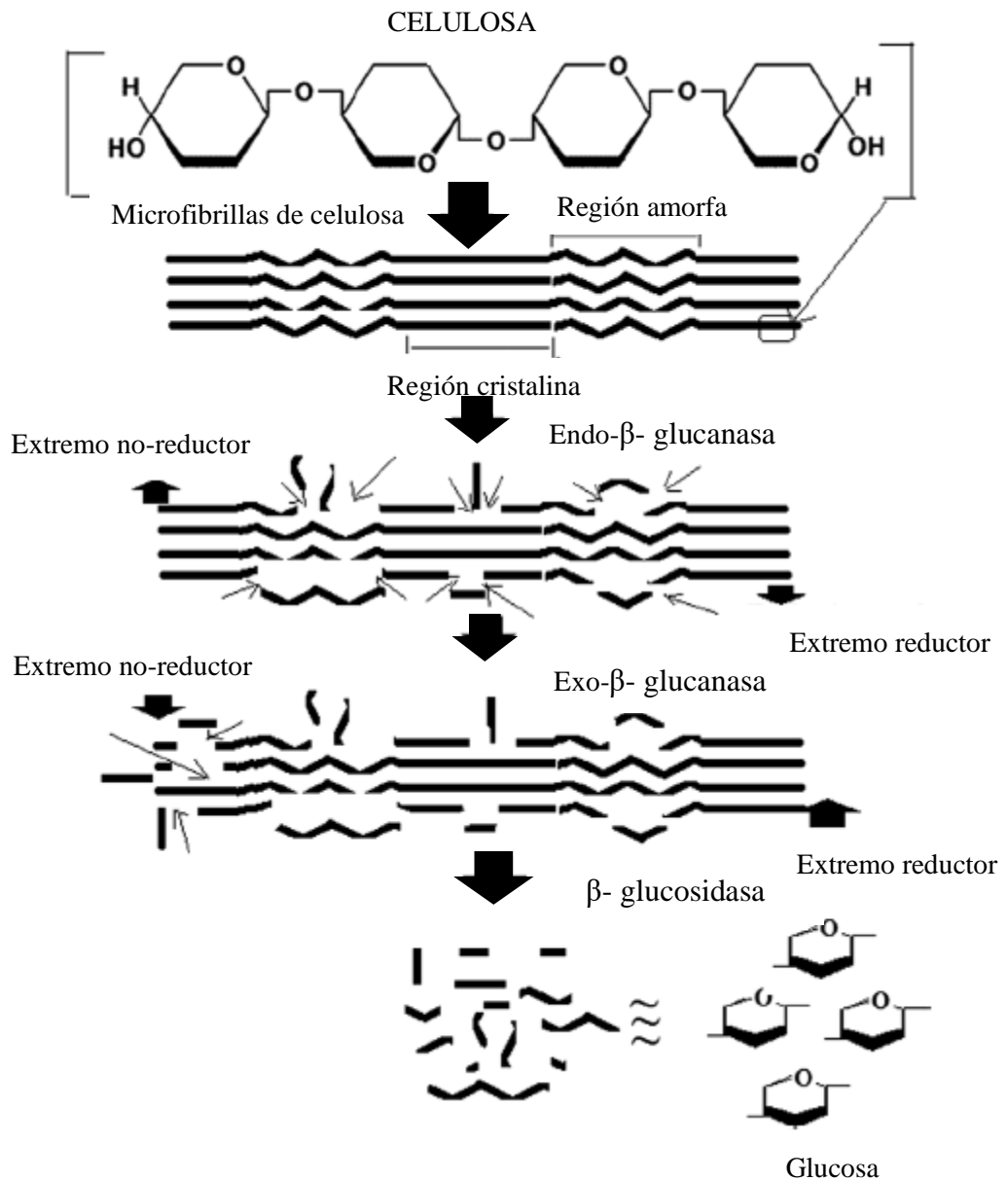


Figura 9. Representación esquemática de las etapas secuenciales en la acción de celulasas (Brahmachari et al., 2017).

2.6.1. MICROORGANISMOS CELULOLÍTICOS

Las celulasas son producidas por varios tipos de microorganismos, como hongos, bacterias y actinomicetos (Liu et al., 2012; Fariq, 2016).

Los microorganismos ofrecen una fuente barata de enzimas, ya que se pueden cultivar en una cantidad enorme en un corto período de tiempo y podrían ser suministros regulares de productos enzimáticos deseados. Además, las enzimas microbianas son mucho más estables en un amplio rango de condiciones ambientales adversas (Acharya & Chaudhary, 2012). Sin

embargo, existen diferentes factores que pueden limitar o mejorar la producción de celulasas. La producción de celulasas microbianas se puede lograr mediante el uso de sustratos baratos (Tabla 4), como residuos agrícolas que contienen residuos de celulosa, torta de almendra de palma (Alshelmani *et al.*, 2013), residuos de banano (Dabhi *et al.*, 2014), carboximetilcelulosa, etc.

Tabla 4. Producción de celulasas microbianas usando diferentes sustratos

Fuente microbiológica	Sustrato	Referencia
<i>Klebsiella sp.</i>	CMC, avicel, residuos agrícolas	(Waghmare <i>et al.</i> , 2014)
<i>Cellulomonas sp.</i> <i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	Cáscara de arroz y paja de arroz	(Lo <i>et al.</i> , 2009)
<i>Bacillus alcalophilus</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	CMC	(Abou-Taleb <i>et al.</i> , 2009)
<i>Aspergillus niger</i>	Mazorca de maíz	(Khan & Singh, 2011)
<i>Trichoderma harzianum</i>	CMC	(Iqbal <i>et al.</i> , 2010)
<i>Bacillus subtilis</i>	CMC	(Verma <i>et al.</i> , 2012)
<i>Cellulomonas sp.</i> <i>Bacillus spp.</i> <i>Micrococcus spp.</i>	Polvo de fibra de coco	(Immanuel <i>et al.</i> , 2006)
<i>Cellulomonas sp.</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>	CMC	(Yin <i>et al.</i> , 2010)
<i>Bacillus subtilis</i> <i>E. coli</i> <i>Serratia marcescens</i>	Glucosa	(Sethi <i>et al.</i> , 2013)
<i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus thuringiensis</i>	Vaina de <i>Acacia arabica</i>	(Patagundi <i>et al.</i> , 2014)
<i>Paenibacillus sp.</i>	CMC	(Maki <i>et al.</i> , 2011)
<i>Bacillus sp.</i>	Bagazo de caña de azúcar, licor de maíz	(Ladeira <i>et al.</i> , 2015)

Fuente: Fariq (2016)

2.7. FERMENTACIÓN

La fermentación es la técnica de conversión biológica de sustratos complejos en compuestos simples por varios microorganismos. Ha sido ampliamente utilizado para la producción de muchas enzimas microbianas (Aehle, 2007). Muchos trabajos se han enfocado en el “screening” de microorganismos productores de enzimas, optimizaciones fisiológicas para sustratos, fuente de carbono y fuente de nitrógeno, pH de los medios y la temperatura de cultivo durante el proceso de fermentación (Ellaiah et al., 2002; Juturu & Wu, 2012; Sundarram & Murthy, 2014).

2.7.1. FERMENTACIÓN EN SUSTRATO SÓLIDO

La FSS (Fermentación en sustrato sólido o también conocido como fermentación en estado sólido) se ha convertido en una tecnología potencial para la producción de complejos enzimáticos (Delabona et al., 2012; Coradi et al., 2013). FSS se refiere al proceso donde el crecimiento microbiano y la formación del producto ocurre en la superficie de los materiales sólidos. Este proceso implica la ausencia (o casi ausencia) de agua "libre"; sin embargo, la humedad se absorbe en el sustrato sólido para favorecer el crecimiento y el metabolismo microbiano (Ang et al., 2013; Pirota et al., 2014).

FSS es adecuado para la producción de enzimas mediante el uso de sustratos naturales, como residuos agrícolas, ya que imitan las condiciones en las que los hongos crecen de forma natural (Brahmachari et al., 2017).

Como la FSS implica relativamente poco líquido en comparación con FSm (Fermentación sumergida), el procesamiento posterior de la FSS es teóricamente más simple y menos costoso. Durante los últimos 10 años, se ha desarrollado un renovado interés en FSS debido, en parte, al reconocimiento de que muchos microorganismos, incluidos los organismos genéticamente modificados (OGM), los cuales pueden producir sus productos de manera más efectiva mediante FSS (Pandey et al., 2007). La FSS tiene tres ventajas principales: (1) alta productividad volumétrica, (2) concentración relativamente más alta de los productos, y (3) menos generación de efluentes, requerimiento de equipos simples de fermentación, etc. Además, la biosíntesis de enzimas microbianas en el proceso FSm es de importancia

económica porque se ve fuertemente afectada por las represiones catabólicas y de los productos finales (Liu et al., 2012).

2.7.2. FACTORES INFLUYENTES EN LA FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO

Al analizar los factores que pueden influir en la fermentación en estado sólido, es necesario tomar en cuenta los siguientes factores:

2.7.2.1. Temperatura

Los procesos biológicos se caracterizan por el hecho de que se desarrollan en un rango de temperatura relativamente muy estrecho. Los límites para altas temperaturas para el desarrollo se pueden encontrar en muchos casos a valores que no superan los 60-80 °C y con determinadas cepas, como máximo a 120 °C. La importancia de la temperatura en el desarrollo de un proceso biológico es tal que podría determinar efectos tan importantes como desnaturalización de proteínas, inhibición enzimática, promoción o inhibición en la producción de un metabolito particular, muerte celular, etc. La importancia de la temperatura en el crecimiento de microorganismos lleva a una clasificación teniendo en cuenta la temperatura o el rango de temperatura en el que el microorganismo crece (Pandey et al., 2007).

2.7.2.2. Humedad y Actividad de agua (A_w)

La humedad es un factor que está íntimamente relacionado con la definición de Fermentación en Sustrato Sólido (FSS) y con las características del material biológico. La importancia del agua en el sistema se debe al hecho de que la gran mayoría de las células viables se caracterizan por un contenido de humedad del 70-80%. A partir de esta simple observación, es fácil llegar a la conclusión sobre la necesidad de tener una cierta cantidad de agua disponible para la síntesis de nuevas células (Pandey et al., 2007).

En un sentido general, se ha establecido que, en el caso de las bacterias, la humedad de la matriz sólida debe ser superior al 70%. Para levaduras, el rango de humedad puede ser un poco ancho de 72 a 60% y en el caso de los hongos, el rango podría ser de 70 a 20%.

Esta certeza por sí misma podría significar una gran ventaja para el desarrollo de un proceso en FSS específico.

En cuanto a la Actividad del agua (A_w), es una medida de la disponibilidad de agua en un producto alimenticio. Los solutos disueltos en el agua unen las moléculas de agua y hacen que no estén disponibles para el uso de microorganismos. La actividad del agua se puede definir como la relación entre la presión de vapor del agua en los alimentos y la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura. Los microorganismos requieren un nivel mínimo de actividad de agua para crecer y, por lo tanto, la reducción de la actividad de agua se puede usar para controlar el crecimiento microbiano (Sancho-Madriz, 2003).

2.7.2.3. pH

El pH es uno de los otros factores más importantes para cualquier proceso de fermentación. Cada microorganismo posee un rango de pH para su crecimiento y actividad con un valor óptimo entre el rango. Un pH bajo evita el crecimiento de microorganismos parásitos que podrían estropear el material, el control del pH es uno de los problemas que aún no se han resuelto en los procesos de SSF. Este problema se debe a la falta de equipos y electrodos adecuados para determinar el pH en materiales sólidos y la existencia de gradientes de pH debido a las características heterogéneas del proceso (Pandey et al., 2007).

2.7.2.4. Aireación

Estos dos factores tienen generalmente una influencia determinante en la FSS debido a dos aspectos fundamentales:

- La demanda de O_2 en los procesos aeróbicos,
- Fenómenos de transporte de calor y masa en un sistema heterogéneo.

La demanda O_2 no presenta las dificultades desde el punto de vista fisiológico observado en la fermentación sumergida. No es necesario tener mecanismos físicos o químicos que permitan que el O_2 se disuelva previamente en una fase líquida antes de que pueda

emplearse para el proceso metabólico. En este sentido, la demanda O₂ en FSS se puede satisfacer con niveles de aireación relativamente bajos (Pandey et al., 2007).

2.7.2.5. Tamaño de partícula

El tamaño de partícula del sustrato tiene una importancia particular relacionada con la caracterización del sustrato y la capacidad del sistema para intercambiar una óptima transferencia de calor y masa con el crecimiento microbiano durante el proceso de FSS.

Cuando se trata de materiales naturales agroindustriales, generalmente el uso de un pre-tratamiento previo logra un ataque microbiano mejorado. La reducción en el tamaño de partícula a través de la molienda es uno de dichos pretratamientos, que proporciona una superficie mayor para el crecimiento microbiano. Sin embargo, debe subrayarse que el tamaño de partícula podría mostrar un rango óptimo. Una partícula muy pequeña podría producir una contracción o compactación de la matriz, mejorar los problemas de canalización, aumentar los problemas de transferencia de masa y calor, etc (Pandey et al., 2007).

2.7.3. *Aspergillus niger*

Aspergillus niger es un hongo filamentoso y una de las especies más comunes del género *Aspergillus*, es importante en la micología alimentaria y médica, así como en la biotecnología. Esta especie se caracteriza por presentar conidios esféricos negros, con colonias negras. *A. niger* está incluido en el subgénero *Circumdati*, sección *Nigri*. La sección *Nigri* incluye 15 especies de esporas negras relacionadas que pueden confundirse con *A. niger*, incluidos *A. tubingensis*, *A. foetidus*, *A. carbonarius* y *A. awamori* (Noonim et al., 2008). La clasificación de *Aspergillus niger* se basa principalmente en cuatro aspectos: (1) presencia de teleomorfo y sus características, (2) presencia o ausencia de metula, (3) disposición de metula o fialidas de vesículas, y (4) colores de colonias. En especies sin teleomorfos, los colores de las colonias están dominados por el color de los conidios. Estos colores se asocian consistentemente con especies determinadas. Los estudios moleculares han

demostrado que *A. niger* está compuesto por dos especies, *A. niger* y *Aspergillus tubingensis*, separadas por polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) (Kusters-van Someren *et al.*, 1991) y ADN análisis de secuencia (Arora, 2003). Por otro lado, *Aspergillus niger* es la especie fúngica más comúnmente utilizada para la producción industrial de enzimas pectinolíticas y celulolíticas, vía fermentación en sustrato sólido (Siddiqui *et al.*, 2012).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MÉTODO DE ESTUDIO

La presente investigación es de tipo aplicativo.

3.2. LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO

El presente trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Investigación de la Escuela Académico Profesional de Biotecnología en la Universidad Nacional del Santa, en conjunto con los Laboratorios de Análisis de Control de Calidad de la empresa de Servicio Manufactura y Acabado S.A.C, Ate, Lima, Perú.

3.3. MATERIAL DE ESTUDIO

3.3.1. BIOLÓGICO

Cepa de *Aspergillus niger* ATCC 9642: Donado por el Laboratorio de Biotecnología marina del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Baja California, México. (Figura 10)

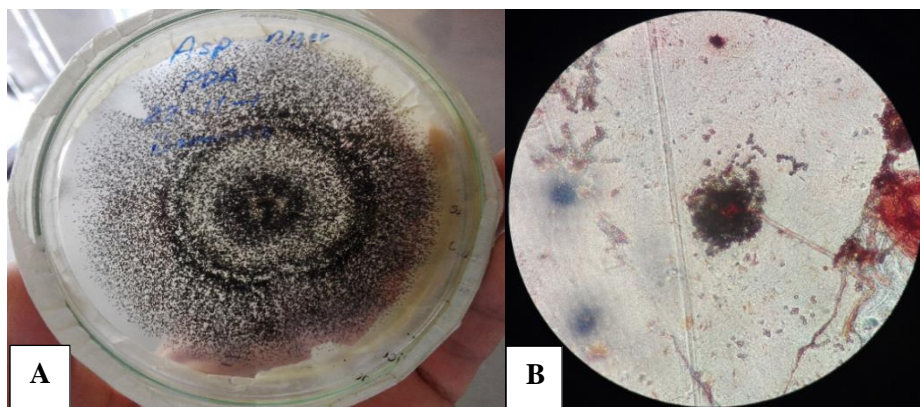


Figura 10. Cepa fúngica de *Aspergillus niger* ATCC 9642 en agar papa dextrosa (PDA); B. Vista microscópica del conidióforo de *A. niger* a 100 X, con tinción Safranina.

Cáscaras de mango de la variedad Kent: Donado por la Empresa Inversiones Frigoríficas PRC S.A.- Santa, Ancash-Perú. En la Figura 11 se muestra la representación visual de las cáscaras de mango.



Figura 11. Cáscara de mango sin tratamiento utilizadas en la experimentación

3.4. MÉTODOS

3.4.1. DESCRIPCIÓN DE LA MATERIA PRIMA

La cáscara de mango de la variedad Kent fue recolectada de los residuos agroindustriales generados por la empresa “Inversiones Frigoríficas PRC S.A.” ubicada en la ciudad de Santa, Perú; teniendo en cuenta la ausencia de hongos u otro factor que pueda alterar el proceso enzimático.

3.4.2. ANÁLISIS QUÍMICO DE LA MATERIA PRIMA

Se llevó a cabo el análisis químico de la cáscara de mango iniciando por la determinación de la humedad. Luego se realizó un proceso de adecuación de la materia prima especificado en el punto 3.4.3, obteniéndose cáscara de mango seca y estandarizada al tamaño de partícula mencionado. A esta cáscara de mango en polvo se le realizó de la misma forma un análisis químico para la determinación de la humedad, proteína, cenizas, grasa, fibra dietética total, y carbohidratos. Fue realizado también, el análisis de la composición en fibra, siendo determinados el contenido en pectina, lignina, Holocelulosa, celulosa, hemicelulosa y almidón.

a. Determinación del contenido de humedad

La cálculo del porcentaje de humedad fue realizada según el Método AOAC 930.15 - 1990.

b. Determinación del contenido de ceniza

El cálculo del porcentaje de ceniza se realizó según el Método AOAC 942.05 - 1990.

c. Determinación de proteína

El porcentaje de proteína fue analizado mediante el método Kjeldahl (AOAC 988.05).

d. Determinación de grasa

La determinación de grasa se realizó utilizando el Método de Soxhlet, según A.O.A.C. (1994)

e. Determinación de Fibra

Los análisis individuales de la Fibra, correspondientes a los contenidos de pectina, lignina, holocelulosa, hemicelulosa y celulosa son especificados a continuación.

Determinación del contenido de Pectina (Método descrito por Girma & Worku, 2016)

Procedimiento

Se pesa 3 g de cáscara de mango seca y molida y se coloca en un matraz de 125 mL, posteriormente se añade agua destilada en una proporción de 1:40 (p/v) ajustando el pH a 2.0 con H₂SO₄ 1 M. Se incuba a 82 °C durante 105 minutos en un baño de agua con agitación.

Posterior al periodo de incubación, la suspensión se filtra en papel filtro whatman N° 42 a 80°C para retirar residuos insolubles. Se añade a la solución filtrada etanol 96° en un volumen 1:1 (v/v) y se deja en reposo durante 3 horas. La pectina coagulada se separa por filtración y se lava con etanol al 70%. Posteriormente se seca a 35°C en un horno de aire caliente durante 8 horas. El contenido porcentual de pectina se calcula usando la Ecuación 3:

$$\% Pectina = \frac{(P_m - P_f)}{B} * 100 \quad (3)$$

Donde:

P_m : Peso final de la muestra.

P_f : Peso de papel filtro.

B : Peso inicial de la muestra.

Determinación del contenido de Lignina (Método Klason, Sluiter et al., 2006)

Procedimiento

La determinación del contenido de lignina insoluble fue llevada a cabo a cabo mediante el método Klason (Sluiter *et al.*, 2008). Aproximadamente 3 g de muestra seca fue sometida a maceración (en mortero) con 15.0 mL de H₂SO₄ a 72% (m/v), hasta obtener un máximo de desfibrilación, por 2 h a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla fue transferida a un matraz de 1.0 L, completando el volumen hasta 0.575 L con agua destilada para la concentración final de H₂SO₄ a 3% (p/v). El matraz fue sellado y autoclavado a 121 °C por 1 h. Después del proceso de autoclavado, el hidrolizado fue filtrado utilizando papel filtro Whatman N° 4 para la retención de la lignina Klason insoluble. El material retenido en el embudo fue secado en estufa a 105 °C por 4 h, para luego ser enfriado en desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente y pesada. El contenido de lignina insoluble fue determinado por la Ecuación 4:

$$Lki (\%) = ((m_{ki} - m_{fs})/m_a) * 100 \quad (4)$$

Donde:

Lki = Lignina Klason insoluble.

mfs = Masa del papel filtro seco.

mki= Masa del papel filtro sumada a la masa de lignina después del secado en estufa.

ma = Masa de la muestra.

Determinación del contenido de Holocelulosa (Técnica descrita por Browning 1967)

Procedimiento

Se pesa 2.5 g de muestra seca y se deposita en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Se adiciona 80 mL de agua destilada caliente, 0.5 mL de

ácido acético glacial y 1 g de clorito de sodio (NaClO_2). Se sella el matraz con papel aluminio y se calienta en baño maría a 70°C durante 60 minutos. Posteriormente se repite la adición de ácido acético y clorito de sodio cada una hora, manteniendo la mezcla en baño de agua caliente y agitación constante. Tras 4 horas de adición de reactivos se deja reposar durante dos horas y luego se deja enfriar la mezcla. Se filtra en papel filtro Whatman N° 24 de peso conocido y se lava los sólidos con agua destilada hasta eliminar la coloración amarilla y el olor a cloro. Se lava una última vez con acetona y se seca en un horno a 105°C durante 24 horas. El contenido de holocelulosa se determina mediante la Ecuación 5:

$$\% \text{ holocelulosa} = \frac{P_2 - P_1}{P_3} * 100 \quad (5)$$

Donde:

P1 : Peso del papel filtro.

P2 : Peso de los sólidos secos.

P3 : Peso inicial de la muestra.

