

RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Enriquecimiento proteico de *Solanum tuberosum* mediante fermentación en estado sólido utilizando *Aspergillus niger*

Protein enrichment of *Solanum tuberosum* by solid-state fermentation using *Aspergillus niger*

Berenize Fonseca Lilibeth, Danae Fernández, López Orestes Darío

DOI. 10.21931/RB/2020.05.03.4

Resumen: Los residuos de cáscara de papa se han incrementado debido al alto consumo del tubérculo, no obstante, los avances biotecnológicos permiten usar estos desechos y generar otros mejorados generalmente a través de una fermentación con ayuda de microorganismos como *Aspergillus niger*. En este trabajo se evaluó la influencia del tiempo de fermentación (5 – 8 días), la velocidad de agitación (0 – 60 rpm) y la concentración del inóculo (5000 y 50000 conidios/g de medio) sobre la concentración de biomasa y proteína a través de un diseño factorial 2³. El análisis estadístico determinó que los factores con mayor influencia sobre las variables respuestas analizadas fueron la velocidad de agitación y la concentración del inóculo con sus máximos niveles: 60 rpm y 50000 conidios/g de medio respectivamente. Se maximizaron las variables respuestas con valores de 16,31 mg/mL para la concentración de proteína y 0,94 g/mL para la concentración de biomasa.

1189

Palabras clave: Fermentación en estado sólido, *Aspergillus niger*, enriquecimiento proteico.

Abstract: Potato peel residues have increased due to the high consumption of the tuber; however, biotechnological advances allow us to use these wastes and generate others that are generally improved through fermentation with the help of microorganisms such as *Aspergillus niger*. In this work, the influence of the fermentation time (5 - 8 days), the stirring speed (0 - 60 rpm) and the concentration of the inoculum (5000 and 50000 conidia / g of medium) on the concentration of biomass and protein were evaluated through a factorial design 2³. The statistical analysis determined that the factors with the most significant influence on the analyzed response variables were the stirring speed and the concentration of the inoculum with its maximum levels: 60 rpm and 50000 conidia / g of the medium, respectively. The response variables were maximized with values of 16.31 mg / mL for the protein concentration and 0.94 g / mL for the biomass concentration.

Key words: Solid-state fermentation, *Aspergillus niger*, protein enrichment.

Introducción

La papa (*Solanum tuberosum* L) es uno de los tubérculos más frecuentes dentro de la canasta básica ecuatoriana; particularmente la variedad Superchola¹. Su crecimiento es óptimo a una altitud de 2800 a 3600 m², posee una alta demanda en el mercado y su principal uso radica en la industria alimenticia³, sin embargo, la acumulación de sus desechos se ha convertido en una problemática⁴. La cáscara de la papa es desprendida del tubérculo representando aproximadamente el 2% del volumen total comestible y se acumula a razón de 2 kilogramos por cada 100 kilogramos de papa procesada en el país de Perú⁴.

Los cultivos en estado sólido se caracterizan por contener el sustrato transformado por el microorganismo en estado sólido y no en solución o suspensión como ocurre en una fermentación líquida⁵. El objetivo de la fermentación es el aumento parcial del contenido proteico de los sustratos, mejorando las posibilidades de conservación, cambio de las características físicas y químicas, el color, el olor o el sabor⁶. Existen dos tipos de fermentación sólida. El primer tipo es aquel donde el material sólido actúa como principal fuente de nutrientes y como soporte físico del microorganismo al mismo tiempo. El segundo tipo, es en el que el material sólido actúa únicamente como soporte o anclaje del microorganismo y para su cultivo se adiciona una solución nutritiva⁷.

Aspergillus niger es un hongo que produce un moho negro en vegetales, es muy común en lechuga, tomate, acelga y limón. Es una especie de hongo inocuo para los seres humanos

y también para la mayoría de los cultivos⁸. La producción de ácido cítrico a gran escala es el principal uso que se le da a este microorganismo, sin embargo, empiezan a desarrollarse nuevas líneas en las que se maximiza la producción de macronutrientes, enzimas y otros metabolitos de amplio interés industrial^{9,10,11}.

El objetivo de este estudio fue obtener un incremento proteico en la cáscara de papa mediante fermentación en estado sólido utilizando *Aspergillus niger*.

