



Pontificia Universidad Católica del Ecuador
Sede Ibarra

ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES "ECAA"

INFORME FINAL DEL PROYECTO

TEMA:

“Trichoderma asperellum EN EL ENRIQUECIMIENTO PROTÉICO DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS.”

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERA EN CIENCIAS AMBIENTALES Y ECODESARROLLO

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN:

Línea 4. Gestión sostenible y aprovechamiento de los recursos naturales

Sub línea: Desarrollo y Sostenibilidad

AUTORA: ARACELY ESTEFANÍA POZO ENRÍQUEZ

ASESORA: Dra. MORAIMA CRISTINA MERA AGUAS

Ibarra, Mayo - 2020



Ibarra, 7 de Mayo de 2020

Dra. MORAIMA CRISTINA MERA AGUAS

ASESORA

CERTIFICA:

Haber revisado el presente informe final de investigación, el mismo que se ajusta a las normas vigentes en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA), de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI); en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.

(f) 

Dra. Moraima Cristina Mera Aguas

ASESORA DEL PROYECTO DE GRADO

C.C.:100174372 – 1



APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

El jurado examinador, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI):

(f)

Dra. Morqima Cristina Mera Aguas

ASESORA DEL PROYECTO DE GRADO

C.C:100174372 – 1

(f)

Mgs. Santiago Xavier Mafla Andrade

LECTOR DEL PROYECTO DE GRADO

C.C: 100265839-9

(f)

Mgs. Edmundo René Recalde Posso

LECTOR DEL PROYECTO DE GRADO

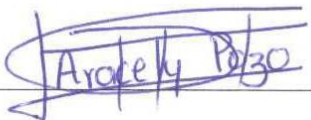
C.C: 100177449-4



ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo Aracely Estefanía Pozo Enríquez, declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 165 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, que manifiesta textualmente: “Se reconoce facultad de los autores y demás titulares de derechos de disponer de sus derechos o autorizar las utilidades de sus obras o prestaciones, a título gratuito u oneroso, según las condiciones que determinen. Esta facultad podrá ejercerse mediante licencias libres, abiertas y otros modelos alternativos de licenciamiento o la renuncia”.

Ibarra, 7 de Mayo de 2020

(f) 

Aracely Estefanía Pozo Enríquez

AUTORA DEL PROYECTO DE GRADO

C.C: 100362180 - 0



AUTORÍA

Yo, Aracely Estefanía Pozo Enríquez, portador de la cédula de ciudadanía N° 1003621800, declaro que la presente investigación es de total responsabilidad del (los) autor (es), y eximo expresamente a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra de posibles reclamos o acciones legales.

(f) A handwritten signature in blue ink that reads 'Aracely Pozo' is written over a horizontal line. The signature is stylized and includes a large flourish at the end.

Aracely Estefanía Pozo Enríquez

AUTORA DEL PROYECTO DE GRADO

C.C.: 100362180- 0



DECLARACIÓN y AUTORIZACIÓN

Yo: Aracely Estefanía Pozo Enríquez, con CC: 1003621800, autora del trabajo de grado intitulado: “*Trichoderma asperellum* en el enriquecimiento proteico de residuos lignocelulósicos”, previo a la obtención del título profesional de Ingeniera en Ciencias Ambientales y Eco-Desarrollo, en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales “ECAA”.

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede- Ibarra, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCESI el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Ibarra, 7 de Mayo de 2020

(f) 

Aracely Estefanía Pozo Enríquez

C.C: 100362180 - 0



DECLARACIÓN DE COMPORTAMIENTO ÉTICO EN LA ELABORACIÓN, DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE TRABAJOS DE TITULACIÓN

Por medio de la presente declaro conocer y aplicar en la elaboración, desarrollo y evaluación del Proyecto de Titulación “*Trichoderma asperellum* EN EL ENRIQUECIMIENTO PROTEICO DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS”, lo propuesto en el Código de Ética de la investigación y el aprendizaje de la Pontificia Universidad Católica Del Ecuador, aprobado por el Consejo Superior de la PUCP con fecha 26 de Julio de 2018.