Determinación del contenido de Celulosa (Técnica descrita por Rowell, 2012)

Procedimiento

Se pesa 1 g de holocelulosa (P1), con precisión de 0.0001 g, en un matraz Erlenmeyer de 100 mL. Se añade 5 mL de NaOH 17.5% (p/v) mezclando con una varilla de vidrio. Cada 5 minutos se añaden 2.5 mL de NaOH 17.5% hasta consumir un total de 12,5 mL y se deja reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añade 16.5 mL de agua destilada a 20°C para diluir el NaOH a 8.3% (p/v), luego se mezcla bien y se deja reposar durante 60 minutos.

Posteriormente se filtra en papel filtrante de peso conocido (P2) y se lava con 50 mL de NaOH 8,3% y luego con agua desionizada. Se repite el lavado con NaOH 8.3% y agua destilada dos veces. Se corta la succión y se añade 7.5 mL de ácido acético 10% (p/v) y se deja reposar durante 3 minutos. Se conecta el vacío y se lava con agua destilada hasta

neutralidad del filtrado, el pH se medirá con bandas de pH. Se seca a 105 °C en estufa durante 12 horas y se pesa (P3). El contenido porcentual de celulosa en base seca se calcula mediante la Ecuación 6:

$$\% \text{ Celulosa} = \frac{(P_3 - P_2)}{P_1} * 100 \quad (6)$$

P₁ : Peso inicial de la muestra

P₂ : Peso papel filtro

P₃ : Peso sólido después de secar 12 horas

Determinación del contenido de Hemicelulosa

La hemicelulosa es contabilizada por la diferencia entre los porcentajes de holocelulosa y celulosa mediante la Ecuación 7:

$$\% \text{ hemicelulosa} = \% \text{ holocelulosa} - \% \text{ celulosa} \quad (7)$$

f. Determinación del contenido de almidón

Se determinó el contenido de almidón según el método descrito por Holm et al., (1986), presentando algunas modificaciones:

Se pesó 250 mg de la muestra de cáscara de mango seca y colocó en un tubo de centrifuga de 50 ml. Se añadió 15 ml de agua destilada y con ellos la enzima *Termamyl 120 L* a una cantidad de 100 µl. Luego se mezcló la suspensión en un agitador magnético. Se colocó el tubo de centrifuga en un baño de agua en ebullición y se homogenizó durante 5 minutos. Se dejó en reposo la muestra a temperatura ambiente y se transfirió la muestra a un balón volumétrico de 25 mL enrasando con agua destilada hasta llegar a este volumen.

La segunda acción enzimática se realizó utilizando un tubo de ensayo. Se transfirió 1 mL de la muestra y se añadió buffer acetato de sodio a pH 4.75 a 0.1 M. Luego se agregó 50 µl de enzima amilogucosidasa y se incubó la muestra a 60°C por 30 min. Seguido a ello, se transfirió la suspensión a un balón volumétrico de 100 mL y se enrasó con agua destilada hasta llegar a este volumen.

Como parte final, se transfirió 1 mL de la suspensión detallada anteriormente sobre un tubo de centrifuga y se le añadió 1 mL de agua destilada, 4 mL de reactivo glucosa oxidasa/peroxidasa a la muestra,

réplicas y al blanco a la misma proporción, se incubó a 37 °C por 60 minutos, homogenizando cada 30 minutos. La muestra fue centrifugada a 3000 g durante 10 min. Y se leyó la absorbancia en un rango de 450 nm de longitud de onda. La siguiente fórmula permitió calcular el porcentaje de almidón en la muestra:

$$\%Almidón = \frac{mg \text{ de glucosa} * 10^{-3} * F * 100 * C}{Peso \text{ de la muestra (mg)}} * 100 \quad (8)$$

F: Factor de dilución

C: Factor de corrección de conversión de glucano a glucosa = 0.9

g. Determinación de azúcares

Se determina por la diferencia entre los componentes principales en fibra, grasa, proteína, cenizas y humedad de la muestra.

$$\%Azúcares = 100\% - (\%Humedad + \%Proteínas + \%Grasas + \%Cenizas + \%Fibra + \%Almidón) \quad (9)$$

3.4.3. PRETRATAMIENTO DE LA CÁSCARA DE MANGO

Para aumentar la biodisponibilidad de las estructuras celulósicas en las fermentaciones sólidas, se realizó un tratamiento hidrotérmico a las cáscaras de mango, la metodología utilizada fue adaptada de Mostafa *et al.*, (2013). Las cáscaras de mango se cortaron en un tamaño uniforme de aproximadamente 10 cm, para luego ser colocadas en una estufa de secado a 70 °C durante 24 h. Para aumentar el área de acción enzimática, las fibras de cáscaras de mango secas fueron trituradas en un molino de cuchillas y tamizadas en un tamiz N° 60, hasta lograr un tamaño de partículas de 250 µm. Luego de ello, en un matraz Erlenmeyer de 250 mL se colocó la suspensión de cáscara de mango seca con agua destilada en una proporción de 1:20 (p:v) a 100°C durante 30 min. El experimento control consistió en la suspensión de cáscara de mango sin pretratamiento por ebullición, puesta a temperatura ambiente por 24 h. Los porcentajes en masa seca de lignina, celulosa, hemicelulosa y pectina fueron estimadas antes y después del tratamiento hidrotérmico siguiendo los procedimientos citados en el punto 3.4.2.

3.4.4. OBTENCIÓN Y MANTENCIÓN DE CEPA DE *Aspergillus niger*

La cepa de *Aspergillus niger* ATCC 9642 fue donada por el Laboratorio de Biotecnología marina del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Baja California, México. Se mantuvo sembrada en placas con medio agar papa dextrosa (PDA), con periodo de incubación de 72 horas a 30°C. Posteriormente fue llevada a refrigeración a 4° C y se subcultivó periódicamente.

3.4.5. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó un Diseño factorial Central Compuesto con tres variables independientes: pH, tiempo de fermentación y porcentaje de humedad (v/p) del medio; en respuesta a tres variables dependientes: actividad endoglucanasa (CMCasa), actividad celulasa total (papel filtro) y actividad pectinasa, expresadas en unidades de actividad enzimática por gramo de material seco (U/g). En la Tabla 5 se muestran los valores mínimos y máximos de las variables independientes, pH inicial, tiempo de fermentación (h) y porcentaje de humedad del medio (v/p), que se utilizaron en la experimentación.

Tabla 5. Matriz de variables independientes utilizadas en el modelo Experimental DCCR

Variables	Rangos				
	- α	-1	0	+1	+ α
Tiempo (h)	32	48	72	96	112
pH inicial	1.6	3	5	7	8.4
Humedad del medio (% v/p)	43	50	60	70	77

Fuente: Propio autor.

Los experimentos fueron llevados a cabo mediante el plan experimental establecido en la Tabla 6. Realizándose un planeamiento 2³, incluidos seis puntos axiales, ocho factoriales y cuatro puntos centrales, se obtuvo un número total de 18 unidades experimentales que fueron llevadas a cabo por triplicado.

Tabla 6. Diseño experimental según DCCR para las variables pH inicial, tiempo y porcentaje de humedad del medio.

Exp.	Código			Valores reales			Respuestas		
	X1	X2	X3	t (h)	pH	H (%)	CMCasa (U/g)	Celulasa total (U/g)	Pectinasa (U/g)
1	-1	-1	-1	48	3	50	--	--	--
2	-1	-1	1	48	3	70	--	--	--
3	-1	1	-1	48	7	50	--	--	--
4	-1	1	1	48	7	70	--	--	--
5	1	-1	-1	96	3	50	--	--	--
6	1	-1	1	96	3	70	--	--	--
7	1	1	-1	96	7	50	--	--	--
8	1	1	1	96	7	70	--	--	--
9	-1.682	0	0	32	5	60	--	--	--
10	1.682	0	0	112	5	60	--	--	--
11	0	-1.682	0	72	2	60	--	--	--
12	0	1.682	0	72	8	60	--	--	--
13	0	0	-1.682	72	5	43	--	--	--
14	0	0	1.682	72	5	77	--	--	--
15	0	0	0	72	5	60	--	--	--
16	0	0	0	72	5	60	--	--	--
17	0	0	0	72	5	60	--	--	--
18	0	0	0	72	5	60	--	--	--

Fuente: Propio autor.

3.4.6. CONDICIONES DE FERMENTACIÓN

3.4.6.1. Preparación e inóculo de *Aspergillus niger*

La cepa se sembró en tubos inclinados con medio PDA (agar papa dextrosa) e incubados durante 5 días a 30°C para desarrollar esporas. Posteriormente se añadió 10 mL de solución salina estéril 0.5% (p/v) y

se contabilizó la concentración con cámara de Neubauer para obtener un inóculo de 10^6 - 10^7 esporas/mL.

3.4.6.2. Medio de cultivo

Los medios de cultivos para la fermentación en sustrato sólido fueron preparados en matraces de 125 mL añadiendo 5 g de cáscara de mango seca como fase sólida (Anexo 4), la cual fue integrada con medio de cultivo salino suplementado con 1% (p/v) de extracto de levadura (Gao *et al.*, 2008), para optimizar la producción enzimática. La composición del medio salino se muestra en la Tabla 7. Ambos componentes, cáscara de mango y medio líquido salino, fueron previamente esterilizados por separado a 121°C durante 15 minutos.

Tabla 7. Medio salino suplementado en los experimentos de fermentación en sustrato sólido.

Componente	Concentración (g/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.5
KH ₂ PO ₄	3
MgSO ₄	0.5
CaCl ₂	0.5
Extracto de levadura	10

Fuente: Gao *et al.*, (2018).

De acuerdo al diseño experimental, se ajustaron los valores de pH inicial con buffer citrato en el medio líquido, mientras que la humedad del medio en sustrato sólido sufrió variaciones en función de los distintos volúmenes de medio líquido que fueron integrados a la fase sólida (cáscara de mango seca).

Por otro lado, los medios de cultivo fueron inoculados con 0.5 mL de inóculo de 10^7 esporas/mL, el volumen del inóculo fue considerado en la humedad final del medio de fermentación y fue descontado del volumen de medio a suplementar. Los matraces fueron sellados con algodón hidrofóbico para evitar la pérdida de humedad y fueron incubados de manera estática a 30°C durante un periodo de 96 horas.

3.4.7. ANÁLISIS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Posterior al periodo de fermentación, se obtuvieron extractos enzimáticos para los ensayos de actividad exopoligalacturonasa (pectinolítica), endoglucanasa (carboximetilcelulasa CMCasa) y celulasa total (PFasa), las cuales fueron expresadas en unidad de actividad enzimática por gramo de cáscara de mango seca del medio (U/g).

3.4.7.1. Obtención del extracto enzimático

Completado el tiempo de fermentación se añadió al medio fermentativo, buffer citrato 5 mM pH=5.0, en una relación de sólido/líquido de 1:10 con respecto al contenido de cáscara de mango seca, posteriormente se suspendió y se incubó a agitación de 250 rpm durante 30 minutos en un baño maría a 30 °C. El extracto enzimático se separó de la parte sólida (cáscara de mango y micelio) mediante filtración sobre una gasa y consecutivamente se centrifugó a 10 000 rpm refrigeradamente durante 15 minutos (Mamma *et al.*, 2008).

3.4.7.2. Análisis de actividad celulasa

La actividad endoglucanasa (CMCasa) y celulasa total (PFasa) fueron evaluadas mediante el método de espectrofotometría con reactivo ácido 3,5-dinitrosalicílico (Miller, 1959) para determinar azúcares reductores, aplicando la metodología utilizada por Ghose, (1987). La curva de calibrado fue realizada previamente con soluciones de glucosa (Anexo 2). Para la actividad endoglucanasa (Endo-1,4-beta-D-glucanasa o carboximetilcelulasa, EC 3.2.1.4) se preparó una solución de CMC al 2% (p/v) en buffer citrato 0.05 M (pH=5.0). Posteriormente se realizó una mezcla de reacción que contuvo 0.5 mL de solución de CMC y 0.5 mL de extracto enzimático, la muestra fue incubada a 50°C durante 30 minutos para la reacción enzimática.

Para la determinación de actividad celulasa total (PFasa) se realizó una mezcla de reacción la cual contuvo 1 mL de una suspensión de buffer citrato 0.05 M (pH=5.0) con una tira de papel filtro (Whatman N° 1, 1.0 x 6.0 cm \approx 50 mg) y 0.5 mL de extracto enzimático. La muestra fue incubada a 50°C durante 60 minutos para la reacción enzimática.

El control negativo consistió de un experimento utilizando extracto enzimático inactivado por ebullición a 100°C durante 15 minutos. Posterior al periodo de incubación, en ambos casos, se aplicó el método de determinación de azúcares reductores por espectrofotometría utilizando el reactivo DNS, la lectura de absorbancia fue realizada a una longitud de onda de 540 nm. Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μmol de glucosa por minuto bajo las condiciones experimentales establecidas.

3.4.7.3. Análisis de actividad pectinasa

La actividad poligalacturonasa fue evaluada mediante el método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (Miller, 1959), para determinar azúcares reductores liberados tras la reacción enzimática, aplicando la metodología utilizada por (Rodríguez-Fernández *et al.*, 2011). La curva de calibrado fue realizada previamente con soluciones de ácido D-galacturónico monohidratado (Anexo 3).

Se preparó una solución de pectina 0.5% (p/v) en buffer citrato 0.05 M (pH=5.0). Posteriormente se realizó una mezcla de reacción la cual contuvo 4.5 mL de solución de pectina y 0.5 mL de extracto enzimático diluido, se incubó a 50°C durante 15 minutos para la reacción enzimática. El control negativo consistió de un experimento utilizando extracto enzimático inactivado por ebullición a 100°C durante 10 minutos.

Posterior al periodo de incubación se llevó a cabo el método DNS y se realizó la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 540 nm. Una unidad de actividad poligalacturonasa fue definida como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μmol de ácido D-galacturónico por minuto bajo las condiciones experimentales establecidas.

3.4.8. APLICACIÓN DEL COMPLEJO ENZIMÁTICO

El complejo enzimático producido por *Aspergillus niger*, de alta actividad celulasa y pectinasa, fue aplicado en la hidrólisis enzimática de residuos de cáscara de mango.

3.4.8.1. Pretratamiento de la materia prima

La primera parte dentro del marco de la liberación de azúcares del material en estudio se encuentra el tratamiento hidrotérmico de las cáscaras de mango, el cual fue llevado a cabo según lo mencionado en el ítem 3.4.3.

Se obtuvo muestras de la suspensión sin tratamiento hidrotérmico y con tratamiento, y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se usó para el análisis de azúcares reductores totales por el método DNS y azúcares monoméricos por HPLC.

3.4.8.2. Sacarificación enzimática de materia prima

La sacarificación enzimática de la cáscara de mango pre-tratada fue llevada a cabo mediante el método modificado de Phuengjayaem & Teeradakorn, (2011). A 50 mL de cáscara de mango pre-tratada 5% (p/v), se le adicionó solución de extracto enzimático en tampón citrato 0.05 M (pectinasa 101.02 U/g, CMCasa 6.28 U/g y FPasa 3.21 U/g), pH=5.0. Se evitó la contaminación microbiana mediante la adición de azida de sodio (0,01 mg/ml). La mezcla fue incubada a 50°C con agitación de 150 rpm durante 14 h.

Se obtuvieron muestras de la reacción enzimática cada 2 h, las muestras se sometieron a shock térmico para la inactivación enzimática, se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 minutos y se almacenó el sobrenadante a -4°C para ser posteriormente analizado mediante método DNS (Miller, 1959) para cuantificación de azúcares reductores totales y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para determinar las concentraciones de azúcares monoméricos mediante método estandarizado para glucosa, xilosa y arabinosa (A. Sluiter et al., 2008). El rendimiento de sacarificación fue calculado en base a la cantidad en gramos resultante de azúcares (glucosa, xilosa y arabinosa) respecto a los gramos de sustrato seco usados en la sacarificación. Por otro lado, según Targonski (1985), el porcentaje de conversión de

azúcares (PC) puede ser calculado respecto a los carbohidratos totales presentes en la muestra, siguiendo la fórmula:

$$PC (\%) = \frac{\text{Azúcar liberado} \cdot 0.9}{\text{Carbohidratos totales en sustrato}} * 100 \quad (10)$$

Los valores de azúcar liberado y de carbohidrato total en la muestra serán expresados en mg. El valor de 0,9 representa el factor de equivalencia de los azúcares reductores liberados respecto a un polisacárido, es decir, es el factor de corrección para compensar la adición de una molécula de agua durante la hidrólisis (Targonski, 1985).

3.4.9. ANALISIS ESTADISTICOS

Los datos obtenidos en los ensayos enzimáticos en respuesta al diseño experimental se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) y serán analizados mediante la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) en software STATISTICA v10.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE LA CÁSCARA DE MANGO

En la Tabla 8 presenta la composición química de las cáscaras de mango en base seca, los cálculos realizados son expresados en el Anexo 1.

Tabla 8. Composición Química de la cáscara de mango variedad Kentt en porcentual en base seca.

Componente	%BS (base seca)
Proteína	2.34
Fibra total	47.7
Celulosa	18.73
Hemicelulosa	8.44
Lignina	10.02
Pectina	10.51
Almidón	6.34
Cenizas	2.50
Humedad	7.58
Azúcares	30.97
Grasa	2.57

Fuente: Propio autor.

La composición porcentual en base seca de las cascaras de mango reveló ser una importante fuente de sustancias orgánicas, como carbohidratos, fibras y pectinas. El mayor constituyente de la cáscara fue la humedad, que corresponde un 74.72 %. Valores semejantes pueden ser encontrados en la mayoría de cáscaras que presentan textura semejante, como la palta, que presenta aproximadamente 76.95 % de humedad (Gondim et al., 2005). La composición porcentual de las cáscaras de mango de la variedad Kent utilizado en este estudio reveló semejanza con los resultados obtenidos por Sánchez Orozco et al., (2014) e Hincapié et al., (2014), en dónde el contenido porcentual de humedad fue de 75.38% y 68.54%, considerando que utilizaron diferentes variedades de mango para cada estudio.

La segunda mayor fracción presente en la cáscara de mango fueron las fibras, siendo estos representados por los constituyentes del epicarpio (celulosa,

hemicelulosa), además de presentar un considerable porcentaje de pectina, almidón y lignina. El contenido porcentual de fibra total fue de 47.7%, en la cual se destaca el contenido porcentual de celulosa en base seca de 18.73%, hemicelulosa de 8.44%, lignina en 10.02% y pectina 10.51%.

Estudios en la literatura muestran la variabilidad de la composición química de las cáscaras de mango, ya que pueden presentar diferentes constituyentes estructurales de acuerdo a la variedad que se está utilizando, como por ejemplo los resultados mostrados por Rybka et al., (2018), utilizando cáscara de mango de la variedad Tommy Atkins, muestra un contenido porcentual de Fibra detergente ácida (celulosa, hemicelulosa y lignina) de 19.33% y fibra detergente neutra en 21.15%. Jahid et al., (2018), por otro lado, reporta un contenido porcentual de celulosa, hemicelulosa y lignina en base seca de 38.4%, 13.9% y 27.9% respectivamente. Hincapié et al., (2014), representó datos analizados de la caracterización química de cáscaras de mango en valores porcentuales de fibra dietética soluble e insoluble, de lo cual obtuvo un valor porcentual de 60.83% de fibra dietética total. De este modo, considerándose que los principales constituyentes de la fibra dietética total son la lignina, hemicelulosa, celulosa y pectina, se logra obtener un valor porcentual de 54.04%, valor similar a lo reportado por este autor.

Sánchez Orozco et al., (2014), de igual forma, evaluando el análisis composicional de diferentes residuos agroindustriales, entre ellos las cáscaras de mango, encontró un contenido porcentual en base seca mayor en hemicelulosa, siendo esta de 26.45%, seguido de celulosa con un 9.93% y lignina con 2.81%, comprobando así la variabilidad de datos respecto a otros autores. Ampliando este aspecto, la discrepancia de datos respecto a la composición porcentual está estrechamente relacionada con la variedad de mango en estudio y el estado de maduración que esta presenta. Serna-Cock, et al., (2016), detalla una composición en fibra dietética insoluble (Celulosa, gran parte de las hemicelulosas y lignina) en un rango de 14 a 50%, y un contenido porcentual de fibra dietética soluble (Azúcares neutros y ácido urónico) en un rango de 7 al 28%.

Al mismo tiempo, también se realizó el cálculo del rendimiento porcentual de pectina o simplemente rendimiento de pectina, que viene a ser el contenido de pectina extraída seca en gramos de material seco utilizado, expresado en porcentaje. Los datos obtenidos en la experimentación detallan un rendimiento del 10.51%, valor similar a lo encontrado por Azevedo et al., (2008), el cual presentó un porcentaje de pectina del 12.08% (Variedad de mango Tommy Atkins). Patel (2017), reportó rendimientos de pectina en un rango de 16,9% a 21,7%, del mismo modo Gragasín et al., (2014), señaló un rendimiento de 21.65%, corroborando así la no uniformidad de los resultados del porcentaje en base seca de pectina de cáscaras de mango. Se puede argumentar que, la importancia de analizar el contenido de pectina en las cáscaras de mango, recae en que es uno de los componentes principales de su estructura. La mayoría de los estudios sobre la explotación de las cáscaras de mango se han ocupado de su uso como fuente de pectina, que se considera una fibra dietética de alta calidad (Berardini et al., 2005). Además, la pectina es uno de los principales componentes de la fibra dietética soluble la cual se encuentra ligada a diferentes azúcares neutros y ácido urónico. En las cáscaras de mango, azúcares neutros como la eritrosa, ramnosa, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa y glucosa, representan compuestos de gran importancia industrial (Serna-Cock et al., 2016).

En contraste a esto último mencionado, el análisis de azúcares por diferencia en peso, fue la tercera mayor fracción presente en la cáscara de mango, con un 30.97% en base seca. En síntesis, la fracción de carbohidratos totales fue de 75% en base seca (excluyendo a la lignina), siendo este resultado directamente influenciado por el contenido en fibra y la fracción de azúcares reductores y no reductores presentes en las cáscaras de mango. La fracción porcentual de carbohidratos en la literatura es variable, Marques et al., (2010) por ejemplo detalla un contenido porcentual de 12.89% en base húmeda, equivalente al 60.51% de carbohidratos en base seca; Rybka et al., (2018) por otro lado, relata un contenido porcentual equivalente al 86.38% de carbohidratos en cáscaras de la variedad Kent y una media del 85% en otras variedades (Tommy Atkins, Palmer y Keitt).