Materiales y métodos

Obtención del sustrato

Se recolectaron los residuos de cáscara de papa (variedad Superchola) y fueron transportados hacia los laboratorios de la Unidad Operativa de la Dirección de Investigación y Desarrollo (UODIDE) radicada en la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Las cáscaras fueron lavadas con agua potable y cortadas en trozos de 5-7 cm de longitud. Posteriormente, se sometieron a un proceso de secado por aspersión durante 48 horas a una temperatura de 50 °C en un horno de bandejas (GANDER MTN). Se utilizó un molino de cuchilla (Baumgarten Porta Westfalica) para obtener la harina⁹.

Proceso de fermentación

Se pesaron 150 g de la harina y se sometió a un proceso de esterilización en una autoclave (H1-CLAVE). Se enfrió y se colocó en bandejas a una temperatura de 25 °C, humedad de 60-65% y pH alrededor de 5 a 6. La fermentación se realizó en un agitador orbital (Incu-Shaker mini).

Los factores evaluados fueron: la concentración del inóculo (5000 y 50000 conidios/g de medio), tiempo de incubación (5 y 8 días) y la velocidad de agitación (0 y 60 rpm). Las variables respuestas analizadas correspondieron a la concentración de biomasa y concentración de proteína.

Determinación de la concentración de biomasa

Para la determinación de la concentración de biomasa se pesaron tres tubos de centrifuga limpios y secos. En la bandeja de fermentación se mezcló la muestra con ayuda de una espátula estéril y se colocó dentro de cada tubo una cantidad equivalente a 5 mL y fueron centrifugados a 4000 rpm durante 10 minutos con una centrífuga (Rotina 380- Hettich Zentrifugen). Se desechó el sobrenadante y se procedió a realizar tres lavados continuos, cada lavado con 2 mL de agua destilada y centrifugados con las condiciones antes mencionadas.

Se colocaron los tubos dentro de una estufa (Precision-Thermo Scientific) a 70 °C durante 24 horas para eliminar la humedad, y se registró el valor para realizar los cálculos de biomasa⁷. Para estimar la concentración de biomasa se utilizó la Ecuación 1.

ECUACIÓN 1

$$[B] = \frac{PMS - PV}{V} \quad (1)$$

Dónde B es concentración de biomasa (g/ml), PMS es peso del tubo con la muestra seca (g), PV es peso del tubo vacío (g) y V es volumen de la muestra tomada (ml).

Determinación de la concentración de proteína

Para la cuantificación de proteína en el medio se tomaron muestras a los 0, 5 y 8 días de fermentación. Se pesó 2 g de éste en una balanza analítica (Adventurer Pro), posteriormente se colocó en un mortero y se añadió 8 ml de solución de NaCl al 1%, se adicionó arena estéril y se trituró. El macerado se colocó en un tubo de centrifuga y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos, se recolectó el sobrenadante.

Se colocó 0,1 mL del sobrenadante y se añadió 0,9 mL de reactivo Biuret previamente preparado¹³. Se realizaron los ensayos por triplicado. Los tubos reposaron durante 20 minutos a temperatura ambiente mientras ocurría la reacción.

Finalmente, se leyó la absorbancia de la muestra utilizando el espectrofotómetro UV-vis (accuSkan GO- Fisher Scienti-

fic) a una longitud de onda de 540 nm. Se determinó la concentración de proteínas a partir de una curva patrón de albúmina bovina con una concentración en el rango de 5 hasta 20 mg/mL (Figura 1).

Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se utilizó el software Statgraphics Centurion versión XVI.I con un diseño experimental 2³ donde se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existen diferencias significativas entre los factores estudiados y sus interacciones.

Se optimizó los factores: concentración de inóculo, tiempo de fermentación y velocidad de agitación para conocer la mejor relación entre las variables respuestas: concentración de biomasa y proteína. Se consideraron diferencias significativas con un valor-p < 0,05¹⁵.