Para constancia firma:

Aracely Estefanía Pozo Enríquez

Estudiante que ejecuta el trabajo de titulación

C.C: 100362180-0

Carrera: Ingeniería en Ciencias Ambientales y Ecodesarrollo

Ibarra, 26 de julio de 2018

DEDICATORIA

Primeramente, quiero dedicar a Dios por ser mi fiel amigo, mi fuerza, mi fortaleza, por ser quien me ha encaminado en esta trayectoria, por darme sabiduría e inteligencia para poder concluir con mis estudios el día de hoy.

A mis padres, Lucio Aníbal Pozo Quelal y Narcisa Yolanda Enríquez Guerrón, quienes me ayudaron a encaminar mis estudios dando todo para instruirme en el bien y quienes serán mi ejemplo a seguir.

A mis Hermanos a los que espero haberles servido de ejemplo concluyendo mis estudios profesionales.

A mi esposo Patricio Alexander Torres Torres y a mi hija Ariana Mikaela Torres Pozo, quiero agradecerles por su amor, apoyo y comprensión todos estos años, ya que son motivo de mi existencia y superación.

Aracely Pozo.

AGRADECIMIENTO

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra, a la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales, un sincero agradecimiento por aportar con la enseñanza y formación profesional.

A la carrera de Ingeniería en Ciencias Ambientales y Ecodesarrollo, por haberme admitido en las aulas, también, a los Docentes que siempre supieron compartir sus conocimientos para formarme profesionalmente.

A la Dra. Moraima Cristina Mera, quien, con su capacidad intelectual y calidad humana, supo brindarme sus conocimientos científicos-técnicos que me permitieron finalizar con éxito la presente investigación.

Al Msc. Santiago Mafla e Ing. Luis Haro, por la enseñanza y contribución en los laboratorios. Y a todos quienes de alguna forma u otra colaboraron con el desarrollo del presente trabajo.

ÌNDICE

DEDICATORIA.....	viii
AGRADECIMIENTO	ix
ÌNDICE	x
ÌNDICE DE TABLAS	xiv
ÌNDICE DE FIGURAS.....	xv
ÌNDICE DE ANEXOS.....	xvii
RESUMEN	xviii
ABSTRACT.....	xix
CAPÌTULO I	
INTRODUCCIÒN.....	1
CAPÌTULO II	
OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo General	4
2.2 Objetivos EspecÌficos	4
2.3 Hipòtesis	4
CAPÌTULO III	
ESTADO DEL ARTE.....	5
3.1 Material Lignocelulòsico	5
3.1.1 Biomasa	5
3.1.2 Biomasa lignocelulòsica	6
3.1.3 CaracterÌsticas de los materiales lignocelulòsicos.....	6
3.1.4 Componentes estructurales del material lignocelulòsico	7
3.1.5 ProteÌna Cruda.....	9
3.1.6 Materia seca	9
3.1.7 Humedad.....	10

3.1.8	Fibra cruda	10
3.2	Características Generales de los materiales lignocelulósicos	11
3.2.1	Bagazo de caña (<i>Saccharum officinarum</i>).....	11
3.2.2	Tamo de frejol (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....	11
3.2.3	Cascarilla de café (<i>Coffea arabica</i>).....	12
3.3	Hongos filamentosos	13
3.3.1	Importancia de los hongos.....	14
3.3.2	Generalidades de los hongos	14
3.3.3	Género <i>Trichoderma</i>	15
3.3.3.1	Morfología del género <i>Trichoderma</i>	17
3.3.3.2	Características de <i>Trichoderma</i>	18
3.3.3.3	Temperatura de crecimiento de <i>Trichoderma</i>	19
3.3.3.4	Requerimientos nutricionales del <i>Trichoderma spp.</i>	19
3.3.3.5	Relación C/N.....	20
3.3.3.6	Propagación de <i>Trichoderma spp.</i> en sustratos.	20
3.3.3.7	<i>Trichoderma asperellum</i>	20
3.3.3.8	Condiciones de crecimiento del hongo <i>T. asperellum</i>	21
3.4	La fermentación en estado sólido (FES)	22
3.4.1	Ventajas	22
3.4.2	Desventajas	23
3.4.3	Influencia de Factores Ambientales en la fermentación en estado sólido	23
CAPÍTULO IV		
MATERIALES Y MÉTODOS		26
4.1	Ubicación.....	26
4.2	Materiales	26
4.3	Equipos	27