Las fracciones de proteínas, minerales, lípidos y compuestos orgánicos adjuntos, representan alrededor del 7.41% y completaron la composición próxima de la cáscara de mango. Diversos autores señalan además de la excelente fuente de fibra presentes en cáscaras de mango, su importante fuente de compuestos antioxidantes, teniendo como principales ejemplos al ácido gálico, protocatecuico y sirínico correspondientes a los ácidos fenólicos y al kaempferol y la quercetina como los principales flavonoides (Ajila & Prasada Rao, 2013; Marques et al., 2010).

4.2. PRETRATAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA

El tratamiento previo al material lignocelulósico es una herramienta importante para los procesos de conversión de celulosa y es esencial para cambiar su estructura, de esta manera se requiere la eliminación de las barreras que dificultan el acceso de catalizadores químicos y biológicos que contribuyen a su transformación, permitiendo así que sus fracciones constituyentes como la celulosa y hemicelulosa estén disponibles para una posterior acción catalítica (Amin et al., 2017).

En la Tabla 9 son presentados los resultados del análisis químico de la estructura fibrosa de las cáscaras de mango luego del tratamiento con ebullición, los datos presentados a continuación se encuentran en base seca porcentual.

Tabla 9. Composición química en valores porcentuales en base seca de cáscara de mango luego del tratamiento con ebullición.

Definición	Composición química (% Base seca)			
	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina	Pectina
Cáscara con tratamiento	45,78	19.59	2.98	10.21

Fuente: Propio autor.

Los valores porcentuales especificados en la Tabla 9, indicaron un claro aumento en el porcentaje en base seca de celulosa y hemicelulosa, y una clara disminución del contenido porcentual de lignina. El contenido porcentual de pectina aparentemente no varió, sin embargo, tomándose en cuenta la disminución de los azúcares con mayor disponibilidad en las superficies de cáscaras de mango, producto del tratamiento con agua en ebullición, puede señalarse que si presentó una disminución del contenido de pectina en base seca.

El método de tratamiento se mostró satisfactorio para una exposición mayor del contenido de celulosa, por lo general, un método de tratamiento ideal reduciría el contenido de lignina, factor crítico que inhibe la hidrólisis enzimática por adsorción irreversible en la celulosa, es decir reduciría la cristalinidad en la celulosa y aumentaría el área de disponibilidad para las reacciones enzimáticas, lo que fue corroborado con el análisis químico de las cáscaras de mango tratadas (Saucedo-Luna et al., 2011).

Diferentes autores describen el uso de un tratamiento térmico con ebullición de agua, como el mejor pretratamiento para la obtención de mejores rendimientos de azúcares monoméricos (Yepes et al., 2008, Mostafa et al., 2013). En el presente trabajo no se realizó un análisis de los diferentes pretratamientos que son aplicados para reducir la cristalinidad de las superficies celulósicas. Deepa et al. (2011), detalla que los tratamientos térmicos con explosión a vapor, si bien, se pueden obtener índices de sacarificación altos, debido a la fácil remoción de hemicelulosa, lignina y pectina, los índices porcentuales altos en pectina que presenta la cáscara de mango, podría significar en una pérdida en los índices de sacarificación.

A su vez, Yingkamhaeng & Sukyai (2014), concluyen que una de las ventajas de usar la explosión a vapor es su impacto ambiental significativamente menor, menos químicos peligrosos utilizados en proceso, en comparación con los tratamientos químicos, sin embargo, el uso de vapor en el tratamiento y las altas temperaturas que conlleva este proceso irían ligados a un costo mayor de operación, variable no sostenible económicamente si es que se plantea como objetivo escalar la realización del presente estudio. Por otro lado, los tratamientos ácidos (Pretratamientos con H_2SO_4 o $NaOH$ diluido), si bien estudios presentan índices de solubilización mayores en la superficie lignocelulósica, estos han demostrado presentar inhibición del crecimiento de microorganismos, probablemente debidos a sus efectos inhibidores de la actividad enzimática (Saha & Cotta, 2008).

4.3. OPTIMIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Se realizó un diseño compuesto central rotacional (DCCR), con el fin de evaluar el efecto del tiempo de fermentación, el pH y la humedad del medio fermentativo, sobre la actividad enzimática endoglucanasa, celulasa total y

pectinasa, del extracto producido por *Aspergillus niger* ATTC 9642. Hoy en la actualidad, el DCCR como metodología estadística, es una de las más importantes y utilizadas en la optimización de procesos. Según Neto et al. (1995), el objetivo principal recae en la capacidad de este diseño en desarrollar un modelo empírico para el proceso estudiado y obtener respuestas con mayor precisión para determinar las condiciones óptimas del desarrollo del proceso evaluado.

Los experimentos llevados a cabo a continuación fueron planeados con el objetivo de obtener modelos cuadráticos capaces de describir el comportamiento de la enzima producida en el medio de fermentación sólido bajo condiciones de humedad, pH y tiempo de fermentación requeridos. Se debe tener en cuenta que, hasta la actualidad, los modelos matemáticos se han utilizado cada vez más para ayudar a explicar las respuestas de las reacciones bioquímicas. Del mismo modo, la metodología de superficie de respuesta, usada en el presente estudio, a menudo es empleada para determinar una respuesta óptima entre un rango específico de condiciones experimentales. En muchos casos, la interacción de parámetros que influyen en los procesos fermentativos se puede evaluar con un pequeño número de ensayos a través del diseño experimental (Théodore & Panda, 1995).

En este contexto, la matriz con los datos del DCCR 2^3 (valores reales y codificados del tiempo, pH y Humedad del medio de fermentación) y los resultados de las actividades enzimáticas para las diferentes condiciones de fermentación expresadas en Unidades enzimáticas en relación a los gramos de sustrato en base seca (U/g), de Endoglucanasa (CMCasa), Celulata total (FPasa) y Pectinasa obtenidas de la fermentación en estado sólido de *Aspergillus niger* ATCC 9642, se encuentran en la Tabla 10.

Los resultados experimentales fueron usados para estimar los efectos lineales, cuadráticos y los efectos de las interacciones entre variables, usando el programa estadístico STATISTICA v10.0. Las gráficas de los efectos estimados ($p < 0.05$) se muestra en las Tablas 26, 27 y 28 (Anexo 5).

Tabla 10. Matriz del Planeamiento experimental (DCCR 2³) con valores reales y codificados de las variables de estudio y actividad enzimática expresadas en (U/g).

Ensayo	Variables						Respuestas		
	Nivel codificado			Nivel original			CMCasa (U/g)	Celulasa total (U/g)	Pectinasa (U/g)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁ (h)	X ₂ (%)	X ₃			
1	-1	-1	-1	48	3	50	3.18	2.09	65.94
2	-1	-1	1	48	3	70	3.86	1.49	49.39
3	-1	1	-1	48	7	50	2.79	1.76	58.54
4	-1	1	1	48	7	70	3.67	1.21	42.70
5	1	-1	-1	96	3	50	4.24	3.16	111.32
6	1	-1	1	96	3	70	4.89	2.38	87.75
7	1	1	-1	96	7	50	3.59	2.87	100.66
8	1	1	1	96	7	70	3.93	2.19	81.41
9	-1.682	0	0	32	5	60	2.00	1.66	47.75
10	1.682	0	0	112	5	60	2.36	2.62	103.93
11	0	-1.682	0	72	2	60	5.08	2.10	57.62
12	0	1.682	0	72	8	60	3.26	2.31	73.53
13	0	0	-1.682	72	5	43	3.41	2.34	70.74
14	0	0	1.682	72	5	77	5.25	1.81	55.97
15	0	0	0	72	5	60	6.85	3.15	97.97
16	0	0	0	72	5	60	6.49	3.14	107.07
17	0	0	0	72	5	60	7.03	3.11	106.28
18	0	0	0	72	5	60	6.85	3.04	108.54

X₁: Tiempo de fermentación (horas); X₂: pH del medio; X₃: Porcentaje de humedad del medio (%).
Fuente: Propio autor.

Las figuras 12, 13 y 14 presentan las Gráficas de Pareto de los efectos estandarizados para la evaluación de la influencia de las variables independientes sobre la variable dependiente (Actividades enzimáticas), a un nivel de significancia de 0.05. El diagrama de Pareto presenta de forma rápida y clara los efectos estadísticamente importantes, considerando los efectos cuyas superficies se encuentren ubicadas a lado derecho de la línea divisoria.

Respecto a la producción de endoglucanasa (CMCasa), se observó que las variables tiempo, pH y Humedad del medio de fermentación (efectos cuadráticos), tuvieron mayor significancia, seguido del tiempo de fermentación, pH y la Humedad en el medio (efectos lineales) (Fig. 12). Se puede inferir de esta manera que, los valores de tiempos de fermentación prolongados, no son los ideales si se desea obtener una mayor actividad enzimática endoglucanasa (efecto lineal negativo para el tiempo de fermentación), sin embargo, debido al factor cuadrático negativo de esta variable, y que a su vez, es la variable de mayor importancia estadística ($p < 0.05$), podemos afirmar con exactitud que tiempos muy cortos y muy prolongados, no son los más ideales y que existe un rango de optimización entre las 65 y 75 horas en que la actividad endoglucanasa puede ser maximizada.

Del mismo modo, evaluando los efectos significativos de la actividad enzimática celulasa total o FPasa, se pudo observar un comportamiento similar, con excepción del tiempo de fermentación (efecto lineal), que mostró mayor significancia respecto a las variables de pH, tiempo y Humedad del medio de fermentación (efectos cuadráticos) respectivamente. La humedad del medio (efecto lineal), también mostró significancia respecto a la actividad enzimática, por otro lado, el pH (efecto lineal) y ninguna de las interacciones lineales resultantes según la gráfica de Pareto (Fig. 13), mostró significancia estadística.

Fue evaluada en última instancia la actividad pectinasa, encontrando una gran variabilidad en los datos encontrados de actividad enzimática para ambas enzimas (celulasas y pectinasas). Las pectinasas según muestra en la Tabla 10, presenta una actividad enzimática numéricamente mayor, influenciado por el Tiempo de fermentación y la Humedad (Efectos lineales y cuadráticos), y el efecto del pH del medio (Efecto cuadrático) (Fig. 14).

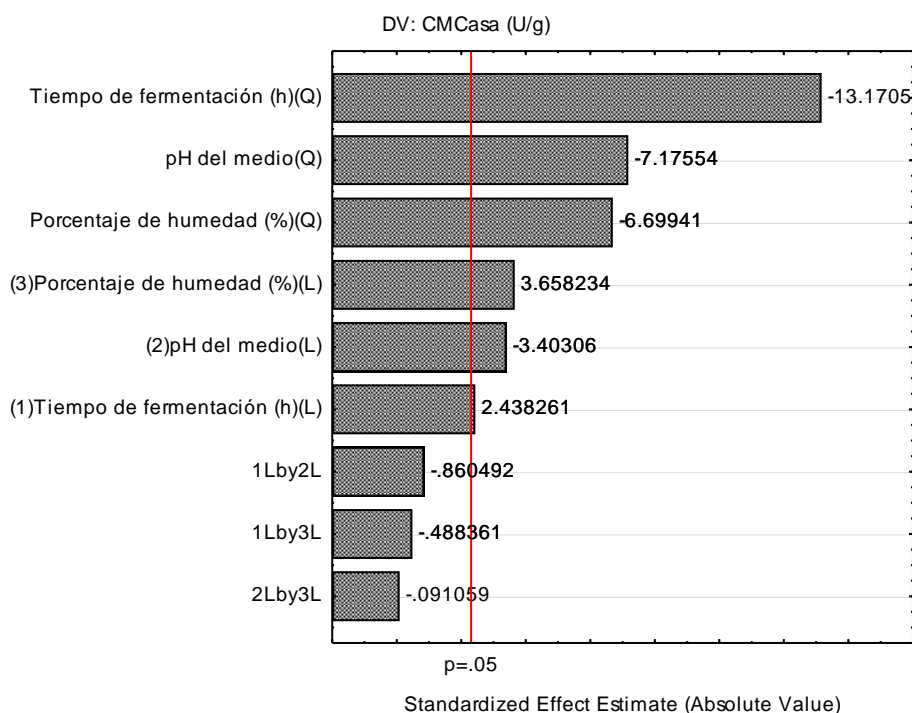


Figura 12. Gráfica de Pareto para la Actividad enzimática Endoglucanasa (CMCasa). (L): Efecto lineal, (Q): Efecto cuadrático, 1Lby3L: Interacción lineal (Tiempo de fermentación y humedad), 1Lby2L: Interacción lineal (Tiempo de fermentación y pH del medio), 2Lby3L: Interacción lineal (pH del medio y Humedad). Gráficos obtenidos con Statistica v10.0.

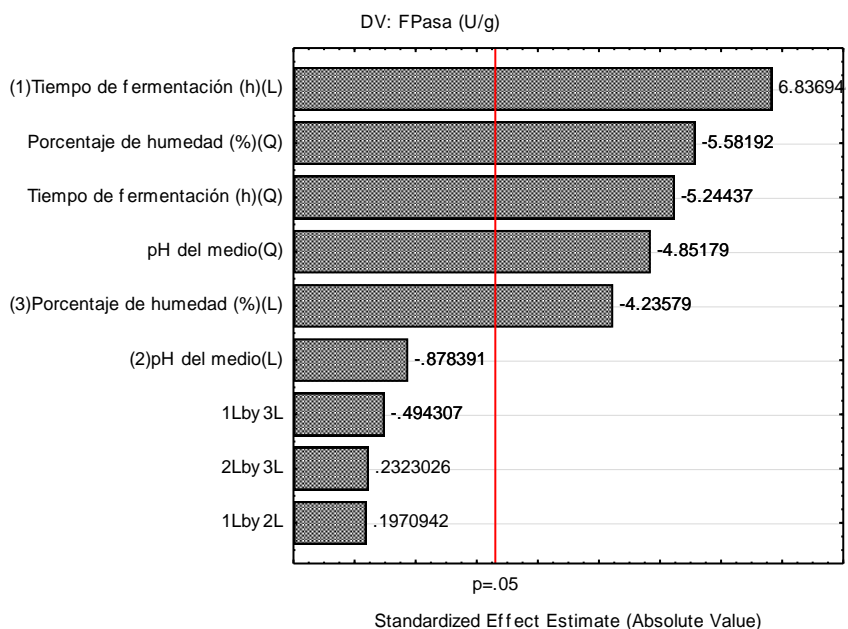


Figura 13. Gráfica de Pareto para la Actividad enzimática Celulasa Total (FPasa). (L): Efecto lineal, (Q): Efecto cuadrático, 1Lby3L: Interacción lineal (Tiempo de fermentación y humedad), 1Lby2L: Interacción lineal (Tiempo de fermentación y pH del medio), 2Lby3L: Interacción lineal (pH del medio y Humedad). Gráficos obtenidos con Statistica v10.0.

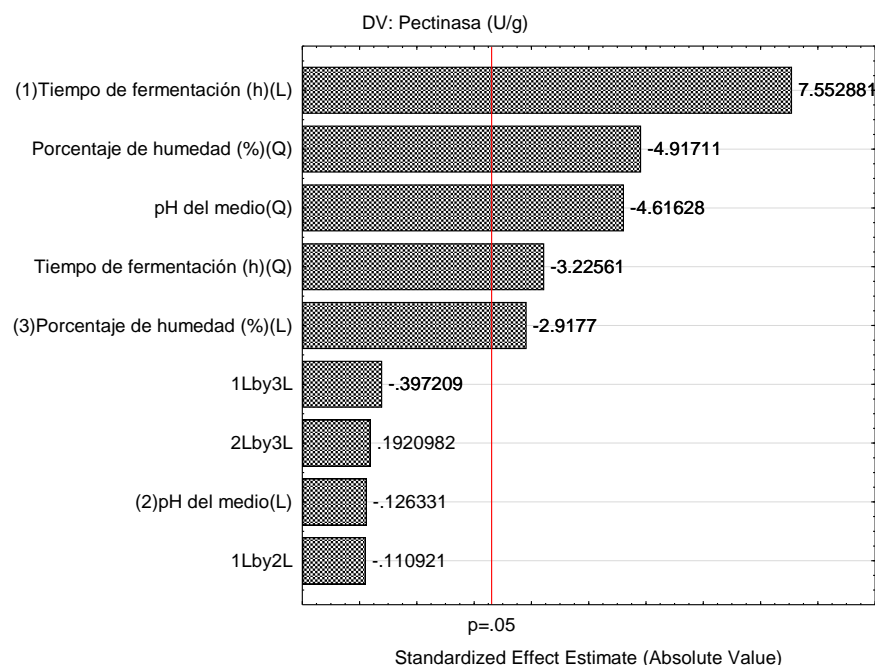


Figura 14. Gráfica de Pareto para la Actividad enzimática Pectinasa. (L): Efecto lineal, (Q): Efecto cuadrático, 1Lby3L: Interacción lineal (Tiempo de fermentación y humedad), 1Lby2L: Interacción lineal (Tiempo de fermentación y pH del medio), 2Lby3L: Interacción lineal (pH del medio y Humedad). Gráficos obtenidos con Statistica v10.0.

4.3.1. Efecto del tiempo de fermentación en la actividad enzimática celulasa (CMCasa y FPasa) y pectinasa

Respecto a la actividad Endoglucanasa (CMCasa), se pudo obtener un valor máximo de actividad de 7.03 U/g, bajo condiciones de humedad del 60%, pH 5 a las 72 horas de fermentación, y dos valores mínimos de actividad de 2.36 y 2.00 U/g a las 32 y 112 h de fermentación respectivamente, bajo las mismas condiciones de pH y humedad. Los resultados demuestran una clara influencia del tiempo de fermentación en la actividad endoglucanasa, presentando un rango de optimización dentro de las 72 horas en la que el valor de actividad enzimática endoglucanasa es optimizable. Esto se puede ver evidenciado en los resultados representados por la gráfica de Pareto, en donde el tiempo de fermentación (valor cuadrático) es la variable más significativa, demostrando así que, un valor mínimo de periodo de fermentación y un valor alto, no son los ideales para una respuesta máxima de esta enzima. Resultados similares fueron encontrados por Mrudula y Murugammal, (2011), en la cual afirman que aumentos adicionales en el tiempo de incubación reduce la producción enzimática y el tiempo de incubación necesario para una producción óptima se observa a las 72 h en

fermentaciones sólidas, pudiendo presentar variaciones de acuerdo al tipo de sustrato empleado.

Del mismo modo, en relación a la actividad celulasa total (FPasa), se pudo observar un comportamiento diferente respecto a la actividad endoglucanasa. Según la Tabla 10, la mayor actividad FPasa encontrada en la experimentación, fue de 3.16 U/g, obtenido a las 96 horas de fermentación. La variabilidad de resultados en las actividades enzimáticas de ambas enzimas en tiempos diferentes se puede explicar de dos formas. El primer punto a resaltar es la capacidad de las endoglucanasas de actuar sobre las regiones amorfas de la estructura celulósica o superficies de microfibrilación, disminuyendo la longitud de las cadenas de celulosa, creando nuevos extremos reactivos que servirán como sustrato para reacciones posteriores, en este contexto el actuar de las endoglucanasas servirá como paso fundamental para la acción de glucanohidrolasas y beta-glucosidasas. Se puede argumentar también que la constitución de las regiones amorfas de la celulosa, como es el caso de la hemicelulosa, presenta una alta solubilización respecto a la celulosa (región cristalina), aumentando así su disponibilidad y por consecuencia un consumo más rápido (Kumar et al., 2016). El otro aspecto a considerar, recae en que se puede asumir que la disminución de la actividad enzimática endoglucanasa (CMCasa) y la clara divergencia entre las 72 y 96 horas, siendo esta última el tiempo ideal para la actividad FPasa, podría deberse al agotamiento de macro y micronutrientes en el medio de fermentación con el transcurso del tiempo, la cual compromete a la fisiología fúngica y por ende resulta en la inactivación de la maquinaria de secreción de las enzimas.

Por otro lado, el efecto del tiempo de fermentación en la actividad enzimática pectinasa evidenció una gran influencia positiva de este factor en tiempos más prolongados, siendo obtenida el mayor valor de actividad (111.32 U/g), cuando se trabajó a pH 3, humedad del 50% a las 96 h y un valor mínimo (42.7 U/g) cuando se realizó el ensayo a pH 7, humedad del 70% a las 48 horas de fermentación, como es mostrado en la Tabla 10.

La alta actividad enzimática presentada incluso en las primeras 48 horas de fermentación es debido a la estructura conformacional de las cáscaras de mango

siendo compuestas por polifenoles y pectina, este último como principal componente estructural y siendo reconocida por diferentes autores de elevada calidad dietética (Berardini et al., 2005).

En este contexto, se puede asumir que el rango de optimización se encuentra dentro del margen establecido según el diseño experimental, pudiéndose presentar un valor optimizable de actividad dentro de las 95 y 105 h de fermentación. Valores similares fueron mostrados por Kumar et al., (2012), en donde la poligalacturonasa, una enzima pectinasa hidrolasa, alcanzó su actividad máxima a las 120 h en estado sólido y fermentación sumergida. Mencionan también que, una disminución de la actividad pectinasa después de alcanzar su nivel máximo de producción puede deberse a la represión catabólica, el cese de la síntesis de enzimas y el aumento de la proteólisis en cultivo, como se vio evidenciada en la actividad celulasa, explicada anteriormente. En la experimentación, este aspecto no fue evidenciado debido a que el rango de estudio no abarcó un mayor valor que las 112 horas de fermentación, no obstante, el valor optimizable (valor estadístico) fue encontrado dentro del margen del diseño experimental lo que facilitó el análisis de esta variable.

4.3.2. Efecto del pH en la actividad enzimática celulasa (CMCasa y FPasa) y pectinasa

La influencia del efecto cuadrático del pH sobre la actividad enzimática, puede explicarse debido a las condiciones de crecimiento de *Aspergillus niger*, de la mano con la inestabilidad de las enzimas celulasas (CMCasa y FPasa). El riesgo de presentar desnaturalización durante su síntesis, se debe específicamente a presentarse valores de pH muy bajos o muy altos dentro de un medio de fermentación.