Resultados y discusión

Análisis de la concentración de biomasa como variable respuesta

Del análisis estadístico total se obtuvo para cada variable respuesta los siguientes indicadores: tabla de análisis de varianza (ANOVA), coeficiente de determinación, diagrama de Pareto estandarizado, gráfico de efectos principales y gráfico de superficie de respuesta.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la ANOVA para la concentración de biomasa (Tabla 1), el Valor-p de los factores tiempo de fermentación (A), velocidad de agitación (B), concentración de inóculo (C) y la interacción BC fueron inferiores a 0,05, lo que indica que son significativamente diferentes de cero en el nivel de confianza del 95,0%. Según Gutierrez¹⁵, una significancia diferente de cero indica que los factores que cumplen con este parámetro influyen significativamente sobre el proceso en análisis.

El efecto estandarizado se gráfica en el eje x del diagrama de Pareto expresado en valor absoluto. Sirve de estadístico de prueba para aprobar la hipótesis nula contra la alternativa. Así, se rechaza la hipótesis nula si el valor absoluto del efecto estandarizado es mayor que el valor crítico de tablas de la

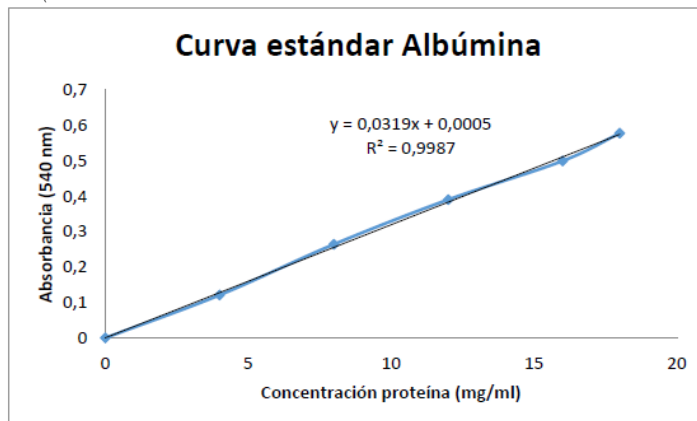


Figura 1. Curva estándar para la determinación de la concentración de proteína.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Tiempo	0,012341	1	0,012341	27,36	0,0004
B: V agitación	0,0507781	1	0,0507781	112,56	0,0000
C:C inóculo	0,0443187	1	0,0443187	98,25	0,0000
BC	0,015798	1	0,015798	35,02	0,0001
Bloques	0,000141491	1	0,000141491	0,31	0,5878
Error total	0,00451102	10	0,000451102		
Total (corr.)	0,127888	15			

Tabla 1. Tabla ANOVA para concentración de biomasa

distribución t de Student con los grados de libertad correspondientes al error del análisis¹⁵. Éste último valor se adiciona en el diagrama de Pareto con una línea azul.

Para el caso de la concentración de biomasa se puede apreciar que el factor velocidad de agitación (B) seguido del factor concentración de inóculo (C) abarcan la mayor parte de influencia sobre el proceso fermentativo (Figura 2), sin embargo la interacción BC y el tiempo de fermentación (A) también sobrepasan la línea de valor crítico de la tabla de distribución t de Student (Línea vertical de color azul). Por tanto, los estadísticos del diagrama de Pareto corroboran la afirmación que proporcionó la ANOVA al concluir que todos los factores son estadísticamente diferentes de cero.

El Gráfico de Efectos Principales (Figura 3) indica una mayor influencia para los factores velocidad de agitación (B) y concentración de inóculo (C) sobre la concentración de biomasa. Se determinó que a medida que aumenta la velocidad de agitación de 0 a 60 rpm y la concentración de inóculo de 5000 a 50000 conidios/g, aumenta la concentración de biomasa; es decir existe una mayor tasa de duplicación celular. El tiempo (A) presenta una línea menos pronunciada al incrementar los

días de fermentación, es posible que la influencia de este factor afecte de manera significativa al proceso en un rango más alto o cuando se alcance la máxima tasa de duplicación celular⁸.

El análisis de regresión muestra un coeficiente de correlación de 96,4727% lo que indica una relación ajustada a la línea de tendencia de los datos muestrales. Se reportó la ecuación optimizada para la predicción de la concentración de Biomasa en el proceso fermentativo de *Aspergillus niger* en sustrato de cáscara de papa (Ecuación 2).