4.4	Reactivos.....	28
4.5	Software.....	28
4.6	Objeto de estudio.....	28
4.7	Métodos	29
4.7.1	Hipótesis	29
4.8	Análisis Estadístico Experimental	29
4.8.1	Diseño Experimental	29
4.8.1.1	Unidad Experimental	30
4.9	Otras variables evaluadas	31
4.10	Caracterización del material lignocelulósico	31
4.10.1	Análisis Bromatológico.....	32
4.11	Preparación de la materia prima e inoculación	41
4.12	Cámara de Neubauer.....	45
4.12.1	Conteo de esporas de <i>T. asperellum</i>	45
4.13	Esterilización de los sustratos.....	46
4.13.1	Siembra del inóculo de <i>T. asperellum</i> en los diferentes sustratos	46
4.13.2	Hidratación.....	47
4.13.3	Cosecha de los sustratos enriquecidos con <i>T. asperellum</i>	47
CAPÍTULO V		
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		49
5.1	Caracterización del material lignocelulósico	49
5.2	Resultados de análisis Bromatológico.....	52
5.3	Análisis estadísticos de cada uno de los parámetros medidos antes y después del uso de <i>T. asperellum</i> con tamo de frejol, bagazo de caña y cascarilla de café. ..	56
5.3.1	Resultados del parámetro Fibra Cruda antes y después de la utilización de <i>T. asperellum</i> con tamo de frejol, bagazo de caña y cascarilla de café.....	57

5.3.2	Resultados del parámetro Lignina antes y después de la utilización de <i>T. asperellum</i> con tamo de frejol, bagazo de caña y cascarilla de café.....	58
5.3.3	Resultados del parámetro Proteína antes y después de la utilización de <i>T. asperellum</i> con tamo de frejol, bagazo de caña y cascarilla de café.....	59
5.4	Análisis del porcentaje de fibra cruda en los tres tratamientos con <i>T. asperellum</i>	59
5.5	Análisis del porcentaje de lignina en los tres tratamientos con <i>T. asperellum</i> ...	61
5.6	Análisis del porcentaje de proteína en los tres tratamientos con <i>T. asperellum</i> .	63
5.7	Sustratos enriquecidos con <i>T. asperellum</i> durante 21 días	65
5.8	Determinación de la morfología de <i>T. asperellum</i> en el aéreo microscopio Motic B1-220 con cámara.	66
5.9	Otras variables evaluadas	68
5.10	Socialización	70
CAPÍTULO VI		
CONCLUSIONES.....		72
CAPÍTULO VII		
RECOMENDACIONES.....		74
CAPÍTULO VIII		
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		75
ANEXOS		90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Composición química de la materia prima.	13
Tabla 2 Clasificación Taxonómica de <i>T. asperellum</i>	21
Tabla 3 Ubicación de los Laboratorios ECAA.....	26
Tabla 4 Análisis de varianza.....	30
Tabla 5 Composición de Tratamientos	31
Tabla 6 Composición físico- química de la materia prima	49
Tabla 7 Análisis bromatológico de los sustratos (TF, CC y BC) con el hongo <i>T. asperellum</i>	53
Tabla 8. Prueba pareada de los promedios de la variable fibra cruda con el uso de <i>T. asperellum</i>	58
Tabla 9. Prueba pareada de los promedios de la variable lignina con el uso de <i>T. asperellum</i>	58
Tabla 10. Prueba pareada de los promedios de la variable proteína con el uso de <i>T. asperellum</i>	59
Tabla 11 Análisis de varianza de la variable fibra cruda (%) de los tres tratamientos ...	60
Tabla 12 Análisis de varianza de la variable lignina (%) de los tres tratamientos	61
Tabla 13 Análisis de varianza de proteína cruda (%) de los tres tratamientos	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del material lignocelulósico.	5
Figura 2. Composición típica de un material lignocelulósico.	6
Figura 3. Estructura primaria de la celulosa.	7
Figura 4. Estructura de la hemicelulosa.	8
Figura 5. Estructura de la lignina.	9
Figura 6. Partes de un grano de café.	12
Figura 7. Morfología de hongo <i>Trichoderma sp.</i>	18
Figura 8. Termo balanza.	32
Figura 9. Determinación de pH.	33
Figura 10. Bomba calorimétrica.	35
Figura 11. Digestando, Destilando y Titulando.	37
Figura 12. Mufla.	38
Figura 13. Extractor de Fibra cruda.	39
Figura 14. Manta calefactora y bomba de vacío.	41
Figura 15. Preparación de los sustratos.	42
Figura 16. Molino mezclador y Homogenizar.	43
Figura 17. Medio de cultivo con <i>T. asperellum</i>	43
Figura 18. Cultivo en matraces e incubadora de agitar.	44
Figura 19. Tratamientos con hongo <i>T. asperellum</i> con la misma dosis.	44
Figura 20. Cámara de Neubauer y su estructura.	45
Figura 21. Diluciones para el conteo en cámara de Neubauer.	46
Figura 22. Siembra del inóculo de <i>T. asperellum</i>	47
Figura 23. Hidratación por aspersión.	47
Figura 24. Cosecha.	48
Figura 25. Prueba Tukey al 5% para los tres tratamientos de la variable Fibra cruda ...	60
Figura 26. Prueba Tukey al 5% para los tres tratamientos de la variable lignina	62
Figura 27. Prueba Tukey al 5% para los tres tratamientos de la variable proteína.	64
Figura 28. Morfología de <i>T. asperellum</i> con cámara en tamo de frejol.	67
Figura 29. Morfología de <i>T. asperellum</i> con cámara en cascarilla de café.	67
Figura 30. Morfología de <i>T. asperellum</i> con cámara del Bagazo de caña.	67