El valor cuadrático, revela que existe un rango de optimización específicamente entre valores de pH entre 4 y 5. Esto apoya los hallazgos de Amaeze et al., (2015), quienes informaron que la tendencia de la actividad de celulasas aumenta gradualmente de pH 3.6 a 4.0 y 5.0 y luego disminuye de pH 5.0 y 6.0 a 8.0 para sustratos que contienen *Aspergillus niger* como microorganismo fermentador. Ellos también demuestran que, a un valor de pH cercano a 4.0, el valor de las actividades enzimáticas tanto de CMCasa y FPasa, tuvieron valores máximos.

Se puede concluir de esta manera que, la producción de enzimas también depende del pH del medio. Por lo tanto, el pH es un factor crítico en la producción de enzimas celulasas microbianas.

Por otro lado, la influencia del pH en la actividad pectinasa fue más notoria, la gráfica de Pareto muestra que el efecto cuadrático de la variable pH presenta significancia estadística. Las actividades pectinasas máximas encontradas fueron entre pH 3 y 5. Resultados similares fueron encontrados por Martos et al., (2009), identificando que a pH entre 4.2 a 4.8, a las 94 h de fermentación presentaron un máximo de actividad, a su vez mostraron que valores superiores a pH 5, significó en una clara disminución de la actividad pectinasa.

4.3.3. Efecto del porcentaje de humedad del medio sólido en la actividad enzimática celulasa (CMCasa y FPasa) y pectinasa

La variable de porcentaje de humedad presentó un mayor efecto cuadrático para la actividad celulasa (CMCasa y FPasa), siendo significativo a un nivel de confianza del 95%. Los efectos lineales en cambio mostraron un efecto menor respecto a los efectos cuadráticos, presentando un efecto lineal positivo para la actividad endoglucanasa y un efecto lineal negativo para celulasa total (FPasa). La mayor solubilidad de la hemicelulosa en la superficie del sustrato con un adecuado contenido porcentual de agua, pudo haber influenciado en la actividad enzimática endoglucanasa, mostrando un efecto positivo lineal del porcentaje de humedad. Al aumentarse el contenido de agua, aumentaría linealmente la actividad endoglucanasa, presentando un valor alto de actividad enzimática dentro de un margen cercano al 60% de humedad, la variable cuadrática significativa afirma la existencia de un rango de optimización, en la cual esta respuesta puede maximizarse.

Por otro lado, dentro del análisis del contenido de humedad en la actividad FPasa, presentó un efecto lineal negativo y tuvo un efecto cuadrático mucho más significativo, esto es notorio ya que al intentar aumentar el porcentaje de humedad disminuirá la actividad enzimática, siendo el rango de optimización entre los 55 y 60% de humedad. Valores superiores a 60% de humedad, mostraron actividades enzimáticas menores que las usadas en base a 50% y 60% de contenido de humedad.

Los resultados encontrados en el presente trabajo, afirman lo reportado por Gao et al. (2008), en la cual observaron un efecto positivo del contenido de humedad inicial del sustrato sobre la actividad endoglucanasa para el cultivo de *A. niger* bajo condiciones sólidas. Verificaron que un aumento en el contenido de humedad del 55% al 74% mejora la actividad enzimática, mientras que un aumento adicional al 80% tuvo un efecto negativo.

Siendo *Aspergillus niger* un hongo filamentoso con bajo requerimiento de humedad, hace posible establecer metodologías escalables para el desarrollo de otros procesos en donde el agua se vea limitada. La gran actividad celulolítica expresada en función del bajo contenido porcentual de agua en el medio se debe a que el contenido de agua es un factor que no sólo facilita la difusión de nutrientes en el sustrato sólido, sino también facilita la transferencia de O₂ y regula el control de la temperatura, promoviendo así el crecimiento del hongo y la posterior excreción de enzimas. Como el contenido de agua es limitado, su control es esencial para optimizar la fermentación en estado sólido (Gervais & Molin, 2003).

Para pectinasa, la variable porcentaje de humedad presentó un efecto lineal y cuadrático negativo, ambos significativos según la gráfica de Pareto representada en la Figura 14. Según la Tabla 10, valores de porcentaje de humedad entre 50 y 60%, mostraron actividades enzimáticas pectinasa altas, los factores de pH y tiempo de fermentación juegan un rol importante dentro de la fermentación, posibilitando también que la interacción entre estas variables produjera valores altos de actividad pectinasa. Los resultados obtenidos en la experimentación abalan lo reportado por Castilho et al., (2000), en donde afirma que un aumento lineal de contenido de humedad hasta el 70% desencadena una disminución en la actividad poligalacturonasa (actividad pectinasa), obteniendo un valor óptimo de actividad enzimática usando 40-50% de humedad en una fermentación sólida. En definitiva, estos datos demuestran que un mayor contenido de humedad tiene consecuencias negativas en el crecimiento, reduciendo así la porosidad del medio y la concentración de oxígeno en el material sólido (Khatri et al., 2015). De acuerdo con Acuña-Argüelles et al., (1995), en medios con hongos de baja disponibilidad de agua como es el caso de

Aspergillus niger, sufren modificaciones en sus membranas celulares, lo que lleva a limitaciones de transporte y afecta su metabolismo microbiano.

4.3.4. Análisis Estadísticos de la optimización de la actividad enzimática

Los resultados experimentales para la actividad enzimática bajo condiciones de tiempo, pH y humedad estudiadas, se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) y análisis de regresión lineal. El análisis de regresión se realizó para ajustar los modelos matemáticos a los datos del experimento con el objetivo de identificar una región óptima para la variable estudiada (actividad enzimática) en respuesta a las variables independientes establecidas.

Los modelos polinomiales de segundo orden expresados por las ecuaciones 11, 12 y 13, donde las variables tomaron sus valores codificados, representan la actividad enzimática Endoglucanasa (CMCasa), Celulasa Total (FPasa) y pectinasa, respectivamente, en función del tiempo de fermentación (X_1), el pH del medio fermentativo (X_2) y el porcentaje de humedad del mismo (X_3).

$$\begin{aligned}
 &CMCasa (U. g^{-1}) \\
 &= 6.783 - 0.275X_1 - 0.384X_2 + 0.413X_3 - 1.549X_1^2 \\
 &\quad - 0.843X_2^2 - 0.787X_3^2 - 0.127X_1X_2 - 0.07X_1X_3 \\
 &\quad - 0.013X_2X_3 \qquad \qquad \qquad (11)
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 &FPasa (U. g^{-1}) \\
 &= 3.107 + 0.415X_1 - 0.053X_2 - 0.257X_3 - 0.33X_1^2 - 0.31X_2^2 \\
 &\quad - 0.35X_3^2 + 0.015X_1X_2 - 0.039X_1X_3 \\
 &\quad + 0.018X_2X_3 \qquad \qquad \qquad (12)
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 &Pectinasa (U. g^{-1}) \\
 &= 104.54 + 18.97X_1 - 0.32X_2 - 7.33X_3 - 8.42X_1^2 - 12.04X_2^2 \\
 &\quad - 12.83X_3^2 - 0.36X_1X_2 - 1.303X_1X_3 \\
 &\quad + 0.63X_2X_3 \qquad \qquad \qquad (13)
 \end{aligned}$$

A su vez fueron determinados los coeficientes más significativos de los modelos polinomiales, basados en la prueba T de Student y valores p, ambos expresados en el Anexo 5, en las Tablas 29, 30 y 31. La aplicación de la prueba estadística de Student para los coeficientes determinados, también nos permite estimar su importancia y eliminar aquellas interacciones en el modelo matemático cuya

influencia no es significativa (Oughlis et al., 2010). Los modelos expresados anteriormente mediante las ecuaciones 11, 12 y 13, fueron considerados todos los factores incluyendo sus interacciones, con el objetivo de minimizar la determinación de errores.

Del mismo modo, también fue realizado un análisis de varianza ANOVA, para probar la importancia del modelo (es decir, el modelo debe validarse desde el punto de vista estadístico). El ANOVA para el modelo de segundo orden respecto a la respuesta de actividad Endoglucanasa (CMCasa) es representada en el Anexo 5, Tabla 29. El R^2 para este modelo fue de 0.9673, es decir aproximadamente 96.73% de la variación observada en la actividad endoglucanasa (CMCasa), puede ser explicada por el modelo ajustado expresado en la Ecuación 11, por lo cual se puede afirmar la validez del modelo para explicar el comportamiento de la variable dependiente. Según Braver et al., (2003), los valores de R^2 varían de 0 a 1 y se expresan comúnmente como porcentajes de 0% a 100%. Un R^2 bajo, (< 0.7) al 70% o menos, indica que la seguridad del modelo generalmente no sigue los movimientos de las variables en estudio.

A su vez, fue determinado también el R^2 ajustado, este valor asegura un ajuste satisfactorio del modelo polinomial de segundo orden, a los datos evaluados en la experimentación (pH, tiempo y humedad), en otras palabras, el R^2 ajustado corrige al R^2 tanto para el número de términos estudiados, así como el tamaño muestra. El R^2 ajustado para la actividad endoglucanasa fue de 0.9305, valor numéricamente similar al R^2 del modelo.

El ANOVA para el modelo de segundo orden respecto a la respuesta de actividad Celulasa Total (FPasa) es representada en el Anexo 5, Tabla 30. El R^2 para este modelo fue de 0.9393, es decir aproximadamente 93.93% de la variación observada en la actividad celulasa total (FPasa), puede ser explicada por el modelo ajustado expresado en la Ecuación 12, por lo cual se puede afirmar la validez del modelo para explicar el comportamiento de la variable dependiente. El R^2 ajustado para la actividad celulasa total fue de 0.8711, valor numéricamente distante al R^2 del modelo, esto puede explicarse debido a la

consideración de los efectos de interacción lineales, los cuales no mostraron significancia, expresándose por ende una disminución del R^2 ajustado.

Por último, fue realizado el ANOVA para el modelo de segundo orden respecto a la respuesta de actividad Pectinasa, la cual es representada en el Anexo 5, Tabla 31. El R^2 para este modelo fue de 0.9298, es decir aproximadamente 92.98% de la variación observada en la actividad pectinasa, puede ser explicada por el modelo ajustado expresado en la Ecuación 13, por lo cual se puede afirmar la validez del modelo para explicar el comportamiento de la actividad pectinasa. El R^2 ajustado para la actividad pectinasa fue de 0.8509, valor numéricamente similar al R^2 del modelo.

En la Figura 15 se muestran los gráficos de superficie de respuesta y las gráficas de contorno para cada interacción propuesta por el diseño experimental para la actividad Endoglucanasa (CMCasa). Las gráficas son representaciones de la ecuación polinomial de segundo grado mostrada en la Ecuación 11. Se puede apreciar que, todas las gráficas de superficie de respuesta al igual que las gráficas de contorno tienen una región con presencia de curvatura o superficie cuadrática, que, como ya se definió, es aquí en donde se presenta una región de maximización de la respuesta estudiada.

En la gráfica 15A.1-2, se representa el efecto del Tiempo de fermentación y el contenido porcentual de humedad del medio. Un aumento en la actividad de endoglucanasa está ligado a un aumento de la humedad y el tiempo de fermentación, maximizándose la respuesta a las 74 h, con humedad del medio fermentativo de 62 %.

Se observó también que la actividad enzimática sufrió un descenso, a medida que la humedad aumentó al igual que el tiempo de fermentación. Siendo evaluada como una única variable dependiente, se obtuvo un valor máximo estadístico estimado de actividad endoglucanasa de 6.895 U/g (valor previsto), valor numéricamente mayor a lo encontrado en la práctica. Valores similares fueron encontrados por Kulkarni et al. (2018) y Mrudula & Murugammal, (2011), los cuales reportan valores optimizados de 8.89 U/g para la actividad endoglucanasa a las 72 h de fermentación, 67% de humedad a pH 5, usando residuos agroindustriales como fuente de carbono. Se puede concluir de esta

manera que, el efecto del tiempo y la humedad en la actividad endoglucanasa es de vital importancia a la hora de secretar enzimas celulolíticas, su relación condiciona la degradación de la estructura celulósica de las cáscaras de mango, valores muy altos y muy bajos de estas variables significaría en un descenso de su actividad.

Así también, la gráfica 15B.1-2 así como la 15C.1-2, muestran el efecto de la variación del pH con el tiempo de fermentación y el efecto del pH con la humedad del medio respectivamente para el rendimiento de la actividad endoglucanasa (CMCasa). En la gráfica de superficie de respuesta, se observa que se obtiene una mayor actividad endoglucanasa a los 3 días a pH 5, disminuyendo respecto al cuarto día en adelante, correspondiente a las 96 h y 112 h, respectivamente. De esta manera se verificó que la hidrólisis de celulosa por Endoglucanasa se ve influenciada por la concentración de iones hidrógeno del medio, debido a que estos afectan el grado de isomerización de los aminoácidos del complejo enzimático.

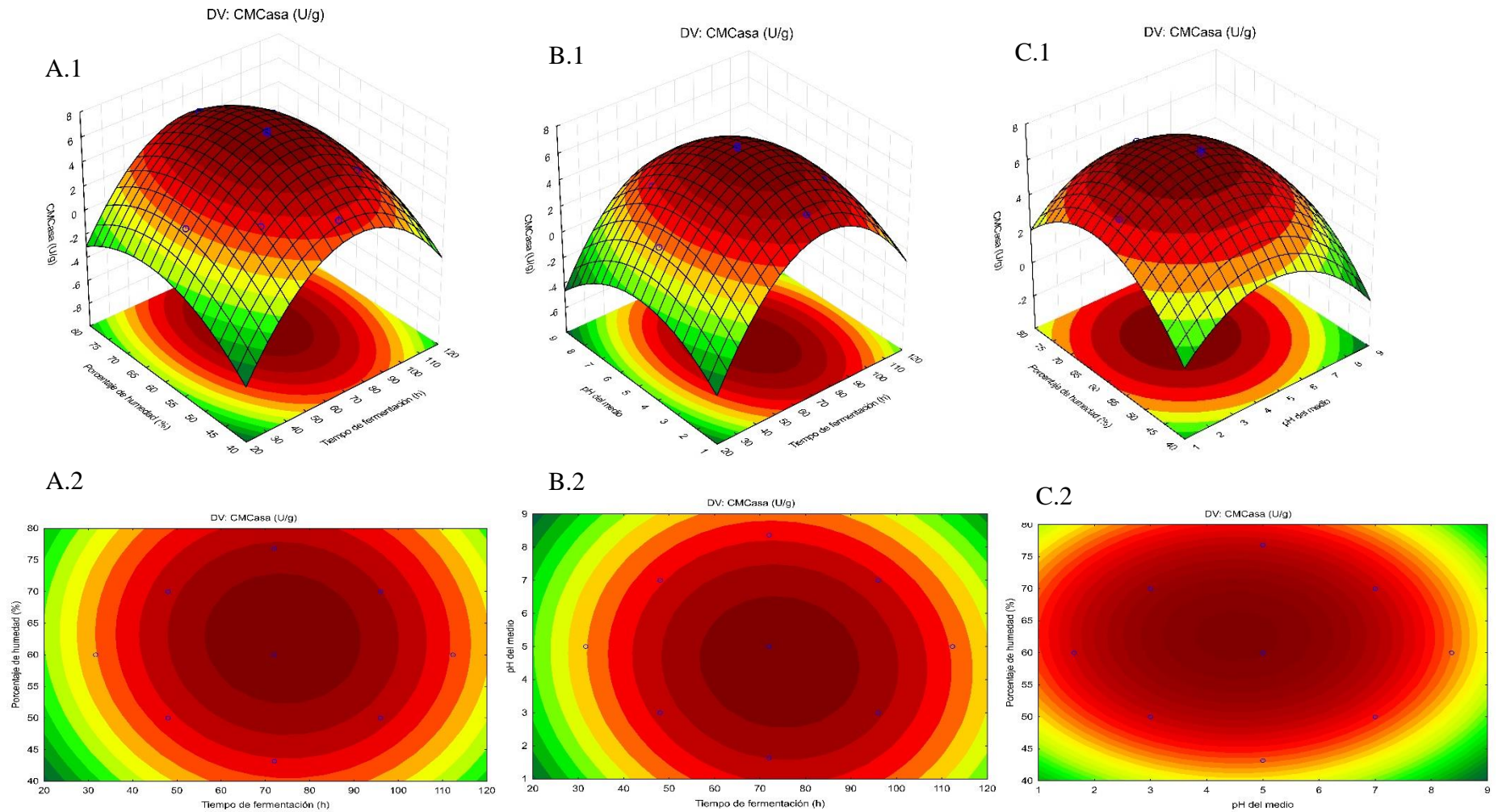


Figura 15. Superficie de respuesta y gráficas de contorno de la actividad Endoglucanasa (CMCasa) de *Aspergillus niger* ATCC 9642. (A) Efecto del tiempo y la Humedad, (B) Efecto del pH y el tiempo y (C) Efecto de la Humedad y pH.

Por otro lado, en la Figura 16 se muestran los gráficos de superficie de respuesta y las gráficas de contorno para cada interacción propuesta por el diseño experimental para la actividad celulasa Total (FPasa). En la figura 16A.1-2 muestra el efecto de la variación del tiempo de cultivo (X_1) y la humedad (X_3) en la actividad celulasa total (FPasa), fijando como punto central el pH (X_2) en 4.83, valor crítico encontrado en donde presenta un valor estadístico estimado para una actividad FPasa máxima. De acorde a la gráfica de superficie de respuesta, no presentó el mismo comportamiento que la actividad endoglucanasa, presentando la actividad FPasa, mayor independencia del tiempo de fermentación. En este contexto, se puede apreciar también que un aumento en su actividad está ligado a un aumento en el tiempo de fermentación, maximizándose su respuesta a las 87 h, con humedad del medio fermentativo de 56 %. Los efectos interactivos entre el tiempo y humedad, tiempo y pH, así como el efecto lineal del pH, no fueron significativos. Pese a la no significancia de los efectos de interacción, se demuestra que el contenido de humedad es un factor crítico para el crecimiento de los hongos y controlar su actividad es esencial para la optimización de sus parámetros a lo largo de la fermentación.

Por otro lado, las Figuras 16B.1-2 y 16C.1-2, muestran los efectos de la variación del tiempo de cultivo (X_1) y el pH (X_2), así como la interacción entre el pH (X_2) y la humedad (X_3) en la actividad celulasa total (FPasa), fijando como punto central el contenido de humedad (X_3) en 56% y el tiempo en 87 h, para el segundo caso. En la gráfica de superficie de respuesta, se observa que se obtiene una mayor actividad celulasa a los 4 días a pH 4.8. A un pH superior a 5.5; la actividad enzimática disminuye, lo mismo ocurre a un pH inferior de 3. Según investigaciones realizadas por Paredes et al., (2010), usando medios de fermentación sólida, el comportamiento enzimático fue similar, presentando una actividad enzimática máxima de celulasas a pH 5.3. La especificidad del hidrólisis hace que las celulasas actúen a condiciones bastante específicas de pH correspondiente. Por lo tanto, la efectividad y reproducibilidad del tratamiento dependerá enormemente del control de esta variable.

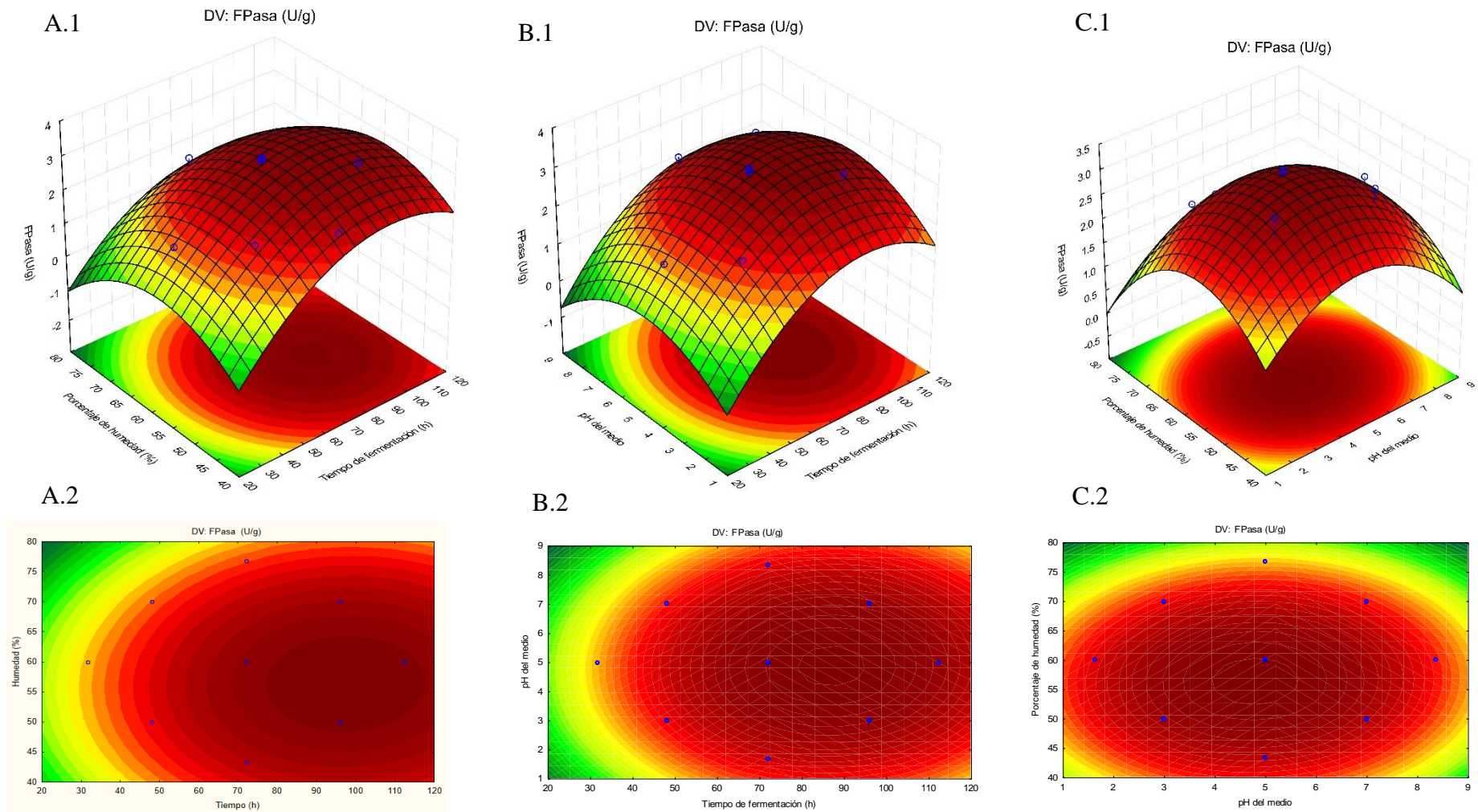


Figura 16. Superficie de respuesta y gráficas de contorno de la actividad Celulasa total (FPasa) de *Aspergillus niger* ATCC 9642. (A) Efecto del tiempo y la Humedad, (B) Efecto del pH y el tiempo y (C) Efecto de la Humedad y pH.