Análisis de la concentración de proteína como variable respuesta

De acuerdo a los resultados obtenidos en la ANOVA para la concentración de proteína (Tabla 2), el Valor-P de los factores tiempo de fermentación (A), velocidad de agitación (B), concentración de inóculo (C) y la interacción AB y AC fueron inferiores a 0,05, lo que indica que son significativamente diferentes de cero en el nivel de confianza del 95,0% por tanto se concluye que los mismos afectan significativamente al proceso fermentativo para los resultados de la concentración de proteína.

ECUACIÓN 2

$$CB = 0,57144 + 0,018515 A + 0,000597657 B + 9,4255 \times 10^{-7} C + 4,65519 \times 10^{-8} BC$$

(V)

Donde A, B y C representan los factores: Tiempo de fermentación, velocidad de agitación y concentración de inóculo respectivamente y CB representa a la concentración de biomasa formada.

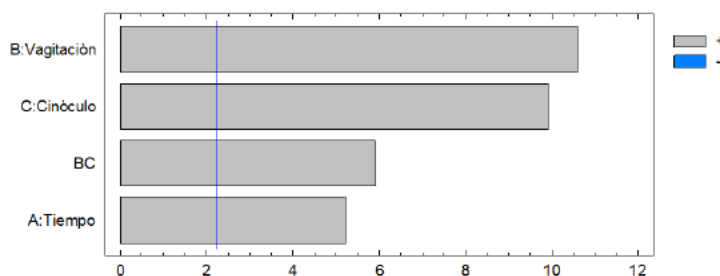


Figura 2. Diagrama de Pareto estandarizado para la concentración de biomasa.

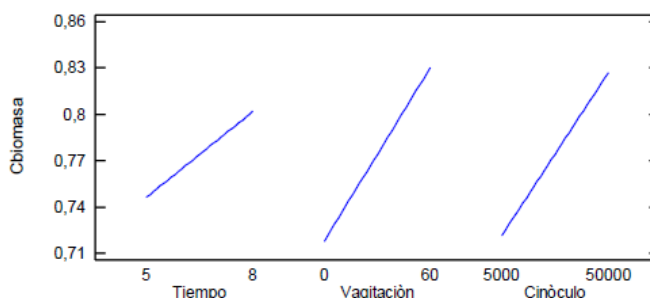


Figura 3. Gráfico de efectos principales para la concentración de biomasa.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Tiempo	52,753	1	52,753	176,11	0,0000
B: V agitación	81,9509	1	81,9509	273,58	0,0000
C:C inóculo	2,493	1	2,493	8,32	0,0180
AB	9,47978	1	9,47978	31,65	0,0003
AC	2,09489	1	2,09489	6,99	0,0267
Bloques	0,0443208	1	0,0443208	0,15	0,7094
Error total	2,69592	9	0,299546		
Total (corr.)	151,512	15			

Tabla 2. Tabla ANOVA para la concentración de proteína.

El diagrama de Pareto indica que el factor velocidad de agitación (B) seguido del factor tiempo de fermentación (A) abarcan la mayor parte de influencia sobre el proceso fermentativo (Figura 4) El factor cantidad de inóculo (C) y las interacciones AB y AC representan valores menores, pero se consideran significativos debido a que sobrepasan la línea de valor crítico de la tabla de distribución t de Student. Por tanto, los estadísticos del diagrama de Pareto corroboran la afirmación que proporcionó el análisis de varianza al concluir que los factores son estadísticamente diferentes de cero para la variable concentración de proteína.

El Gráfico de Efectos Principales (Figura 5) indica una mayor influencia para los factores velocidad de agitación (B) y tiempo de fermentación (A) sobre la concentración de proteína. Se determina que a medida que aumenta la velocidad de agitación de 0 a 60 rpm y el tiempo de fermentación de 5 a 8 días, aumenta la concentración de proteína. La velocidad de agitación presenta una línea con mayor inclinación. Al parecer

la agitación permite que las células obtengan un mejor contacto con la superficie y pueden disponer de mejor manera los nutrientes del medio. De esta manera existe una correlación directamente proporcional entre el sustrato y el crecimiento celular de *Aspergillus niger*.