Figura 31. Curva de crecimiento: <i>T. asperellum</i>	68
Figura 32. Variaciones de Temperatura vs humedad en el invernadero hidropónico; <i>T. asperellum</i>	69
Figura 33. Socialización.....	71

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 . Abreviaturas	90
Anexo 2. Sustratos enriquecidos con <i>T. asperellum</i> a los 21 días	91
Anexos 3. Comparaciones de Lignina entre los tres sustratos con el hongo <i>T. asperellum</i>	93
Anexo 4. Porcentaje de Proteína, comparación de los tres sustratos.	95
Anexo 5. Porcentaje de Fibra Cruda, comparación de los sustratos con <i>T. asperellum</i>	96
Anexo 6. Disminución de fibra cruda: comparación de los tres sustratos.....	98
Anexo 7. Disminución de lignina: comparación de los tres sustratos.....	99
Anexo 8. Incremento de proteína microbiana: comparación de los tres sustratos	100
Anexo 9. Crecimiento de <i>T. asperellum</i>	101
Anexo 10. Invitación a la Socialización.	101
Anexo 11. Socialización.....	102
Anexo 12. Encuestas.....	103
Anexo 13. Lista de Asistencia	104
Anexo 14. Análisis de la tabulación de los resultados obtenidos en las encuestas.	105
Anexo 15. Datos base del experimento.	106

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue enriquecer proteicamente los residuos lignocelulósicos, mediante *T. asperellum*. Se utilizó 100g de material lignocelulósico respectivamente; se aplicó la misma concentración, con una dosis de 9×10^8 esporas/ml; esta estaba compuesta de 50 ml de caldo nutritivo y a su vez se encontraba colonizado por el micelio del hongo, se mezcló homogéneamente con los sustratos. Se incubó a 30 °C durante 24 h y se colocó en tubos PVC. Se tomaron muestras a los 21 días de fructificación. En todo el transcurso del experimento se trató de mantener una humedad de 70% y una temperatura de 25 °C, donde, al finalizar el mismo se llegó a tener un 62,53% y 19,92 °C.

El tratamiento del bagazo de caña(BC) fue el que mayor incremento de proteína tuvo, presentando diferencias altamente significativas con un valor de 0,92% a 1,69%, incrementando un 84%, pero al comparar los contenidos de proteína el tamo de frejol (TF); tiene un valor de 5,13%; este por naturaleza tiene un alto contenido en sus tejidos, por lo que al final de la evaluación fue el que mayor contenido de proteína tuvo, dado este no fue el mejor tratamiento, presentando un 18% de incremento. En la cascarilla de café se tuvo un aumento del 28%. Se acepta la hipótesis planteada, debido a que se obtuvo un incremento del más del 10%.

En la cascarilla de café (CC) sin tratar, posee un contenido de 51,36% en lignina, una vez sometida a tratamiento se obtuvo un 30,76% dando una reducción del 60%. En fibra cruda, el bagazo de caña (BC) en un inicio presentó 61,72%; de la misma forma, como se trató a todos se consiguió un 51,74% dando una disminución del 16%.