Por último, en la figura 17 se muestran los gráficos de superficie de respuesta y las gráficas de contorno para cada interacción para la actividad Pectinasa. En la figura 17A.1-2 muestra el efecto de la variación del tiempo de cultivo (X_1) y la humedad (X_3) fijando como punto central el pH (X_2) en 4.92, valor crítico encontrado en donde presenta un valor estadístico estimado para una actividad pectinasa máxima de 116.76 U/g. De acorde a la Figura 17, se puede apreciar una superficie con dimensión plana con tendencia a ser maximizada con un aumento del tiempo de fermentación, es decir, un aumento en la actividad pectinasa está ligado a una disminución de la humedad y un aumento del tiempo de fermentación. Los valores críticos encontrados para la maximización de la variable dependiente fueron de 56% de humedad y 100 h de fermentación. Valores superiores a 60% de humedad, significaron en una disminución de la actividad pectinasa, los datos encontrados, como ya se mencionó en el apartado 4.5, afirman lo reportado por Castilho et al., (2000) y Acuña-Argüelles et al., (1995), en donde demuestran que usando medios sólidos con hongos de baja disponibilidad de agua, provocaron modificaciones a nivel de membrana celular, produciendo limitaciones de transporte de nutrientes y afectando su metabolismo, en lo que resultaría una síntesis enzimática deficiente. Del mismo modo, las Figuras 17B.1-2 y 17C.1-2, muestran los efectos de la variación del tiempo de cultivo y el pH, así como la interacción entre el pH y la humedad en la actividad pectinasa. Fue evidente que con el aumento del tiempo de cultivo y el pH, la producción de pectinasa aumentó y alcanzó su máximo utilizando pH del medio en 4.96 (valor predicho). Sin embargo, la actividad disminuyó con un aumento adicional en el pH. Así mismo las investigaciones realizadas por Kumar et al., (2012), demostraron que la producción de pectinasa presentaba un rendimiento máximo a las 116 h a pH 4.8, de la misma forma Colla et al., (2017), reportaron que el pH óptimo de actividad poligalacturonasa (pectinasa), estuvo en el rango de 4.5 y 4.9, demostrando así la concordancia de resultados respecto al valor de pH con la cual se llevó a cabo los experimentos.

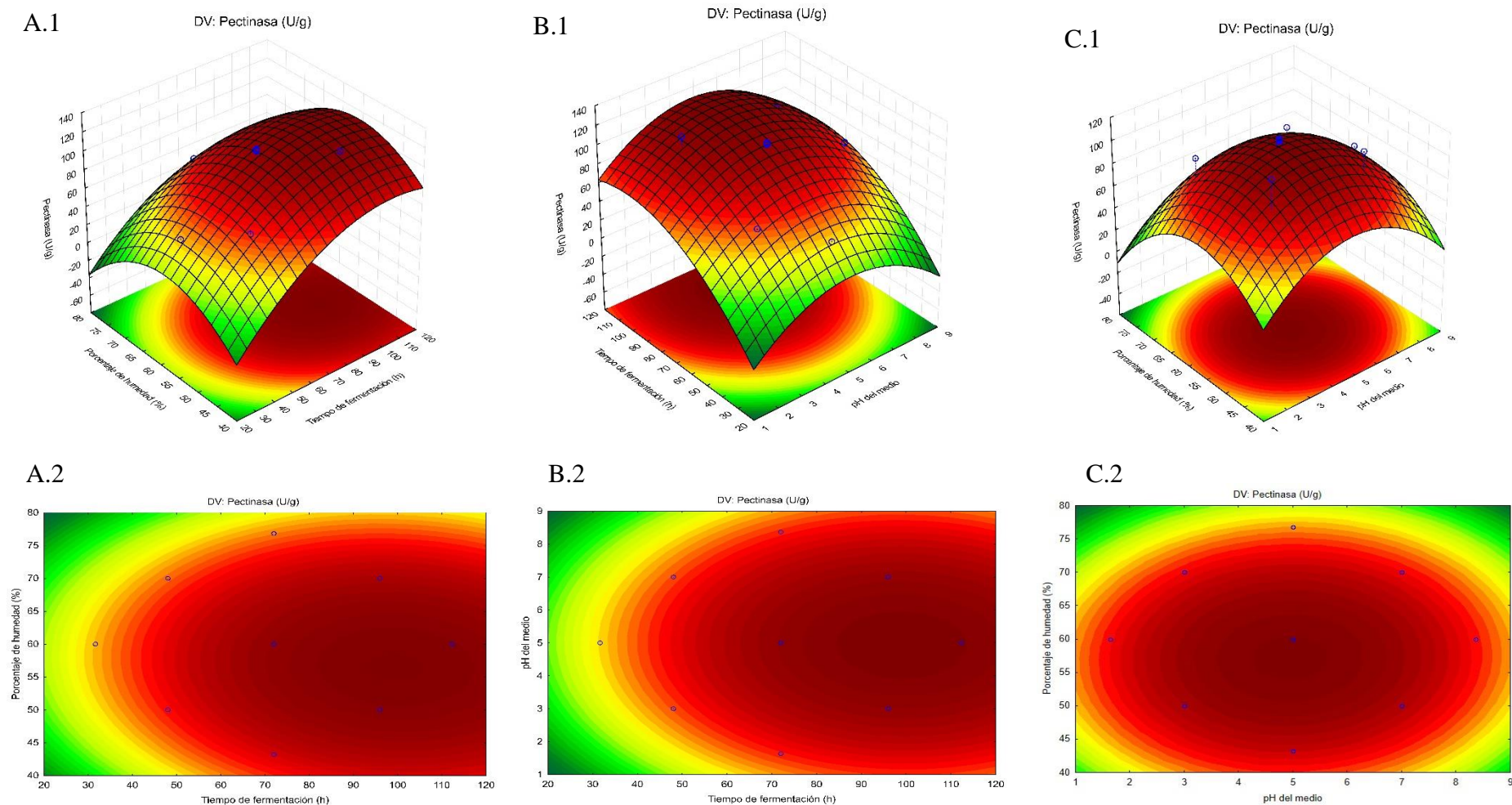


Figura 17. Superficie de respuesta y gráficas de contorno de la actividad Pectinasa de *Aspergillus niger* ATCC 9642. (A) Efecto del tiempo y la Humedad, (B) Efecto del pH y el tiempo y (C) Efecto de la Humedad y pH.

Para efectuar el análisis simultáneo de las tres respuestas de actividad enzimática estudiadas anteriormente (Actividad Endoglucanasa, Celulasa total y Pectinasa), se hizo uso de funciones de deseabilidad. Este tipo de función evalúa la manera en que una configuración de variables optimice un conjunto de respuestas en general, es decir que haya un compromiso entre todas las variables independientes estudiadas de tal modo que optimice el valor de actividad enzimática. En este sentido la función de deseabilidad determinó la combinación específica entre las variables de pH, tiempo de fermentación y humedad del medio sólido para satisfacer la maximización de las actividades enzimáticas estudiadas. Los valores estadísticos óptimos de las variables independientes fueron para el tiempo de fermentación un valor de 81.41 h, usando un pH de 4.66, con humedad del medio de fermentación del 59%, estimando una actividad Endoglucanasa (CMCasa) de 6.69 U/g, actividad Celulasa total (FPasa) de 3.23 U/g y actividad Pectinasa de 110.83 U/g, siendo estos valores calculados usando el Programa Statistica v10. La gráfica de los perfiles de valores predichos y deseabilidad se encuentran en el Anexo 5, Figura 30.

4.4. VALIDACIÓN DEL MODELO OPTIMIZADO

Los valores estadísticos de las condiciones óptimas para la fermentación sólida citadas anteriormente fueron usados en esta sección. El medio de fermentación sólido utilizado en conjunto con los nutrientes suplementados, se realizaron de acorde a lo especificado en el punto 3.4.6. Los valores experimentales fueron de 6.28 U/g para la actividad endoglucanasa, 3.29 U/g para la actividad celulasa total (FPasa) y 117.02 U/g para la actividad pectinasa. Se logró evidenciar un 93.87%, 101.85% y 105.58% de similitud entre los valores experimentales respecto a los valores predichos. En términos generales de acuerdo a la Tabla 11, fue determinado un crecimiento de la actividad pectinasa del 11.47%, al igual que un incremento en la actividad celulasa total (FPasa) del 5.79%, tomando como base el promedio de los puntos centrales expresados en el diseño experimental. En el caso de la actividad endoglucanasa (CMCasa) fue encontrado que la actividad disminuyó en un 7.71%, ya que esta es una variable que presenta mayor valor en tiempos más cortos de fermentación próximos a las 72 h.

Tabla 11. Valores de actividad enzimática en las condiciones óptimas de fermentación sólida.

Ensayo	Actividad enzimática (U/g de sustrato seco)		
	Pectinasa	CMCasa	FPasa
No optimizado (Punto central) ^a	104.96	6.805	3.11
Optimizado ^b	117.02	6.28	3.29

^aPromedio de los puntos centrales del diseño experimental usando 72 horas de fermentación, pH del medio en 5 y humedad al 60%.

^bEnsayo realizado con las condiciones optimizadas, usando un tiempo de fermentación de 81.41 h, pH de 4.66, con humedad del medio de fermentación del 59%.

4.5. SACARIFICACIÓN DE LAS CÁSCARAS DE MANGO

La aplicación de un complejo enzimático producido por *Aspergillus niger* ATCC 9634 evaluada en el paso anterior, se empleó para en los ensayos de sacarificación. Las cáscaras de mango no tratadas estaban compuestas por 18.73% de celulosa, 8.44% de hemicelulosa, 10.02% de lignina y 10.51% de pectina.

Generalmente, el glucano es el componente principal de la estructura en las cáscaras de mango, en el pre-tratamiento térmico, además de favorecer a la acción posterior de enzimas por liberación de la celulosa, su uso también favorecerá la liberación de otros azúcares que están presentes en su pared celular, esto se vio evidenciado en el Cromatograma realizado al extracto producto del pre-tratamiento térmico. Los resultados presentados en la Tabla 12, muestran los rendimientos máximos de los azúcares presentes del extracto luego del tratamiento térmico, el rendimiento máximo de glucosa fue de 0.153 g Glucosa/ g de sustrato seco con un porcentaje de conversión del 33.96% respecto al porcentaje de glucano presente en la muestra, se pudo evidenciar también un rendimiento máximo de galactosa del 0.109 g de galactosa/ g de sustrato seco, los rendimientos para xilosa, arabinosa, manosa y ramnosa, también fueron calculados. Los resultados encontrados de acuerdo a las concentraciones de azúcares dentro del extracto de pre-tratamiento son similares a los reportados por Ajila y Prasada Rao, (2013), en la cual determinaron la composición de azúcares de la parte soluble e insoluble, de los constituyentes estructurales en cáscaras de mango, pudiendo encontrar que la galactosa, glucosa y la arabinosa

fueron los principales azúcares neutros presentes en ella, tanto en los constituyentes solubles, así como en la fibra no soluble.

Tabla 12. Rendimientos de azúcares monoméricos obtenidos luego del tratamiento térmico con ebullición.

Pretratamiento	Rendimiento (g Monosacárido/ g de Sustrato seco)						Total de azúcares	%
	Glu	Gal	Ara	Xil	Man	Ram		
Agua en ebullición	0.153	0.109	0.069	0.091	0.0101	0.0112	0.4437	23.72

Fuente: Propio autor.

La cáscara de mango tratada consistió en 45.78% de celulosa, 19.59% de hemicelulosa y 2.98% de lignina. El incremento en el contenido de celulosa y hemicelulosa y el descenso del contenido de lignina, permitirían mejorar la sacarificación enzimática. En la tabla 13, se muestran los diferentes ensayos de sacarificación utilizando el extracto enzimático (pectinasa 101.02 U/g, CMCasa 6.28 U/g y FPasa 3.21 U/g), claramente se puede apreciar una variación en los rendimientos de azúcares neutros presentes aún en la cáscara de mango pretratada, se liberó un rendimiento máximo de 0,424 g de azúcares reductores/g de DS después de 8 h de hidrólisis (Tabla 13) y no hubo cambios significativos cuando se extendió el tiempo de sacarificación a 10 y 14 horas (datos no presentados). Los cromatogramas para el cálculo de la concentración de azúcares neutros se encuentran detallados en el Anexo 6.

Tabla 13. Rendimientos de azúcares monoméricos durante el proceso de sacarificación utilizando extracto enzimático a diferentes horas de tratamiento.

Tiempo (h)	Rendimiento (g Monosacárido/ g de Sustrato seco)						%
	Glu	Gal	Ara	Xil	Man	Ram	
2	0.1139	0.0267	0.0337	0.0080	0.0032	0.0029	17.41
4	0.1359	0.0320	0.0408	0.0095	0.0038	0.0034	20.79
6	0.1762	0.0415	0.0522	0.0123	0.0049	0.0045	26.95
8	0.2569	0.0601	0.0758	0.0179	0.0072	0.0065	39.29

Fuente: Propio autor.

De la Tabla 14 se muestra la distribución de los monosacáridos liberados de la primera etapa de pretratamiento (etapa 1), siendo la glucosa y la galactosa los azúcares mayoritarios en esta etapa y del mismo modo la etapa de aplicación del

complejo enzimático (Etapa 2), en dónde tanto la glucosa, así como la arabinosa estuvieron presentes en mayor proporción. De estos tratamientos se obtuvieron rendimientos combinados de glucosa de 0.41 g/g de sustrato seco y rendimiento de sacarificación del 63.01%.

Tabla 14. Distribución de rendimientos de azúcares monoméricos en ambas etapas de tratamiento (Etapa de tratamiento con ebullición + Etapa de Sacarificación enzimática).

Condiciones	Rendimiento (g Monosacárido/ g de Sustrato seco)							Total de azúcares	%
	Glu	Gal	Ara	Xil	Man	Ram	Sac.		
Paso 1	0.153	0.109	0.069	0.091	0.0101	0.0112	0.4437	23.72	
Paso 2	0.2569	0.0601	0.0758	0.0179	0.0072	0.0065	0.4244	39.29	
Paso 1 + Paso 2	0.4099	0.1694	0.1449	0.1089	0.0173	0.0177	0.8681	63.01	

Fuente: Propio autor.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- Se logró optimizar las condiciones del medio de cultivo sólido conformado por cáscaras de mango, siendo las condiciones óptimas de operación en 81 h para el tiempo de fermentación, pH del medio en 4.66 y porcentaje de humedad del medio sólido de 59%, estas condiciones resultaron en la producción de un complejo enzimático sintetizado por *Aspergillus niger* ATCC 9642, presentando a su vez actividad enzimática Endoglucanasa (CMCasa) de 6.28 U/g, actividad Celulasa total (FPasa) de 3.29 U/g y actividad Pectinasa de 117.02 U/g, en dichas condiciones óptimas.
- Se logró evidenciar que la presencia de un bajo porcentual de humedad en el medio sólido mejoró significativamente la actividad enzimática del extracto, haciendo que este proceso presente condiciones para un posterior aumento de escala, bajo condiciones limitantes de agua. Por otro lado, la variable de tiempo de fermentación se mostró como la más importante en todos los ensayos, un aumento en el tiempo de fermentación favorece la actividad enzimática pectinasa, FPasa y CMCasa, este última hasta un máximo de 72 h.
- El tratamiento térmico aplicado a las cáscaras de mango logró un rendimiento máximo de glucosa fue de 0.153 g Glucosa/ g de sustrato seco con un porcentaje de conversión del 33.96% respecto al porcentaje de glucano presente en la muestra.
- El ensayo de sacarificación utilizando el extracto enzimático (pectinasa 117.02 U/g, CMCasa 6.28 U/g y FPasa 3.29 U/g), aplicado a la cáscara de mango con tratamiento térmico, permitió obtener un rendimiento máximo de liberación de azúcares reductores de 0.424 g AR/g de sustrato seco a las 8 h de hidrólisis, siendo estimado un porcentaje de sacarificación del 39.29%. De esta manera se pudo obtener un rendimiento total de sacarificación del 63.01%.

5.2. RECOMENDACIONES

- Evaluar la cinética de producción del extracto enzimático de *Aspergillus niger* ATCC 9642, en relación a mediciones indirectas de consumo del sustrato y crecimiento de hifas como indicador del aumento de la concentración de biomasa.
- Evaluar diferentes métodos de recuperación del extracto enzimático luego de la fermentación en estado sólido.
- Caracterizar las enzimas producidas en fermentación en función de su estabilidad, pH, temperatura óptima, tiempo de vida media, y valores cinéticos de K_m y V_{max} .
- Evaluar el efecto de diferentes tratamientos a la cáscara de mango, con el objetivo de aumentar la recuperación de azúcares fermentables.
- Evaluar las condiciones óptimas de sacarificación haciendo uso del extracto enzimático en función de la temperatura, agitación y tiempo de sacarificación de las cáscaras de mango tratadas.
- Evaluar el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno en los medios de fermentación sólido que ayuden a maximizar la producción enzimática.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdullah, R., Farooq, I., Kaleem, A., Iqtedar, M., & Iftikhar, T. (2018). Pectinase production from *Aspergillus niger* IBT-7 using solid state fermentation. *Bangladesh Journal of Botany*, 47(3), 473-478. <https://doi.org/10.3329/bjb.v47i3.38714>
- Abou-Taleb, K., Mashhoor, W., Nasr, S., Sharaf, M., & Abdel-Azeem, H. (2009). Nutritional and Environmental Factors Affecting Cellulase Production by Two Strains of Cellulolytic Bacilli. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3, 2429-2436.
- Acharya, S., & Chaudhary, A. (2012). Bioprospecting thermophiles for cellulase production: A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(3), 844-856. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000300001>
- Acuña-Argüelles, M. E., Gutiérrez-Rojas, M., Viniegra-González, G., & Favela-Torres, E. (1995). Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43(5), 808-814. <https://doi.org/10.1007/bf02431912>
- Aehle, W. (2007). *Enzymes in Industry: Production and Applications, Third Edition*. <http://gen.lib.rus.ec/book/index.php?md5=f64abfa787f15623b81ea7f082c67cd0>
- Ajila, C. M., & Prasada Rao, U. J. S. (2013). Mango peel dietary fibre: Composition and associated bound phenolics. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 444-450. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.11.017>
- Alrumman, S. A. (2016). Enzymatic saccharification and fermentation of cellulosic date palm wastes to glucose and lactic acid. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(1), 110-119. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.015>
- Alshelmani, M. I., Loh, T. C., Foo, H. L., Lau, W. H., & Sazili, A. Q. (2013). Characterization of Cellulolytic Bacterial Cultures Grown in Different Substrates. *The Scientific World Journal*, 2013, 1-6. <https://doi.org/10.1155/2013/689235>
- Amaeze, N. J., Okoliegbe, I. N., & Francis, M. E. (2015). *Cellulase production by Aspergillus niger and Saccharomyces cerevisiae using fruit wastes as substrates*. 3, 36-44.
- Amin, F. R., Khalid, H., Zhang, H., Rahman, S. u., Zhang, R., Liu, G., & Chen, C. (2017). Pretreatment methods of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. *AMB Express*, 7(1), 72. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0375-4>
- Ang, S. K., E.m., S., Y., A., A.a, S., & M.s, M. (2013). Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 48(9), 1293-1302. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.06.019>
- Anthon, G. E., & Barrett, D. M. (2006). Characterization of the Temperature Activation of Pectin Methyltransferase in Green Beans and Tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(1), 204-211. <https://doi.org/10.1021/jf051877q>

- Arora, D. K. (2003). *Handbook of Fungal Biotechnology*. CRC Press.
- Association Of Official Analytical Chemists (AOAC). (1990). *Official Methods Of Analysis* (5.^a ed., Vol. 1). <https://law.resource.org/pub/us/cfr/ibr/002/aoac.methods.1.1990.pdf>
- Ayala-Zavala, J. F., Rosas-Domínguez, C., Vega-Vega, V., & González-Aguilar, G. A. (2010). Antioxidant Enrichment and Antimicrobial Protection of Fresh-Cut Fruits Using Their Own Byproducts: Looking for Integral Exploitation. *Journal of Food Science*, 75(8), R175-R181. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01792.x>
- Azevedo, L. C., Azqubel, P. M., Silva, I., Araújo, A. J., & Oliveira, S. (2008). *Caracterização físico-química da farinha da casca de manga cv. Tommy atkins*. CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 21. SEMINÁRIO LATINO AMERICANO E DO CARIBE DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, Belo Horizonte. <http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=161391&biblioteca=vazio&busca=161391&qFacets=161391&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1>
- Banerjee, J., Singh, R., Vijayaraghavan, R., MacFarlane, D., Patti, A. F., & Arora, A. (2018). A hydrocolloid based biorefinery approach to the valorisation of mango peel waste. *Food Hydrocolloids*, 77, 142-151. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.09.029>
- Banerjee, J., Vijayaraghavan, R., Arora, A., MacFarlane, D. R., & Patti, A. F. (2016). Lemon Juice Based Extraction of Pectin from Mango Peels: Waste to Wealth by Sustainable Approaches. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4(11), 5915-5920. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b01342>
- Barense, R. I., Chellegatti, M. A. dos S. C., Fonseca, M. J. V., & Said, S. (2001). Partial purification and characterization of exopolygalacturonase II and III of *Penicillium frequentans*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32(4), 327-330. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822001000400014>
- BeMiller, J. N. (1986). An Introduction to Pectins: Structure and Properties. En M. L. Fishman & J. J. Jen (Eds.), *Chemistry and Function of Pectins* (Vol. 310, pp. 2-12). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk-1986-0310.ch001>
- Berardini, N., Knödler, M., Schieber, A., & Carle, R. (2005). Utilization of mango peels as a source of pectin and polyphenolics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6(4), 442-452. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2005.06.004>
- Bhat, M. K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology advances*, 18(5), 355-383.
- Bos, A., & Hamelinck, C. (2014). *Greenhouse gas impact of marginal fossil fuel use*. Project number: BIENL14773 2014. http://www.euoilseed.org/fileadmin/webmaster-fichiers/Studies___reports/ecofys-2014-ghg-impact-of-marginal-fossil-fuels.pdf
- Brahmachari, G., Demain, A. L., & Adrio, J. L. (Eds.). (2017). *Biotechnology of microbial enzymes: Production, biocatalysis and industrial applications*. Academic Press, an imprint of Elsevier.