El tiempo de fermentación influye sobre el crecimiento celular. A mayor división celular mayor síntesis de proteína en el medio, esto se consigue cuando el microorganismo se encuentra en la fase de crecimiento exponencial¹⁰. De tal manera, mientras el conidio se encuentre en la fase exponencial de crecimiento existirá mayor cantidad de biomasa y por ende mayor nivel de proteína sintetizada.

El análisis de regresión muestra un coeficiente de correlación de 98,2207% lo que indica una relación ajustada a la línea de tendencia de los datos muestrales. Se reportó la ecuación optimizada para la predicción de la concentración de proteína en el proceso fermentativo de *Aspergillus niger* en sustrato de cáscara de papa (Ecuación 3)

ECUACIÓN 3

$$CP = 5,34187 + 0,402531 - 0,03574 B - 5,21448 \times 10^{-5} C + 0,0171051 AB + 1 \times 10^{-5} AC$$

(VI)

Donde A, B y C representan los factores Tiempo de fermentación, velocidad de agitación y concentración de inóculo respectivamente y CP representa a la concentración de proteína.

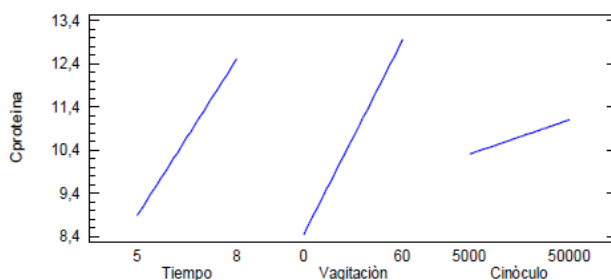


Figura 5. Gráfico de efectos principales para la concentración de proteína.

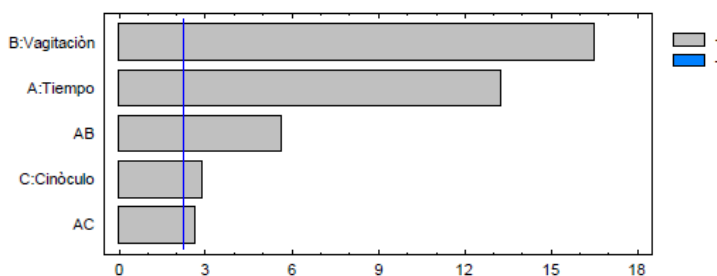


Figura 4. Diagrama de Pareto estandarizada para la concentración de proteína.

Optimización del proceso de fermentación en estado sólido

Para optimizar un proceso es necesario ajustar el modelo de las ecuaciones de regresión lineal a un conjunto de puntos que pertenecen a la región experimental del proceso en análisis. El programa estadístico emite un gráfico que describe el comportamiento de la vibración de estos puntos sobre la región experimental¹⁵. El diagrama toma el nombre de Superficie de Respuesta y describe el comportamiento de la respuesta promedio en cada punto de la región experimental.

De las ecuaciones 2 y 3 se obtuvo los diagramas de superficie de respuesta para la optimización de la concentración de biomasa (Figura 6) y la optimización de la concentración de proteína (Figura 7).

Se observa que con una concentración de inóculo de 50000 conidios/g, una velocidad de agitación de 60 rpm y un tiempo de fermentación de 8 días es posible alcanzar la deseabilidad más alta (1), por tanto, la optimización de los factores en el proceso fermentativo.

Tanto en la Figura 5 como en la Figura 6 se observa una superficie lineal con tendencia a un crecimiento positivo. Este fenómeno explica que aún no se ha alcanzado el nivel máximo de optimización y que los valores críticos de los 3 factores se encuentran por encima de los rangos establecidos en el análisis¹⁵. Sin embargo, se necesita de un estudio con variación de niveles altos y bajos para poder establecer los verdaderos puntos críticos. Si se quiere reproducir los valores obtenidos en este experimento no es recomendable variar los valores de los factores establecidos en este estudio puesto que no se conoce el comportamiento del hongo fuera del rango preestablecido.

Los resultados de las variables respuesta optimizadas se resumen en la Tabla 3. Se obtuvo una concentración de biomasa de 0,942 g/mL y una concentración de proteína de 16,31

mg/mL al finalizar el proceso de fermentación. Isique & Sing¹⁶, realizaron estudios sobre la disponibilidad de azúcares reductores y el análisis químico de residuos de cáscara de papa, camote y yuca. Los resultados del análisis químico reportan valores para la concentración de proteína en cáscara de papa de 5,26 g/mL.