Palabras clave. – Materiales lignocelulósicos, *T. asperellum*, Lignina, Fibra cruda, Proteína.

ABSTRACT.

The objective of this investigation was to proteic enrich the lignocellulosic residues, by means of *T. asperellum*. 100g of lignocellulosic material was used respectively; the same concentration was applied, with a dose of 9×10^8 spores / ml; This was composed of 50 ml of nutrient broth and in turn was colonized by the mycelium of the fungus, it was homogeneously mixed with the substrates. It was incubated at 30 ° C for 24 hr and placed in PVC tubes. Samples were taken at 21 days of fruiting. Throughout the course of the experiment, an attempt was made to maintain a humidity of 70% and a temperature of 25 °C, where, at the end of the experiment, it reached 62.53% and 19.92 °C.

The treatment of sugarcane bagasse (BC) was the one with the highest increase in protein, showing highly significant differences with a value of 0.92% to 1.69%, increasing by 84%, but when comparing the protein content, the chaff bean (TF); it has a value of 5.13%; This by nature has a high content in its tissues, so at the end of the evaluation it was the one with the highest protein content, given that this was not the best treatment, presenting an 18% increase. In the coffee husk there was an increase of 28%. The hypothesis is accepted, since an increase of more than 10% was obtained.

In the untreated coffee husk (CC), it has a content of 51.36% in lignin, once subjected to treatment it obtained 30.76% giving a reduction of 60%. In raw fiber, sugarcane bagasse (BC) initially presented 61.72%; in the same way, as everyone was treated, 51.74% was achieved, giving a decrease of 16%.

Keywords. - Lignocellulosic materials, *T. asperellum*, Lignin, Crude fiber, Protein.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La agricultura es una actividad fundamental para el desarrollo económico de nuestro país, convirtiéndose en el principal problema de la contaminación ambiental que se ve afectada a nivel mundial. Además, las agroindustrias no llevan un buen manejo de sus residuos (Ramón y Ramón, 2012). Produciendo grandes volúmenes, a su vez, estos mismos provocan efectos ambientales negativos, incluso, no se degradan fácilmente convirtiéndolo en un problema residual. Inclusive, son aprovechados para mejores fines, ya que están compuestos principalmente de celulosa, hemicelulosa, lignina, entre otros (Pineda et al., 2015).

En Ecuador existe una superficie cultivada de café (*Coffea arábica L.*), caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) y frejol (*Phaseolus vulgaris*); es de 180 331 ha., 82 749 ha. y 24 379 ha., respectivamente. Estos cultivos son cosechados durante todo el año, donde, alcanzan una producción de 5 283 t de café en grano (Monteros, 2017); 5 402 376 t de caña de azúcar y 13 805 t de frejol. Actualmente, Ecuador no cuenta con ningún tipo de manejo apropiado, en cuanto a la disposición final de los residuos originados en estas producciones, de hecho, se lo realiza frecuentemente de manera inapropiada (Pineda et al., 2015).

La biotecnología es una buena alternativa para aprovechar y dar uso a los residuos lignocelulósicos; mediante la transformación de estos, donde, a través de hongos filamentosos se dará un valor nutritivo agregado, incluso, aumentará el contenido de proteínas, vitaminas y la digestibilidad del mismo que servirá de alimento para animales (pienso) dependiendo de los resultados obtenidos (Gómez et al., 2013). La fermentación en estado sólido (FES) es un factor importante, no sólo para crear residuos enriquecidos en proteína y utilizar como alimento animal, sino también para lograr otros aditivos de alto valor agregado, como los probióticos o los crudos de enzimas ricos en celulasas, proteasas, pectinasas y lipasas (Dustet et al., 2002).

Debido a este proceso, la fermentación en estado sólido es una opción para generar alimentación de animales rumiantes, en donde, la acumulación de residuos agroindustriales se pueden transformar en alimento con alto valor energético, como proteico nutritivo, que pueden lograr suplantar totalmente la alimentación que proporciona los balanceados, aumentando los costos productivos, originando un aprovechamiento menos productivo en el

área pecuaria, es decir, la fermentación en estado sólido es una opción económicamente viable, así como en lo ambiental sea sostenible, en vista del manejo de los residuos (Pachón, et al., 2005).