Braver, S. L., MacKinnon, D. P., & Page, M. (2003). *Levine's Guide to SPSS for Analysis of Variance*. Psychology Press.

Browning, B. L. (1967). *Methods of wood chemistry*. John Wiley & Sons, Incorporated.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pol.1968.160061112/abstract>

Campbell. (2005). *Biology* (Vol. 7).
<http://gen.lib.rus.ec/book/index.php?md5=A9F82C403CCBA85F86224E5F8B925993>

Carreño Pineda, L. D., Caicedo Mesa, L. A., & Martínez Riascos, C. A. (2012). Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: Una revisión. *Ingeniería y Ciencia*, 8(16).

Casimiro, M., León, C., & Sánchez, T. (2017). *Boletín Estadístico de Producción Agroindustrial Agroalimentaria*. Dirección de estadística Agraria.

Castilho, L. R., Medronho, R. A., & Alves, T. L. M. (2000). Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 71(1), 45-50.
[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00058-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00058-9)

Cerda, A., Artola, A., Barrena, R., Font, X., Gea, T., & Sánchez, A. (2019). Innovative Production of Bioproducts From Organic Waste Through Solid-State Fermentation. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00063>

Colla, E., Santos, L. O., Deamici, K., Magagnin, G., Vendruscolo, M., & Costa, J. A. V. (2017). Simultaneous Production of Amyloglucosidase and Exo-Polygalacturonase by *Aspergillus niger* in a Rotating Drum Reactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 181(2), 627-637. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2237-y>

Contreras Esquivel, J. C., & Voget, C. E. (2004). Purification and partial characterization of an acidic polygalacturonase from *Aspergillus kawachii*. *Journal of Biotechnology*, 110(1), 21-28. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.01.010>

Coradi, G. V., Visitação, V. L. da, Lima, E. A. de, Saito, L. Y. T., Palmieri, D. A., Takita, M. A., Neto, P. de O., & Lima, V. M. G. de. (2013). Comparing submerged and solid-state fermentation of agro-industrial residues for the production and characterization of lipase by *Trichoderma harzianum*. *Annals of Microbiology*, 63(2), 533-540.
<https://doi.org/10.1007/s13213-012-0500-1>

Cunningham, R. E. (ed), & Lopez, G. D. (ed). (1994). *Etanol de lignocelulosicos: Tecnologia y perspectivas*. http://agris.fao.org/agris-search/search.do?jsessionid=3092E170C35EC9AB9148697E1190FB46?request_locale=ru&recordID=XF2015035465&query=&sourceQuery=&sortField=&sortOrder=&agrovocString=&advQuery=¢erString=&enableField=

Dabhi, B. K., Vyas, R. V., & Shelat, H. N. (2014). Use of banana waste for the production of cellulolytic enzymes under solid substrate fermentation using bacterial consortium. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 3(1), 337-346.

de Vries, R. P., & Visser, J. (2001). Aspergillus Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(4), 497-522. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.4.497-522.2001>

Deepa, B., Abraham, E., Cherian, B. M., Bismarck, A., Blaker, J. J., Pothan, L. A., Leao, A. L., de Souza, S. F., & Kottaisamy, M. (2011). Structure, morphology and thermal characteristics of banana nano fibers obtained by steam explosion. *Bioresource Technology*, 102(2), 1988-1997. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.030>

Delabona, P. da S., Pirota, R. D. P. B., Codima, C. A., Tremacoldi, C. R., Rodrigues, A., & Farinas, C. S. (2012). Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. *Biomass and Bioenergy*, 37, 243-250. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.12.006>

Devi, N. A., & Rao, A. A. (1996). Fractionation, purification, and preliminary characterization of polygalacturonases produced by *Aspergillus carbonarius*. *Enzyme and Microbial Technology*, 18(1), 59-65.

Dinu, D., Nechifor, M. T., Stoian, G., Costache, M., & Dinischiotu, A. (2007). Enzymes with new biochemical properties in the pectinolytic complex produced by *Aspergillus niger* MIUG 16. *Journal of Biotechnology*, 131(2), 128-137. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.06.005>

Dutta, R. (2008). *Fundamentals of biochemical engineering*. Ane Books India ; Springer.

Ellaiah, P., Srinivasulu, B., & Adinarayana, K. (2002). A Review on Microbial Alkaline Proteases. *JSIR Vol.61(09) [September 2002]*. <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/26375>

Fariq, A. (2016). Microbial Cellulases: Production and Applications. *Journal of Biotechnology Science Research*, 3(1).

Festucci-Buselli, R. A., Otoni, W. C., & Joshi, C. P. (2007). Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19(1), 1-13.

Gacesa, P., & Hubble, J. (1992). *Enzymtechnologie*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-77314-3>

Gadre, R. V., Van Driessche, G., Van Beeumen, J., & Bhat, M. K. (2003). Purification, characterisation and mode of action of an endo-polygalacturonase from the psychrophilic fungus *Mucor flavus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(2), 321-330.

Gao, J., Weng, H., Zhu, D., Yuan, M., Guan, F., & Xi, Y. (2008). Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. *Bioresource Technology*, 99(16), 7623-7629. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.02.005>

- Gervais, P., & Molin, P. (2003). The role of water in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2), 85-101. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00122-5](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00122-5)
- Ghose, T. K. (1987). *Measurement of cellulase Activities*. 59(2), 257-268.
- Girma, E., & Worku, T. (2016). Extraction and Characterization of Pectin From Selected Fruit Peel Waste. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 6(2), 2250-3153.
- Gondim, J. A. M., Moura, M. de F. V., Dantas, A. S., Medeiros, R. L. S., & Santos, K. M. (2005). Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25(4), 825-827. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612005000400032>
- Gragasin, M. C. B., Ligisan, A. R., Torres, R., & Estrella, R. (2014). Utilization of Mango Peels as Source of Pectin. PHilMech Technical Bulletin. *Philippine Center for Postharvest Development and Mechanization*, 4(1), 20.
- Gutiérrez, S. (2009). *Obtencion de Bioetanol a partir del Mango criollo del ISTMO de Tehuantepec* [Tesis para obtener el título de Ingeniero Químico, Universidad del Istmo]. <https://es.scribd.com/document/225266983/Obtencion-de-Bio-Etaol-Mango>
- Harholt, J., Suttangkakul, A., & Vibe Scheller, H. (2010). Biosynthesis of Pectin. *PLANT PHYSIOLOGY*, 153(2), 384-395. <https://doi.org/10.1104/pp.110.156588>
- Hincapié, G., Vásquez, D., Galicia, V., & Hincapié, C. (2014). *Propiedades Técnico-Funcionales de la fibra dietaria de cáscaras de mango variedad hilacha (Mangifera indica l.): Efecto del secado por convección*. 12(1), 153-160.
- Holm, J., Björck, I., Drews, A., & Asp, N.-G. (1986). A Rapid Method for the Analysis of Starch. *Starch - Stärke*, 38(7), 224-226. <https://doi.org/10.1002/star.19860380704>
- Idrees, M., Adnan, A., Bokhari, S. A., & Qureshi, F. A. (2014). Production of fermentable sugars by combined chemo-enzymatic hydrolysis of cellulosic material for bioethanol production. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 31(2), 355-363. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20140312s00002415>
- Immanuel, G., Dhanusha, R., Prema, P., & Palavesam, A. (2006). Effect of different growth parameters on endoglucanase enzyme activity by bacteria isolated from coir retting effluents of estuarine environment. *International Journal of Environmental Science & Technology*, 3(1), 25-34. <https://doi.org/10.1007/BF03325904>
- Iqbal, H., Asgher, M., Ahmed, I., & Hussain, S. (2010). Media Optimization for Hyperproduction of Carboxymethyl Cellulase using proximally analyzed agro-industrial residue with *Trichoderma harzianum* under SSF. *International Journal for Agro Veterinary and Medical Sciences*, 4(2), 47-55.
- Jacob, N., Ashapoorna, C., & Prema, P. (2008). Purification and partial characterization of polygalacturonase from *Streptomyces lydicus*. *Bioresource Technology*, 99(14), 6697-6701. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.10.002>

- Jahid, M., Gupta, A., & Sharma, D. K. (2018). Production of Bioethanol from Fruit Wastes (Banana, Papaya, Pineapple and Mango Peels) Under Milder Conditions. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 08(03). <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000327>
- Jamsazzadeh Kermani, Z., Shpigelman, A., Pham, H. T. T., Van Loey, A. M., & Hendrickx, M. E. (2015). Functional properties of citric acid extracted mango peel pectin as related to its chemical structure. *Food Hydrocolloids*, 44, 424-434. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.10.018>
- Juturu, V., & Wu, J. C. (2012). Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1219-1227. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.11.006>
- Kakde, P. R., & Aithal, S. C. (2018). Production of cellulases through Solid State Fermentation (SSF) using agricultural waste biomass as solid substrates by *Aspergillus niger*. *International Journal of Scientific Research in Biological Sciences*, 5(4), 8-11.
- Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S., & Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: A review. *Bioresource technology*, 77(3), 215-227.
- Khan, J. A., & Singh, S. K. (2011). Production of cellulase using cheap substrates by solid state fermentation. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 1(3), 179-187.
- Khatri, B., Bhattarai, T., Shrestha, S., & Maharjan, J. (2015). Alkaline thermostable pectinase enzyme from *Aspergillus niger* strain MCAS2 isolated from Manaslu Conservation Area, Gorkha, Nepal. *SpringerPlus*, 4, 488. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1286-y>
- Kobayashi, T., Higaki, N., Yajima, N., Suzumatsu, A., Hagihara, H., Kawai, S., & Ito, S. (2001). Purification and Properties of a Galacturonic Acid-releasing Exopolygalacturonase from a Strain of *Bacillus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65(4), 842-847. <https://doi.org/10.1271/bbb.65.842>
- Kucharska, K., Słupek, E., Cieśliński, H., & Kamiński, M. (2020). Advantageous conditions of saccharification of lignocellulosic biomass for biofuels generation via fermentation processes. *Chemical Papers*, 74(4), 1199-1209. <https://doi.org/10.1007/s11696-019-00960-1>
- Kulkarni, N., Vaidya, T., & Rathi, G. (2018). Optimization of cellulase production by *Aspergillus* species under solid state fermentation. *The Pharma Innovation Journal*, 7, 193-196. <https://doi.org/10.22271/tpi>
- Kumar, A., Dutt, D., & Gautam, A. (2016). Production of crude enzyme from *Aspergillus nidulans* AKB-25 using black gram residue as the substrate and its industrial applications. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 14(1), 107-118. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.06.004>
- Kumar, Y. S., Kumar, P. V., & Reddy, O. V. S. (2012). Pectinase Production from Mango Peel Using *Aspergillus foetidus* and its Application in Processing of Mango

Juice. *Food Biotechnology*, 26(2), 107-123.
<https://doi.org/10.1080/08905436.2012.670830>

Kusters-van Someren, M. A., Samson, R. A., & Visser, J. (1991). The use of RFLP analysis in classification of the black *Aspergilli*: Reinterpretation of the *Aspergillus niger* aggregate. *Current Genetics*, 19(1), 21-26.

Ladeira, S., Cruz, E., Delatorre, A., Barbosa, J., & Leal, M. (2015). Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and its detergent compatibility. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(2), 110-115.
<https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.12.008>

Llenque, L., Muñoz, M., Espejo, E., & Moreno, A. (2016). Producción de celulasas por *Aspergillus niger* a partir de bagazo de caña de azúcar en biorreactor aireado. *Revista CIENCIA Y TECNOLOGÍA*, 11(4), 39-49.

Lo, Y.-C., Saratale, G. D., Chen, W.-M., Bai, M.-D., & Chang, J.-S. (2009). Isolation of cellulose-hydrolytic bacteria and applications of the cellulolytic enzymes for cellulosic biohydrogen production. *Enzyme and Microbial Technology*, 44(6), 417-425. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.03.002>

Luz, J. A. (2018). *Produção de Enzimas por Fermentação em Estado Sólido utilizando Aspergillus niger, a partir de Resíduos de Croton linearifolius*. [Dissertação de Mestrado em Ciências Ambientais - Área de Concentração em Meio Ambiente e Desenvolvimento.]. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Macarulla, J. M., & Goñi, F. M. (1994). *Bioquímica humana: Curso básico*. Reverte.

Maki, M. L., Broere, M., Leung, K. T., & Qin, W. (2011). Characterization of some efficient cellulase producing bacteria isolated from paper mill sludges and organic fertilizers. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2(2), 146-154.

Mamma, D., Kourtoglou, E., & Christakopoulos, P. (2008). Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. *Bioresource Technology*, 99(7), 2373-2383. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.018>

Marques, A., Chicaybam, G., Araujo, M. T., Manhães, L. R. T., & Sabaa-Srur, A. U. O. (2010). Composição centesimal e de minerais de casca e polpa de manga (*Mangifera indica* L.) cv. Tommy Atkins. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 32(4), 1206-1210. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452010005000117>

Martins, E. S., Silva, D., Leite, R. S. R., & Gomes, E. (2007). Purification and characterization of polygalacturonase produced by thermophilic *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 in submerged fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 91(3), 291-299. <https://doi.org/10.1007/s10482-006-9114-6>

Martos, M. A., Martinez Vazquez, F., Benassi, F. O., & Hours, R. A. (2009). Production of pectinases by *A. niger*: Influence of fermentation conditions. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(3), 567-572. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132009000300007>

- Melandani, L., Eniek, K., & Made, R. (2017). Kinship analysis of mango plants (*Mangifera* spp) based on morphological and anatomical characteristics of foliage. *JURNAL SIMBIOSIS*, 5(1), 7-10.
- Miller, G. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.*, 31(3), 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mostafa, F. A., Ahmed, S. A., & Helmy, W. A. (2013). *Enzymatic Saccharification of Pretreated Lemon Peels for Fermentable Sugar Production*. 11.
- Mrudula, S., & Murugammal, R. (2011). Production of cellulase by *Aspergillus niger* under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 42, 1119-1127. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220110003000033>
- Neto, B. de B., Scarminio, I. S., & Bruns, R. E. (1995). *Planejamento e otimização de experimentos*. Editora da UNICAMP.
- Niture, S. K., & Pant, A. (2004). Purification and biochemical characterization of polygalacturonase II produced in semi-solid medium by a strain of *Fusarium moniliforme*. *Microbiological Research*, 159(3), 305-314. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.06.002>
- Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Nielsen, K. F., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2008). Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand. *International Journal of Food Microbiology*, 128(2), 197-202. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.005>
- Ortega, N., de Diego, S., Perez-Mateos, M., & Busto, M. D. (2004). Kinetic properties and thermal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification. *Food Chemistry*, 88(2), 209-217. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.035>
- Oughlis, F., Hamaidi-Maouche, N., Aissani-Benissad, F., & Bourouina, S. (2010). Central Composite Design for the Modeling of the Phenol Adsorption Process in a Fixed-Bed Reactor. *Journal of Chemical and Engineering Data - J CHEM ENG DATA*, 55. <https://doi.org/10.1021/je900868v>
- Pandey, A., Soccol, C. R., & Larroche, C. (Eds.). (2007). *Current developments in solid-state fermentation*. Springer/Asiatech Publishers.
- Paredes, D., Álvarez, M., & Silva, M. (2010). *Obtención de Enzimas Celulasas por Fermentación Sólida de Hongos para ser Utilizadas en el Proceso de Obtención de Bioalcohol*. 23, 81-88.
- Patagundi, B. I., Shivasharan, C. T., & Kaliwal, B. B. (2014). Isolation and characterization of cellulase producing bacteria from soil. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(5), 59-69.
- Patel, P. M. (2017). *Extraction of Pectin from Mango Peel and Application of Pectin*. 2.

- Pawar, H. A. (2014). An Overview of Natural Polysaccharides as Biological Macromolecules: Their Chemical Modifications and Pharmaceutical Applications. *Biology and Medicine*, 07(01). <https://doi.org/10.4172/0974-8369.1000224>
- Pedrolli, D. B. (2008). *Caracterização físico-química de pectinases extracelulares purificadas de Aspergillus giganteus*.
- Pedrolli, D. B., Monteiro, A. C., Gomes, E., & Carmona, E. C. (2009). Pectin and Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes. *The Open Biotechnology Journal*, 3(1), 9-18. <https://doi.org/10.2174/1874070700903010009>
- Phuengjayaem, S., & Teeradakorn, S. (2011). *SACCHARIFICATION OF ACID-PRETREATED SWEET SORGHUM STRAW BY CELLULASE FOR BIOETHANOL PRODUCTION*. 13, 5.
- Pirota, R. D. P. B., Delabona, P. S., & Farinas, C. S. (2014). Simplification of the Biomass to Ethanol Conversion Process by Using the Whole Medium of Filamentous Fungi Cultivated Under Solid-State Fermentation. *BioEnergy Research*, 7(2), 744-752. <https://doi.org/10.1007/s12155-013-9406-4>
- Rodríguez-Fernández, D. E., Rodríguez-León, J. A., de Carvalho, J. C., Sturm, W., & Soccol, C. R. (2011). The behavior of kinetic parameters in production of pectinase and xylanase by solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 102(22), 10657-10662. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.106>
- Romelle, F. D., Ashwini Rani, P., & Manohar, R. S. (2016). Chemical composition of some selected fruit peels. *European Journal of Food Science and Technology* 4 (4), 12-21.
- Rosero Noguera, R., & Posada Ochoa, S. L. (2007). Modelación de la cinética de degradación de alimentos para rumiantes. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 20(2).
- Rowell, R. (2012). *Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites* (2.^a ed.). CRC Press. <https://www.crcpress.com/Handbook-of-Wood-Chemistry-and-Wood-Composites-Second-Edition/Rowell/p/book/9781439853801>
- Rybka, A., Lima, A., & Nassur, R. (2018). Caracterização da farinha da casca de diferentes cultivares de manga. *Enciclopédia Biosfera*, 15(27), 12-21. https://doi.org/10.18677/EnciBio_2018A25
- Sadh, P. K., Duhan, S., & Duhan, J. S. (2018). Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: A review. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0187-z>
- Saha, B. C., & Cotta, M. A. (2008). Lime pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of rice hulls to ethanol. *Biomass and Bioenergy*, 32(10), 971-977. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2008.01.014>

- Saito, K., Takakuwa, N., & Oda, Y. (2004). Purification of the extracellular pectinolytic enzyme from the fungus *Rhizopus oryzae* NBRC 4707. *Microbiological Research*, 159(1), 83-86. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.01.001>
- Sánchez Orozco, R., Balderas Hernández, P., Roa Morales, G., Ureña Núñez, F., Orozco Villafuerte, J., Lugo Lugo, V., Flores Ramírez, N., Barrera Díaz, C. E., & Cajero Vázquez, P. (2014). Characterization of Lignocellulosic Fruit Waste as an Alternative Feedstock for Bioethanol Production. *BioResources*, 9(2), 1873-1885. <https://doi.org/10.15376/biores.9.2.1873-1885>
- Sancho-Madriz, M. (2003). *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (2.^a ed.). Academic Press. <https://www.sciencedirect.com/referencework/9780122270550/encyclopedia-of-food-sciences-and-nutrition>
- Sartori, T., Tibolla, H., Prigol, E., Colla, L. M., Costa, J. A. V., & Bertolin, T. E. (2015). Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Residues by Cellulases Obtained from Solid State Fermentation Using *Trichoderma viride*. *BioMed Research International*, 2015, e342716. <https://doi.org/10.1155/2015/342716>
- Saucedo-Luna, J., Castro-Montoya, A. J., Martínez-Pacheco, M. M., Sosa-Aguirre, C. R., & Campos-García, J. (2011). Efficient chemical and enzymatic saccharification of the lignocellulosic residue from *Agave tequilana* bagasse to produce ethanol by *Pichia caribbica*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(6), 725-732. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0853-z>
- Saúco, V. G. (2009). *El cultivo del mango*. Mundi-Prensa Libros.
- Sema-Cock, L., Torres-León, C., & Ayala-Aponte, A. (2015). Efecto de la Adición de Edulcorantes no Calóricos sobre las Propiedades Fisicoquímicas y la Cinética de Secado de Cáscara de Mango Liofilizado. *Información tecnológica*, 26(4), 37-44. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642015000400006>
- Serna Cock, L., & Torres León, C. (2014). Potencial agroindustrial de cáscaras de mango de las variedades Keitt, y Tommy Atkins (*Mangifera indica*): Agro industrial potential of peels of mango (*mangifera indica*) Keitt and Tommy Atkins. *Acta Agronómica*, 64(2), 110-115. <https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.43579>
- Serna-Cock, L., García-Gonzales, E., & Torres-León, C. (2016). Agro-industrial potential of the mango peel based on its nutritional and functional properties. *Food Reviews International*, 32(4), 364-376. <https://doi.org/10.1080/87559129.2015.1094815>
- Sethi, S., Datta, A., Gupta, B. L., & Gupta, S. (2013). *Optimization of Cellulase Production from Bacteria Isolated from Soil* [Research article]. International Scholarly Research Notices. <https://doi.org/10.5402/2013/985685>
- Shevnik, V., & Hugouvieux-Cotte, P. (1997). Identification of a bacterial pectin acetyl esterase in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Molecular Microbiology*, 24(6), 1285-1301. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.4331800.x>

- Siddiqui, M. A., Pande, V., & Arif, M. (2012). *Production, Purification, and Characterization of Polygalacturonase from Rhizomucor pusillus Isolated from Decomposting Orange Peels* [Research article]. *Enzyme Research*. <https://doi.org/10.1155/2012/138634>
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Sukumaran, R. K., Larroche, C., & Pandey, A. (2013). Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource Technology*, *127*, 500-507. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.012>
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., & Templeton, D. (2006). Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. *Golden: National Renewable Energy Laboratory*.
- Sluiter, Amie, Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., & Crocker, D. (2008). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *Laboratory analytical procedure*, *1617*, 1-16.
- Statistica. (2018). *Global share of wasted food types 2017*. Statista. <https://www.statista.com/statistics/519611/percentage-of-wasted-food-by-category-global/>
- Sundarram, A., & Murthy, T. P. K. (2014). α -Amylase Production and Applications: A Review. *Journal of Applied & Environmental Microbiology, Journal of Applied & Environmental Microbiology*, *2*(4), 166-175. <https://doi.org/10.12691/jaem-2-4-10>
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal*. Universitat Jaume I.
- Tapre, A., & Jain, R. (2014). Pectinases: Enzymes for fruit processing industry. *International Food Research Journal*, *22*(2), 447-453.
- Targonski, Z. (1985). *Alkali process for enhancing susceptibility of autohydrolysed beech sawdust to enzymatic hydrolysis—ScienceDirect*. *7*(3), 126-128.
- Théodore, K., & Panda, T. (1995). Application of response surface methodology to evaluate the influence of temperature and initial pH on the production of β -1,3-glucanase and carboxymethylcellulase from *Trichoderma harzianum*. *Enzyme and Microbial Technology*, *17*(12), 1043-1049. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)00029-8](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)00029-8)
- Verma, V., Verma, A., & Kushwaha, A. (2012). Isolation and production of cellulase enzyme from bacteria isolated from agricultural fields in district Hardoi, Uttar Pradesh, India. *Adv Appl Sci Res*, *3*, 171-174.
- Waghmare, P., Kshirsagar, S., Saratale, R., & Saratale, S. (2014). Production and characterization of cellulolytic enzymes by isolated *Klebsiella* sp. PRW-1 using agricultural waste biomass. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, *26*(1), 44. <https://doi.org/10.9755/ejfa.v26i1.15296>
- Wong, D. W. S. (1995). *Food Enzymes*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2349-6>

Wong, J. W.-C., Tyagi, R. D., & Pandey, A. (2016). *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Solid Waste Management* (1.^a ed.). Elsevier. <http://gen.lib.rus.ec/book/index.php?md5=c18911a02de94e149adbfb20d4229f62>

Yepes, S., Montoya, L., & Orozco, F. (2008). Valorización de residuos agroindustriales–frutas–en Medellín y el sur del valle del Aburrá, Colombia. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*, 61(1), 4422-4431.