Borras y colaboradores⁹, en su estudio de la determinación de la influencia de la temperatura sobre el crecimiento de *Aspergillus niger* en sustrato de harina de papa logró incrementar el valor proteico de 3,21 a 8,33 g/mL al finalizar la fermentación al mantener una temperatura de crecimiento de 25 ± 3 °C. Por otro lado, Aranda y colaboradores⁵ lograron obtener un alimento enriquecido proteicamente basado en caña de azúcar a través de una fermentación en estado sólido utilizando una mezcla de bacterias lácticas en simbiosis con hongos como *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger*, el incremento fue de 4, 18 a 19,43 mg de proteína sobre 100 g de cultivo de cultivo fermentado.

Por tanto, el valor de incremento proteico obtenido en esta experimentación se encuentra dentro de los rangos reportados bibliográficamente.

Conclusiones

Se determinó la influencia de los factores: concentración de inóculo, tiempo de fermentación y velocidad de agitación sobre el proceso fermentativo de *Aspergillus niger* en sustrato de cáscara de papa mediante un análisis estadístico de diseño factorial 2^3 indicando que existieron diferencias significativas entre los tres factores con un nivel de confianza $p < 0,05$.

Se observó que a pesar de que todos los factores influyeron significativamente sobre el proceso fermentativo, los que afec-

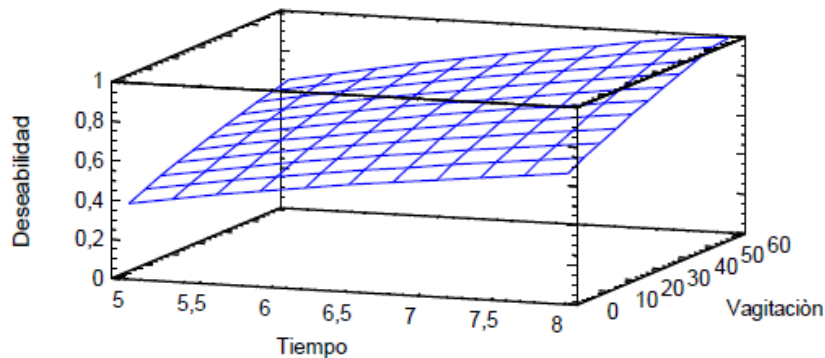


Figura 6. Superficie de respuesta del modelo ajustado en el proceso fermentativo para optimizar la concentración de biomasa con una concentración de inóculo de 50000 conidios/g de medio.

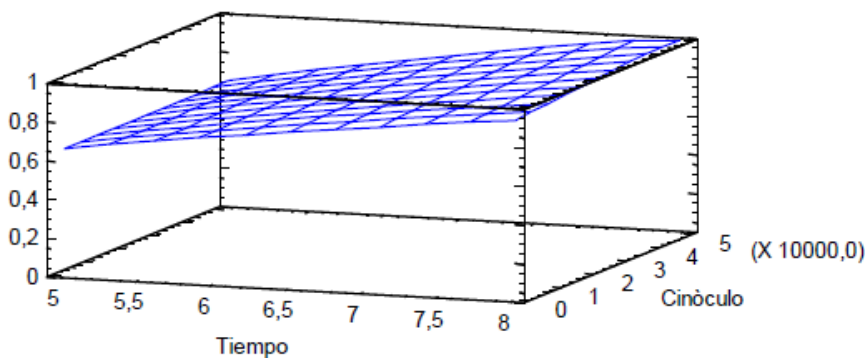


Figura 7. Superficie de respuesta del modelo ajustado en el proceso fermentativo para optimizar la concentración de proteína con una velocidad de agitación de 60 rpm.

taron en mayor proporción fueron la velocidad de agitación (B) y la concentración del inóculo (C).

Se optimizó el proceso de fermentación en estado sólido con los siguientes parámetros: velocidad de agitación (60 rpm), concentración de inóculo (50000 conidios) y tiempo de fermentación (8 días) con las cuales se maximizó las variables respuesta obteniendo valores de concentración de proteína de 16,31 mg/mL y una concentración de biomasa de 0,94 g/mL.