Yin, L.-J., Huang, P.-S., & Lin, H.-H. (2010). Isolation of cellulase-producing bacteria and characterization of the cellulase from the isolated bacterium *Cellulomonas* sp. YJ5. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(17), 9833-9837. <https://doi.org/10.1021/jf1019104>

Yingkamhaeng, N., & Sukyai, P. (2014). *The potential of mango peel utilization for cellulose extraction by hydrothermal pretreatment*. The 26th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference, Thailand.

Zykwinska, A., Thibault, J.-F., & Ralet, M.-C. (2007). Organization of pectic arabinan and galactan side chains in association with cellulose microfibrils in primary cell walls and related models envisaged. *Journal of Experimental Botany*, 58(7), 1795-1802. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm037>

ANEXOS

ANEXO N° 1

Caracterización de las cáscaras de mango

1. Determinación de humedad

Para realizar la determinación de la humedad se realizó el método de desecación por estufa a 105 ± 1 °C hasta obtener el peso constante de la muestra. Se pesó aproximadamente 1 g de la muestra de cáscara de mango seca en papeles de aluminio previamente pesados y secados. La muestra de cáscara de mango se mantuvo en desecación durante 3 h, para luego dejar enfriar a temperatura ambiente y por último registrar el peso. El análisis de determinación de humedad se realizó por triplicado y los pesos son registrados en la Tabla.

Tabla 15. Resultados del porcentaje de humedad de la muestra de cáscara de mango.

Muestra	Peso de la muestra (g)	Peso de la muestra seca (g)	Porcentaje de humedad de la muestra (%)
1	1.0003	0.2524	74.79
2	1.0001	0.2529	74.74
3	1.0004	0.2538	74.66
Promedio			74.72

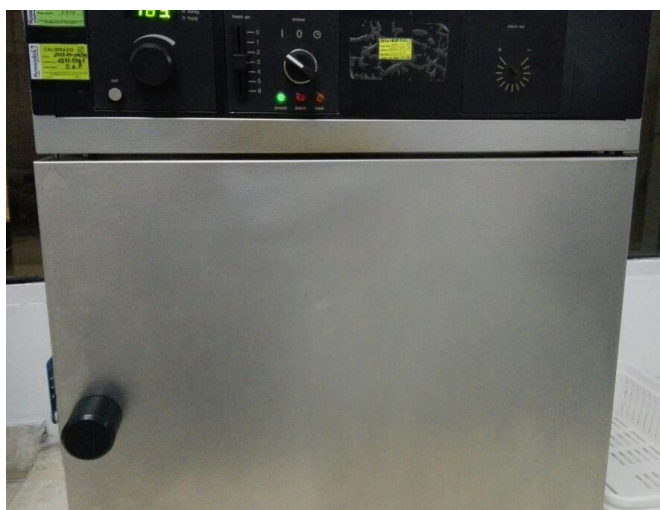


Figura 18. Secado de la muestra de cáscara de mango en horno de convección a 105 °C.

2. Determinación de cenizas

Para la determinación de cenizas fue realizada utilizando la metodología 942.05/90 de la AOAC, 1990, la cual consiste en secar la muestra a 110°C en una estufa de convección y posteriormente llevados a una mufla para ser calcinados a 550°C, hasta que la muestra presente un color grisáceo.

Tabla 16. Resultados del porcentaje de cenizas de la muestra de cáscara de mango.

Muestra	Peso de la muestra seca (g)	Peso de la muestra incinerada (g)	Porcentaje de cenizas (%)
1	0.2378	0.0056	2.354
2	0.2341	0.0061	2.605
3	0.2354	0.0059	2.506
Promedio			2.5



Figura 19. Incineración de las muestras de cáscara de mango en mufla a 550 °C para el análisis de ceniza

3. Determinación de proteínas

El porcentaje de proteína fue analizado mediante el método Kjeldahl (AOAC 988.05), con algunas modificaciones. El procedimiento es detallado a continuación:

Digestión

Introducir 1 g de la muestra a analizar al balón de digestión, incluyendo 1 g de sulfato de potasio, 12 g de sulfato de cobre y 25 mL de ácido sulfúrico al 95%. Conectar el balón de digestión al ducto extractor de gases e iniciar la digestión a una temperatura de 350 °C. La digestión finaliza cuando la muestra pasa a ser totalmente transparente con un ligero color esmeralda debido al Cu del catalizador. Dejar en reposo hasta temperatura ambiente y añadir 300 mL de agua destilada y 10 mL de soda al 40%, hasta el cambio de color esmeralda a marrón oscuro. La solución resultante estará lista para destilación.

Destilación

En la destilación, se llevará a cabo la liberación del amoníaco y la captura de este en ácido. Se procedió a colocar el balón sobre la cocina, conectado a un sistema de destilación simple con conexión hacia otro recipiente conteniendo 25 mL de ácido sulfúrico al 0.25 N. Añadir previamente al ácido 5 gotas del indicador rojo de metilo. El proceso de destilación termina hasta obtener aproximadamente 250 mL de muestra, cuando el NH₃ reacciona con el ácido sulfúrico, la solución vira de violeta a un tono amarillo verdoso debido al cambio del indicador al pasar de la forma ácida a la forma básica.

Titulación

La solución resultante será titulada con hidróxido de sodio al 0.1 N hasta el cambio de fase de color a un tono rosa.

Los resultados de los análisis realizados y sus replicaciones están especificados en la Tabla. La fórmula aplicada al cálculo del % de Nitrógeno fue expresada de la siguiente forma:

$$\%Nitrógeno = \frac{\text{Gasto en mL del Hidróxido de sodio} \cdot N \cdot 0.014}{p} * 100 \quad (14)$$

Donde, p es el peso de la muestra en g, N la normalidad del hidróxido de sodio. Por otro lado, el porcentaje de proteínas es estimado mediante la siguiente ecuación.

$$\%Proteínas = \% Nitrógeno * 6.25 \quad (15)$$

Tabla 17. Resultados del porcentaje de proteínas de la muestra de cáscara de mango seca

Muestras	Gasto en mL de hidróxido de sodio al 0.1 N	%Nitrógeno	%Proteína
1	26.14	0.366	2.287
2	26.93	0.377	2.356
3	27.07	0.379	2.368
Promedio			2.34

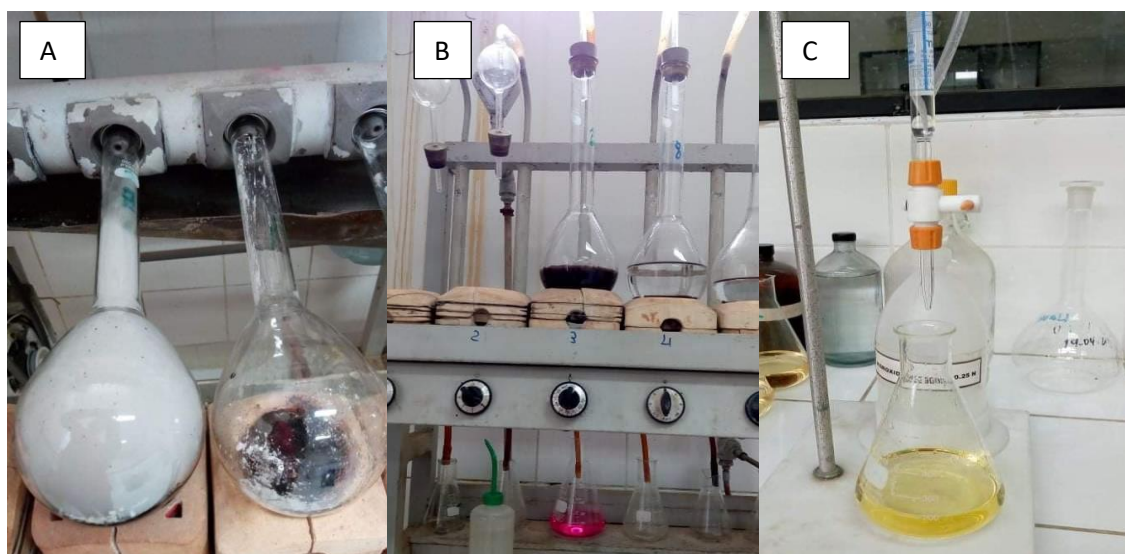


Figura 20. Representación gráfica para la determinación de proteína. A. Balones de vidrio con muestra tratada luego de la digestión; B. Proceso de destilación; C. Titulación de la muestra.

4. Determinación de grasa

La determinación de grasa se realizó utilizando el Método de Soxhlet, utilizando como solvente el hexano, según A.O.A.C. (1994). El procedimiento es detallado a continuación:

Pesar un balón de vidrio de 250 mL haciendo uso de una balanza analítica y anotar su peso. Sobre un papel filtro pesar 2 g de muestra de cáscara de mango seca y posteriormente sellar el papel filtro con material dentro. Llevar el cartucho de papel filtro e insértalo dentro del sifón del equipo de extracción Soxhlet. Luego, medir 180 mL de hexano y colocarlo en el balón. Ensamblar el balón con hexano, el sifón con muestra a analizar y condensador, luego

del ensamblado, proceder a encender la cocina acoplada al balón y abrir la llave de flujo de agua conectado al condensador para refrigeración. Mantener el sifonado durante 4 horas (15 sifoneos por hora) y luego apagar la cocina y retirar el balón. Se retiró el balón y se removió el exceso de solvente, luego de ello se colocó el balón a secado por 2 h en una estufa a 103 °C. Pasado el tiempo de secado, fue trasladado a un desecador hasta presentar peso constante. Se hizo el cálculo del peso del balón antes y después de la extracción de grasa.

Tabla 18. Resultados del porcentaje de grasa de la muestra de cáscara de mango seca.

Muestra	Peso de la muestra (g)	Peso del balón (g)	Peso final de la muestra (g)	%Grasa
1	2.0013	116.7422	116.7936	2.568
2	2.0008	116.7427	116.7941	2.569
3	2.0004	116.7418	116.7934	2.579
Promedio				2.572

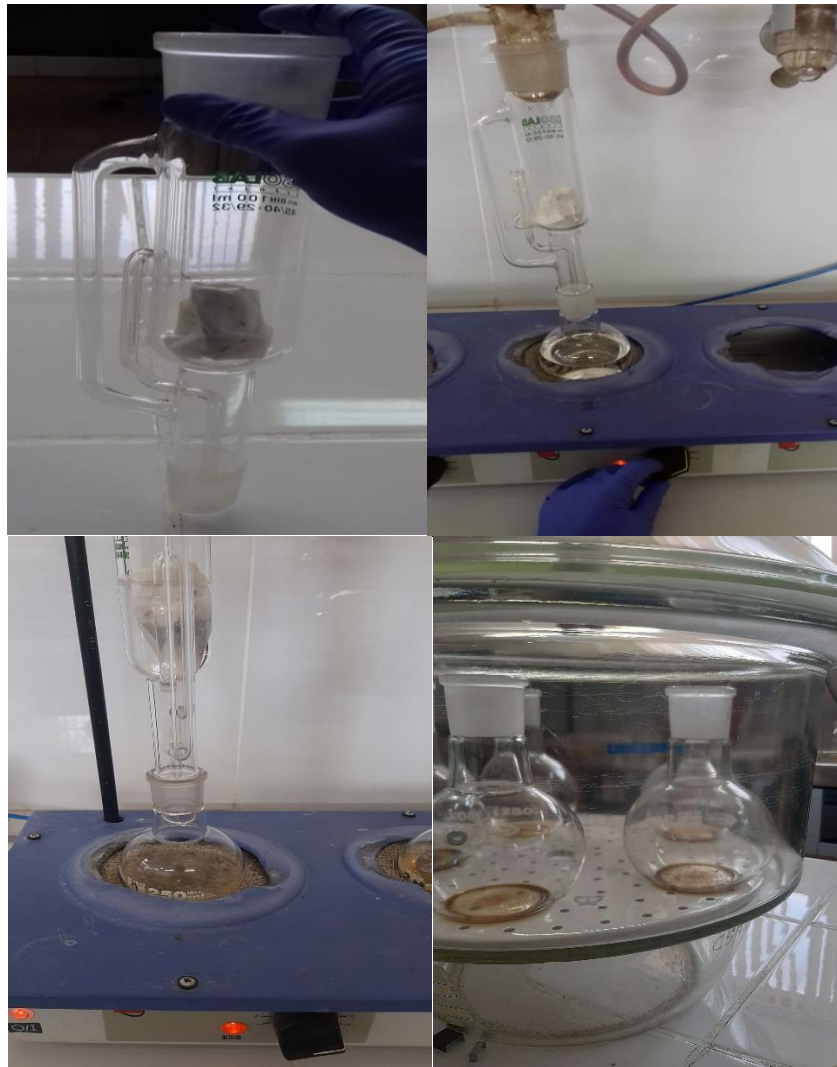


Figura 21. Representación gráfica de la extracción de grasa de la cáscara de mango a través del equipo Soxhlet.

5. Determinación del contenido de fibra

5.1. Determinación del contenido de pectina

Los resultados del porcentaje de pectina extraída en cáscara están especificados en la Tabla.

Tabla 19. Resultados del porcentaje de pectina en la muestra de cáscara de mango seca

Muestra	Peso de la muestra seca (g)	Peso del papel filtro (g)	Peso final de la muestra (g)	Porcentaje de pectina (%)
1	3.0012	0.8492	1.1742	10.82
2	3.0017	0.8521	1.1699	10.58
3	3.0006	0.8312	1.1348	10.11
Promedio				10.51

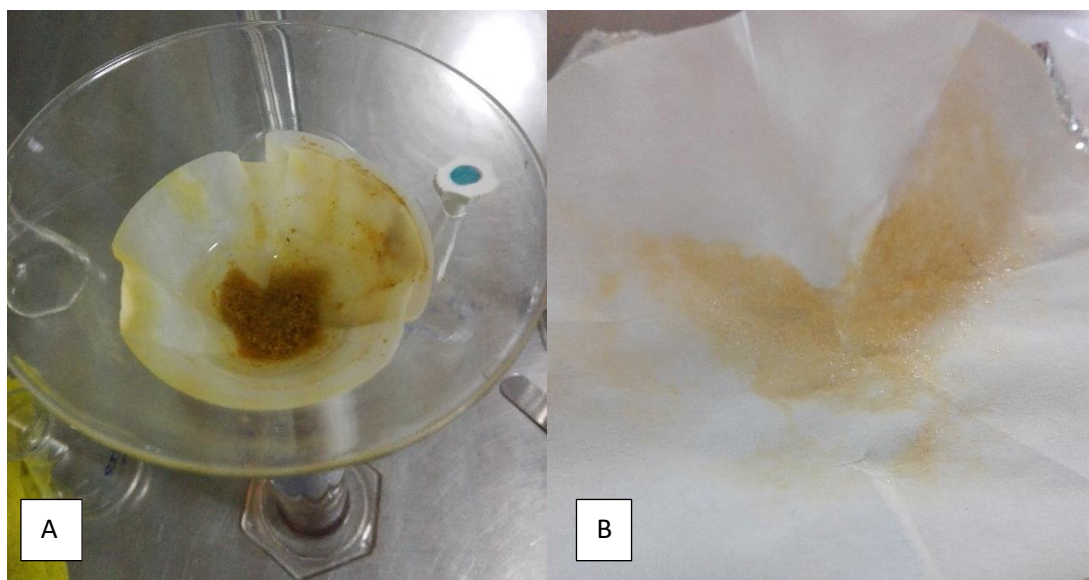


Figura 22. Extracción de pectina de la muestra de cáscara de mango. A. Imagen en reposo de la extracción por filtración utilizando etanol 70%, (B) Pectina extraída sobre papel filtro luego del secado en horno.

5.2. Determinación del contenido de lignina

Los resultados del porcentaje de lignina extraída en cáscara seca están especificados en la Tabla 20.

Tabla 20. Resultados del porcentaje de lignina en la muestra de cáscara de mango seca

Muestra	Peso de la muestra seca (g)	Peso del papel filtro (g)	Peso final de la muestra (g)	Porcentaje de lignina (%)
1	3.0002	0.7542	1.0541	9.996
2	3.0008	0.7439	1.0446	10.02
3	3.0004	0.7591	1.0603	10.038
Promedio				10.02

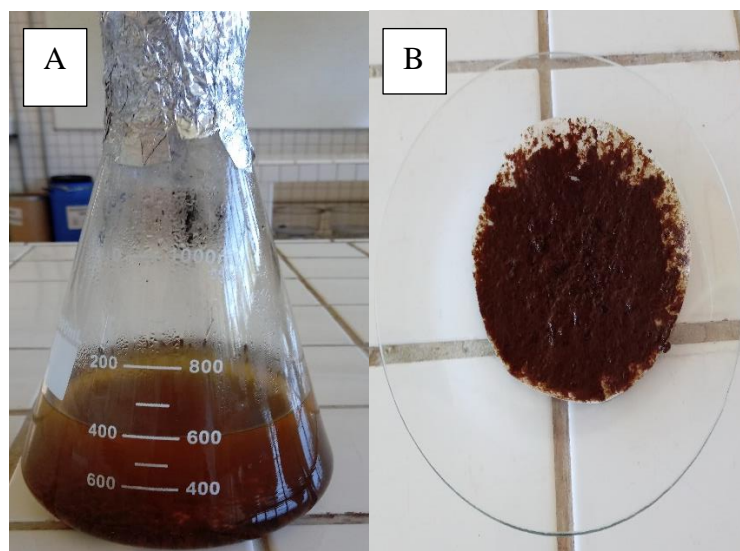


Figura 23. Determinación del contenido de lignina. A. Matraz conteniendo cáscara de mango desfibrilada luego del proceso de autoclavado, B. Residuo húmedo de lignina sobre papel filtro.

5.3. Determinación del contenido de Holocelulosa

Los resultados del porcentaje de holocelulosa extraída en cáscara seca están especificados en la Tabla 21.

Tabla 21. Resultados del porcentaje de holocelulosa en la muestra de cáscara de mango seca

Muestra	Peso de la muestra seca (g)	Peso del papel filtro (g)	Peso final de la muestra (g)	Porcentaje de holocelulosa (%)
1	2.5018	0.5202	1.1809	26.409
2	2.5031	0.5139	1.1996	27.394
3	2.5009	0.5107	1.2042	27.73
Promedio				27.17



Figura 24. Residuo de Holocelulosa de la cáscara de mango seca.

5.4. Determinación del contenido de Celulosa

Los resultados del porcentaje de Celulosa extraída a partir de la holocelulosa de la cáscara de mango seca obtenida en el paso anterior están especificados en la Tabla.

Tabla 22. Resultados del porcentaje de celulosa en la muestra de cáscara de mango seca

Muestra	Peso de la muestra de holocelulosa (g)	Peso del papel filtro (g)	Peso final de la muestra (g)	Porcentaje de celulosa (%)
1	1.0071	0.5397	0.7213	18.032
2	1.0013	0.5463	0.7368	19.025
3	1.0007	0.5769	0.7684	19.136
Promedio				18.73



Figura 25. Residuo de celulosa extraída a partir de holocelulosa de cáscara de mango seca.

5.5. Determinación de hemicelulosa

La diferencia entre el porcentaje de holocelulosa y celulosa se expresa como:

$$\% \text{Hemicelulosa} = 27.17 - 18.73 = 8.44$$

6. Determinación del contenido de almidón

Los resultados del porcentaje de almidón extraído a partir de la cáscara de mango seca están especificados en la Tabla 23.