Referencias bibliográficas

1. INIAP. Programa nacional de raíces y tubérculos. Variedades papa en el Ecuador 1, 1–320 (2013).
2. Muñoz, F. & Cruz, L. Manual de cultivo de papa. Manual del cultivo de papa 45 (2009).
3. Villalobos, M., López, M., Rodríguez, P. & Prado, M. Obtención de almidón a partir de los residuos de papa del mercado Abastos. Congr. Interdiscip. Cuerpos Académicos 3, 266–271 (2014).
4. Vargas Corredor, Y. A. & Pérez Pérez, L. I. Aprovechamiento de residuos agroindustriales en el mejoramiento de la calidad del ambiente. Rev. Fac. Ciencias Básicas 14, 1–14 (2018).
5. Aranda, E. M., Georgana, L. E., Salgado, S. & Ramos, J. Elaboración de un alimento basado en caña de azúcar a partir de la fermentación en estado sólido y con diferentes niveles de zeolitas. Rev. Cuba. Cienc. Agrícola 46, 159–164 (2012).
6. Suarez, C. Utilización de la fermentación líquida de *Lentinula edodes* (SHIITAKE), para la producción de metabolitos secundarios bioactivos y evaluación de su potencial empleo en la producción de un alimento funcional. Univ. Nac. Colomb. Programa Interfacultades en Cienc. y Tecnol. Aliment. 2, 1–122 (2012).
7. Moyano, M. A. Fermentación en estado sólido (FES) de la papa (*Solanum tuberosum*), como alternativa tecnológica para la alimentación. Univ. Nac. Abierta y a Distancia 3, 1–87 (2014).
8. Reyes, I., González, M. & López, F. Un análisis del metabolismo de *Aspergillus niger* creciendo sobre un sustrato sólido. Rev. Mex. Ing. Qum. 12, 41–56 (2013).
9. Borrás, L. M., Iglesias, A. E. & Moyano, M. A. Efecto de la temperatura y el tiempo sobre los indicadores de la papa (*Solanum tuberosum*) fermentada en estado sólido. Cienc. Y Agric. 11, 31 (2016).
10. Cujilema, M. C., León, G. & Porro, M. R. Producción de lipasas por fermentación sólida con *aspergillus niger*: influencia del pH. Rev. Cent. Azúcar 45, 1–9 (2018).
11. Peña, C. B. Evaluación del contenido nutricional y actividad antioxidante en *Solanum tuberosum*. Rev. Univ. Nac. Colomb. 4, 1–149 (2015).
12. Apunte, D. Obtención de un medio enriquecido en proteínas a partir de residuos de papa (*Solanum tuberosum*) por fermentación microbiana Trabajo. 1–42 (2019).
13. Argañaraz, Natalia; Hazán, M. Reconocimiento de Proteínas. Minist. Ciencia, Tecnol. e Innovación Product. 3, 1–21 (2017).
14. Ausel, A., Auxt, A. & Sin, P. Comparación de Bacteria , Archaea y EucO / ya. McGRAW-HILL Interamericana (2009).
15. Gutierrez, H. Análisis y Diseño de Experimentos. (Mc GRAW-HILL, 2012).
16. Isique, M. & Sing, J. Influencia de la hidrólisis química en las características fisicoquímicas y funcionales de los residuos industriales de papa, camote y yuca. Univ. Nac. del St. 7, 1–234 (2017).
17. Arnáiz, C., Isac, L. & Lebrato, J. Determinación de la biomasa en procesos biológicos. Grup. Trat. Aguas Residuales. Esc. Univ. Politécnica 2, 1–8 (2000).
18. Mendez, J. Producción de ácido glucónico aplicando cinética de crecimiento microbiano a partir de *Aspergillus niger* y como medio de cultivo, dulce de atado. Rev. Univ. El Salvador 6, 1–184 (2013).
19. Chanagá, X., Plácido, J., Marín, M. & Yepres, M. D. S. Hongos Nativos con Potencial Degradador de Tintes Industriales en el Valle de Aburrá , Colombia. Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín 65, 6811–6821 (2012).

Received: 10 julio 2020

Accepted: 10 agosto 2020