Tabla 23. Resultados del porcentaje de almidón en la muestra de cáscara de mango seca

Muestra	Peso de la muestra de holocelulosa (mg)	Concentración de glucosa (mg/mL)	Porcentaje de almidón (%)
1	250.6	0.0076	6.824
2	250.3	0.0065	5.843
3	250.9	0.0071	6.367
Promedio			6.345

7. Determinación de Azúcares

La diferencia entre el porcentaje Total en base seca y los demás componentes dan como resultado el porcentaje de carbohidratos incluyendo azúcares reductores y no reductores:

$$\% \text{Azúcares} = 100\% - (\% \text{Humedad} + \% \text{Proteínas} + \% \text{Grasas} + \% \text{Cenizas} + \% \text{Fibra} + \% \text{Almidón})$$

$$\% \text{Azúcares} = 30.97\%$$

ANEXO N°2

DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

Las determinaciones de azúcares reductores de los análisis llevados a cabo en este trabajo fueron realizadas haciendo uso del método con DNS. Para analizar las muestras se tomaron 0.5 mL de muestra adecuadamente diluida (en caso corresponda), y se añadió 0.5 mL de reactivo DNS en tubos tapa rosca. El blanco consistió de 0.5 mL de agua destilada sumado a 0.5 mL de reactivo DNS. Se colocaron los tubos tapa rosca en Baño María a ebullición por 5 minutos, inmediatamente después se pasaron los tubos a un baño frío para detener la reacción. Una vez a temperatura ambiente se añadió 5 mL de agua destilada y se homogenizó. Finalmente se realizó la lectura de absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro UV-VIS.

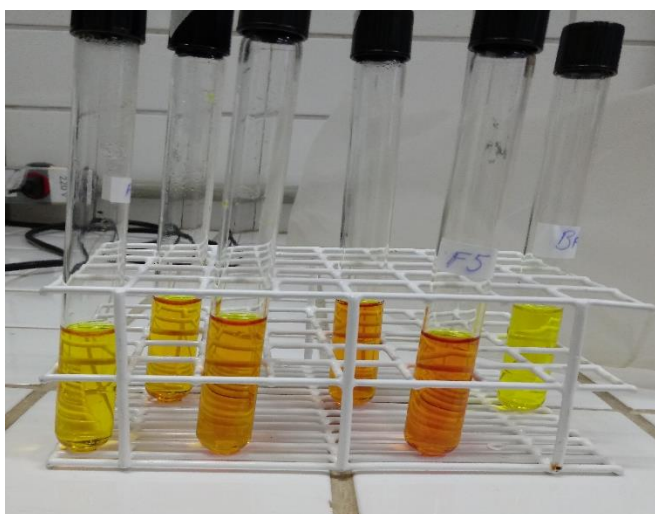


Figura 26. Representación gráfica de la determinación de azúcares reductores con Método DNS

Para la elaboración de la curva de calibración de azúcares reductores se pesó 1 g de glucosa y se aforó en una fiola con 100 mL de agua destilada. La solución obtenida tiene una concentración de 10 g/L y a partir de esta se realizaron diluciones seriadas para tener un total de 4 diluciones con concentraciones desde 2 g/L hasta 10 g/L. De cada dilución se tomaron 0.5 mL y vertidos en tubos, para luego añadirles 0.5 mL de reactivo DNS. Se incubaron los tubos a ebullición por 5 minutos e inmediatamente después se colocaron en un baño de hielo para detener la reacción. Una vez a temperatura ambiente se añadió 5 mL de agua destilada y se homogenizó. Finalmente se realizó la lectura de absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro UV-VIS. Los datos obtenidos de absorbancia fueron utilizados para

realizar la curva de calibración (absorbancia vs concentración en g/L). La ecuación obtenida a partir de esta regresión fue: $y = 0.4826x - 0.009$, con un $R^2 = 0.998$.

Tabla 24. Datos del padrón obtenidos de la concentración de glucosa para curva de calibración.

Concentración de glucosa (g/L)	Absorbancia 540 nm
0.2	0.077
0.4	0.18
0.6	0.282
0.8	0.384
1	0.471

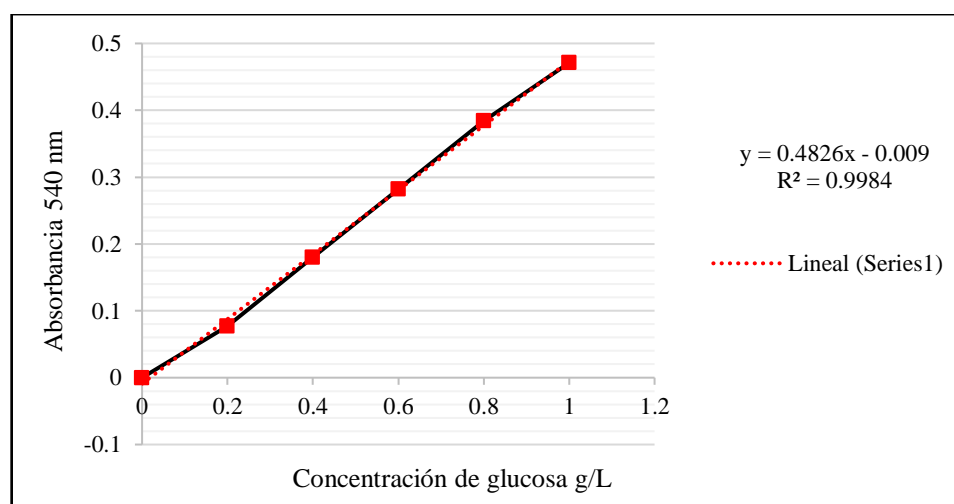


Figura 27. Curva de Calibración de azúcares reductores por DNS

ANEXO N°3

CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ÁCIDO D- GALACTURÓNICO

Tabla 25. Datos del padrón utilizado de ácido D- galacturónico en función de la absorbancia en 540 nm

Acido D- galacturónico (g/L)	Absorbancia (540 nm)
0.2	0.151
0.4	0.313
0.6	0.488
0.8	0.692
1	0.891

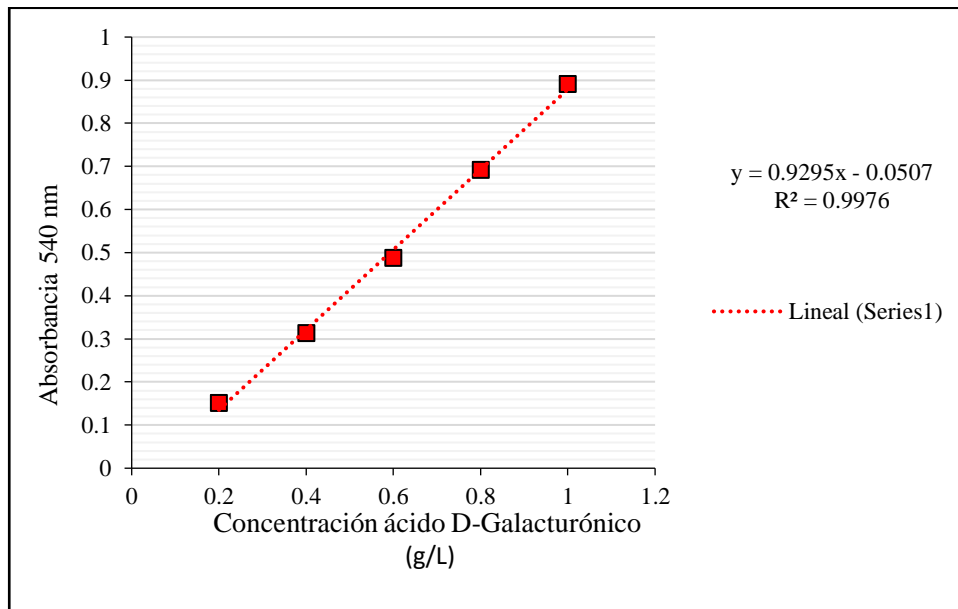


Figura 28. Curva de Calibración para la concentración de ácido D- galacturónico por DNS.

ANEXO N°4

MEDIO DE FERMENTACIÓN SÓLIDO



Figura 29. Frasco Erlenmeyer con medio de fermentación sólido utilizados en la producción del complejo enzimático. A. Esporas de *Aspergillus niger* ATCC 9642. B. Cáscara de mango tratada utilizado en el proceso de fermentación.

ANEXO N°5

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Efectos estimados de los modelos para cada respuesta

Tabla 26. Efectos estimados del modelo de regresión para la actividad enzimática CMCasa

Factor	Effect	Std.Err.	T(8)	p	Coeff.	Std.Err. Coeff.
Mean/Interc.	6.784	0.2085	32.53	0.000	6.784	0.2085
(1)Tiempo (h)(L)	0.551	0.2261	2.44	0.041	0.276	0.1130
Tiempo (h)(Q)	-3.094	0.2349	-13.17	0.000	-1.547	0.1174
(2)pH (L)	-0.769	0.2261	-3.40	0.009	-0.385	0.1130
pH (Q)	-1.685	0.2349	-7.18	0.000	-0.843	0.1174
(3)Humedad (%) (L)	0.827	0.2261	3.66	0.006	0.413	0.1130
Humedad (%) (Q)	-1.574	0.2349	-6.70	0.000	-0.787	0.1174
1L by 2L	-0.254	0.2954	-0.86	0.415	-0.127	0.1477
1L by 3L	-0.144	0.2954	-0.49	0.638	-0.072	0.1477
2L by 3L	-0.027	0.2954	-0.09	0.930	-0.013	0.1477

Significancia en $p < 0.05$

Tabla 27. Efectos estimados del modelo de regresión para la actividad enzimática FPasa

Factor	Effect	Std.Err.	T(8)	p	Coeff.	Std.Err. Coeff.
Mean/Interc.	3.107	0.112	27.76	0.000	3.107	0.112
(1)Tiempo (h)(L)	0.830	0.121	6.84	0.000	0.415	0.061
Tiempo (h)(Q)	-0.661	0.126	-5.24	0.001	-0.331	0.063
(2)pH (L)	-0.107	0.121	-0.88	0.405	-0.053	0.061
pH (Q)	-0.612	0.126	-4.85	0.001	-0.306	0.063
(3)Humedad (%) (L)	-0.514	0.121	-4.24	0.003	-0.257	0.061
Humedad (%) (Q)	-0.704	0.126	-5.58	0.001	-0.352	0.063
1L by 2L	0.031	0.159	0.20	0.849	0.016	0.079
1L by 3L	-0.078	0.159	-0.49	0.634	-0.039	0.079
2L by 3L	0.037	0.159	0.23	0.822	0.018	0.079

Significancia en $p < 0.05$

Tabla 28. Efectos estimados del modelo de regresión para la actividad enzimática Pectinasa

Factor	Effect	Std.Err.	T(8)	p	Coeff.	Std.Err. Coeff.
Mean/Interc.	104.544	4.6336	22.562	0.0000	104.544	4.6336
(1)Tiempo (h)(L)	37.936	5.0228	7.553	0.0001	18.968	2.5114
Tiempo (h)(Q)	-16.834	5.2190	-3.226	0.0121	-8.417	2.6095
(2)pH (L)	-0.635	5.0228	-0.126	0.9026	-0.317	2.5114
pH (Q)	-24.092	5.2190	-4.616	0.0017	-12.046	2.6095
(3)Humedad (%) (L)	-14.655	5.0228	-2.918	0.0194	-7.327	2.5114
Humedad (%) (Q)	-25.662	5.2190	-4.917	0.0012	-12.831	2.6095
1L by 2L	-0.728	6.5626	-0.111	0.9144	-0.364	3.2813
1L by 3L	-2.607	6.5626	-0.397	0.7016	-1.303	3.2813
2L by 3L	1.261	6.5626	0.192	0.8525	0.630	3.2813

Significancia en $p < 0.05$ **Tablas ANOVA**

Tabla 29. Análisis de Varianza (ANOVA) para el modelo de segundo orden de la actividad CMCasa

	SS	df	MS	F	p
(1)Tiempo (h)(L)	1.03727	1	1.03727	5.9451	0.040675 ^a
Tiempo (h)(Q)	30.26457	1	30.26457	173.4615	0.000001 ^a
(2)pH (L)	2.02056	1	2.02056	11.5808	0.009318 ^a
pH (Q)	8.98339	1	8.98339	51.4883	0.000095 ^a
(3)Humedad (%) (L)	2.33493	1	2.33493	13.3827	0.006418 ^a
Humedad (%) (Q)	7.83076	1	7.83076	44.8820	0.000153 ^a
1L by 2L	0.12919	1	0.12919	0.7404	0.414561 ^b
1L by 3L	0.04161	1	0.04161	0.2385	0.638398 ^b
2L by 3L	0.00145	1	0.00145	0.0083	0.929685 ^b
Error	1.39579	8	0.17447		
Total SS	42.68379	17			

 $R^2 = 0.9673$ y R^2 Ajustado=0.9305.

SS: Suma de cuadrados; df: grados de libertad; MS: cuadrado medio

^a Significativo para valores- $p < 0.05$ ^b Variables no significativa

Tabla 30. Análisis de Varianza (ANOVA) para el modelo de segundo orden de la actividad FPasa

	SS	df	MS	F	p
(1)Tiempo (h)(L)	2.349829	1	2.349829	46.74380	0.000133 ^a
Tiempo (h)(Q)	1.382607	1	1.382607	27.50341	0.000779 ^a
(2)pH (L)	0.038787	1	0.038787	0.77157	0.405340 ^b
pH (Q)	1.183358	1	1.183358	23.53987	0.001269 ^a
(3)Humedad (%) (L)	0.901948	1	0.901948	17.94194	0.002854 ^a
Humedad (%) (Q)	1.566318	1	1.566318	31.15786	0.000521 ^a

1L by 2L	0.001953	1	0.001953	0.03885	0.848669 ^b
1L by 3L	0.012283	1	0.012283	0.24434	0.634375 ^b
2L by 3L	0.002713	1	0.002713	0.05396	0.822135 ^b
Error	0.402163	8	0.050270		
Total SS	6.629604	17			

$R^2 = 0.939$ y R^2 Ajustado=0.871.

SS: Suma de cuadrados; df: grados de libertad; MS: cuadrado medio

^a Significativo para valores-p < 0.05

^b Variables no significativa

Tabla 31. Análisis de Varianza (ANOVA) para el modelo de segundo orden de la actividad Pectinasa

	SS	df	MS	F	p
(1)Tiempo (h)(L)	4913.629	1	4913.629	57.04601	0.000066 ^a
Tiempo (h)(Q)	896.193	1	896.193	10.40458	0.012137 ^a
(2)pH (L)	1.375	1	1.375	0.01596	0.902587 ^b
pH (Q)	1835.526	1	1835.526	21.31001	0.001719 ^a
(3)Humedad (%) (L)	733.262	1	733.262	8.51299	0.019359 ^a
Humedad (%) (Q)	2082.556	1	2082.556	24.17796	0.001168 ^a
1L by 2L	1.060	1	1.060	0.01230	0.914411 ^b
1L by 3L	13.590	1	13.590	0.15778	0.701600 ^b
2L by 3L	3.179	1	3.179	0.03690	0.852452 ^b
Error	689.076	8	86.134		
Total SS	9826.810	17			

$R^2 = 0.9298$ y R^2 Ajustado=0.8509.

SS: Suma de cuadrados; df: grados de libertad; MS: cuadrado medio

^a Significativo para valores-p < 0.05

^b Variables no significativa

Test de Deseabilidad

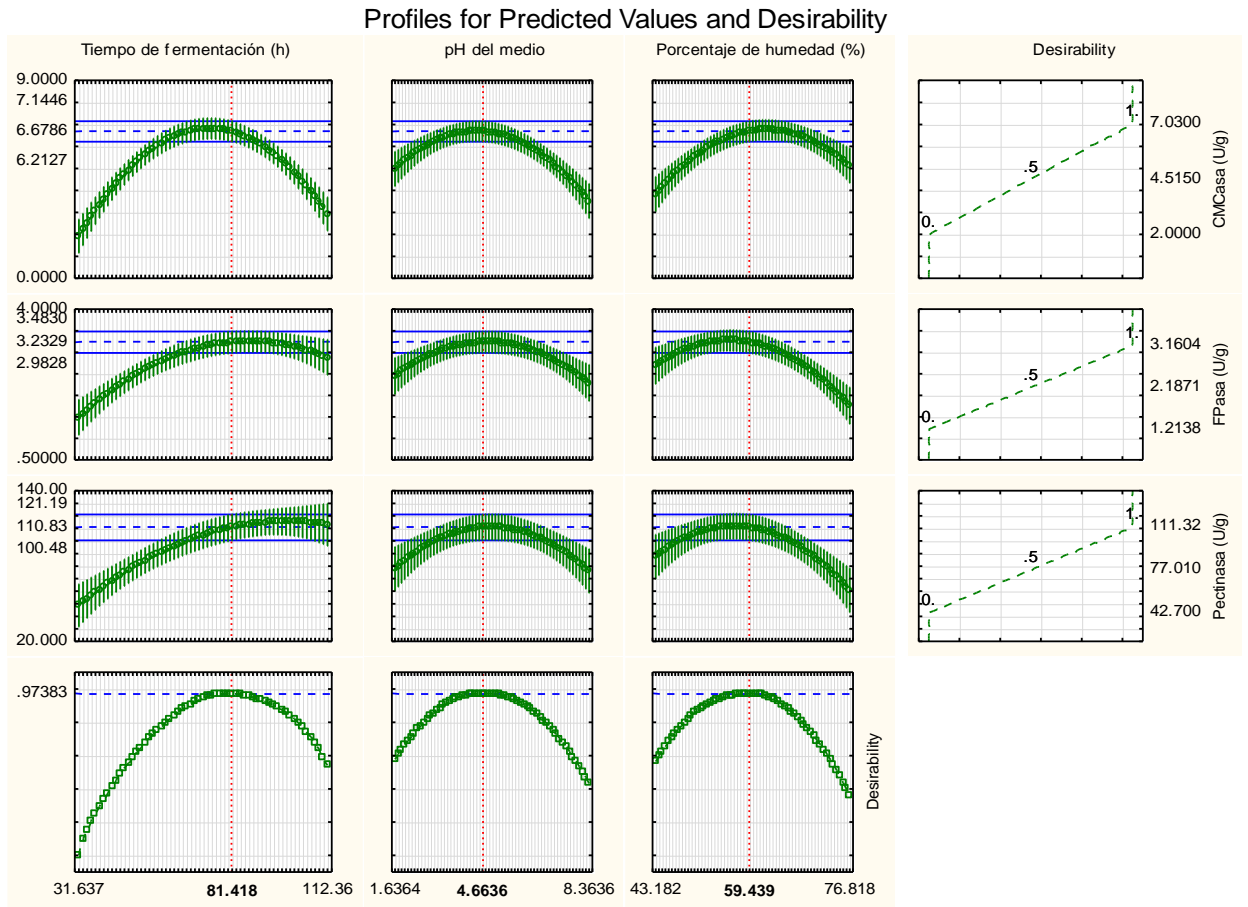


Figura 30. Perfiles de los valores predichos de deseabilidad de las variables independientes de Tiempo, pH y Humedad, frente a las variables respuestas de actividad enzimática de CMCasa, FPasa y Pectinasa

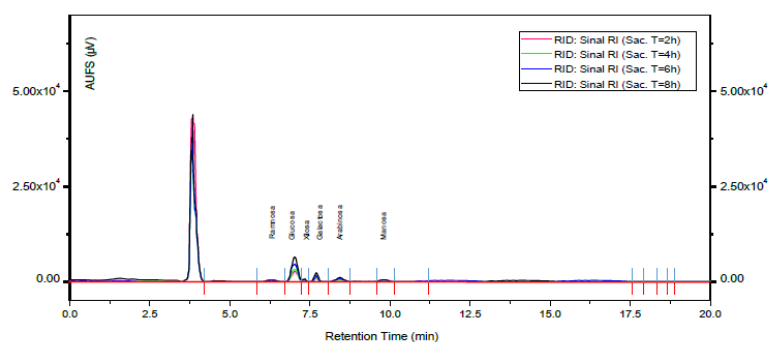
ANEXO N°6

CROMATOGRAMAS DE SACARIFICACIÓN

Padrón Externo

Página 1 de 2

Método: C:\EZChromElite\Enterprise\Projects\Azucares_Trans\Método\Métodosemusol\AminexHPX87H\Julio2019.met
 Archivo: C:\EZChromElite\Enterprise\Projects\Azucares_Trans\Datos\Sergio106Ago19\B53-79\001.dat
 Usuario: SSS
 Adquisición: 8/7/2019 08:24 AM
 Impresión: 8/7/2019 12:37 PM



RID: Sinal RI (Sac. T=2h)

Results

No #	Peak Name	Ret. Time (min)	Area (µV*min)	Amount (g/L)
				0.000 BDL
1	Ramnosa	5.952	62.302	0.02348
2	Glucosa	6.687	805.788	0.91099
3	Xilosa	7.286	23.021	0.06367
4	Galactosa	7.538	183.868	0.21388
5	Arabinosa	8.053	162.491	0.26939
6	Manosa	9.461	77.775	0.02549
Total				1.50692

RID: Sinal RI (Sac. T=4h)

Results

No #	Peak Name	Ret. Time (min)	Area (µV*min)	Amount (g/L)
				0.000 BDL
1	Ramnosa	5.948	83.335	0.02751
2	Glucosa	6.613	929.786	1.08741
3	Xilosa	7.272	29.965	0.07604
4	Galactosa	7.555	23.024	0.25588
5	Arabinosa	8.051	196.817	0.32619
6	Manosa	9.454	91.028	0.03068
Total				1.80373

RID: Sinal RI (Sac. T=6h)				
Results				
No #	Peak Name	Ret. Time (min)	Area (µV*min)	Amount (g/L)
				0.000 BDL
1	Ramnosa	5.947	108.471	0.03568
2	Glucosa	6.675	1335.611	1.40961
3	Xilosa	7.286	35.823	0.09856
4	Galactosa	7.531	306.826	0.33227
5	Arabinosa	8.052	305.244	0.41734
6	Manosa	9.461	145.326	0.03954
Total				2.333

RID: Sinal RI (Sac. T=8h)				
Results				
No #	Peak Name	Ret. Time (min)	Area (µV*min)	Amount (g/L)
				0.000 BDL
10	Ramnosa	5.895	157.509	0.05251
17	Glucosa	6.609	1898.438	2.05521
18	Xilosa	7.276	56.425	0.14325
22	Galactosa	7.522	450.114	0.48089
26	Arabinosa	8.043	431.253	0.60647
35	Manosa	9.455	191.291	0.05762
Total				3.39595