Por esta razón es recomendable realizar más investigaciones en esta tecnología ya que a simple vista no pueden presentar características deseables para el ser humano, si se aplica la tecnología adecuada, estos residuos pueden ser beneficiosos, es más, logran crear productos de alto valor agregado. Por tal motivo, esta investigación tiene el propósito de enriquecer proteicamente los residuos lignocelulósicos como el bagazo de caña, tamo de frejol y cascarilla de café, en donde se empleará el hongo filamentoso (*T. asperellum*) con la finalidad de dar nuevas alternativas de uso según los resultados que se obtenga al finalizar la investigación.

A escala comercial, este proceso de reutilización de residuos lignocelulósicos, se transforma en una buena alternativa económicamente viable y compatible ambientalmente en lo que respecta a ecológica, por lo que es rentable para varias empresas agroindustriales (Bardales et al., 2017).

El estudio “*T. asperellum* en el enriquecimiento proteico en los residuos lignocelulósicos” se lo hizo en los laboratorios de la PUCE-SI, cantón Ibarra, provincia Imbabura, cabe señalar, el manejo de la investigación se lo realizó en condiciones controladas (fase de laboratorio) y ambientales (fase de invernadero hidropónico), la meta planteada fue aumentar la proteína microbiana en los tres residuos mediante el hongo, tanto así, que se les da un valor agregado a estos. El documento está formado por ocho capítulos: Introducción, Objetivos, Estado del Arte, Materiales-Métodos, Resultados-Discusión, Conclusiones, Recomendaciones y Bibliografía-Anexos.

En el primer capítulo contiene la Introducción, donde se detalla la justificación de la investigación, también se logra describir el principal problema que embarca a los residuos lignocelulósicos y cómo podemos aprovecharlos de la mejor manera. Además, se describe como está dispuesta la investigación y como se la va a realizar.

En el segundo capítulo se encuentran los objetivos, la hipótesis y las variables dependientes e independientes planteadas para el desarrollo del mismo.

En el tercer capítulo se realizó una recopilación de información bibliográfica sobre el tema a estudiar; caracterización del material lignocelulósico; tamo de frejol (TF), cascarilla de café (CC) y bagazo de caña (BC); FES (Fermentación en estado sólido), ventajas y desventajas, influencia de factores ambientales, además, se revisó a fondo las teorías y condiciones de crecimiento de la especie *T. asperellum* y de esta manera sustentar esta investigación.

En el cuarto capítulo se detallan los materiales y métodos que se usó para cumplir con los objetivos propuestos; procesos, técnicas, equipos entre otros que llevan a la obtención de datos.

En el capítulo quinto se describe los resultados y su discusión en cuanto a; análisis bromatológico del material lignocelulósico (pH, materia seca, humedad, cenizas entre otros); análisis de incremento y disminución de proteína, lignina, fibra cruda en los sustratos; comparación entre tratamientos más *T. asperellum*, crecimiento del hongo y análisis de temperatura.

En el sexto, séptimo capítulo se da a conocer las conclusiones y recomendaciones que se llevó a cabo en el presente estudio. En el capítulo último que corresponde al octavo se encuentra contenido por las referencias bibliográficas y los anexos.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

- Enriquecer proteicamente tres residuos lignocelulósicos, mediante el hongo filamentoso *T. asperellum*.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar la caracterización físico – química los residuos lignocelulósicos: bagazo de caña, tamo de frejol y cascarilla de café.
- Evaluar el enriquecimiento proteico de bagazo de caña, tamo de frejol y la cascarilla de café tratados con el hongo *T. asperellum*.
- Socializar los resultados de la investigación a los actores involucrados.

2.3 Hipótesis

El enriquecimiento proteico de los residuos lignocelulósicos con el hongo filamentoso *T. asperellum*, incrementa al menos el 10% del contenido de proteína.

CAPÍTULO III

ESTADO DEL ARTE

3.1 Material Lignocelulósico

Se lo conoce como biomasa está compuesta por lignina, hemicelulosa y celulosa. Este material pertenece al 50% de la biomasa del planeta. En la figura 1, se puede observar la estructura de la pared celular de las plantas tanto a nivel macro y microscópico, es más, se logra visualizar los polímeros de la celulosa rodeada de hemicelulosa y lignina. Es por ello, que esta estructura tiene una alta resistencia mecánica, permitiéndole a las plantas y árboles mantenerse de pie (Harris, 2012).

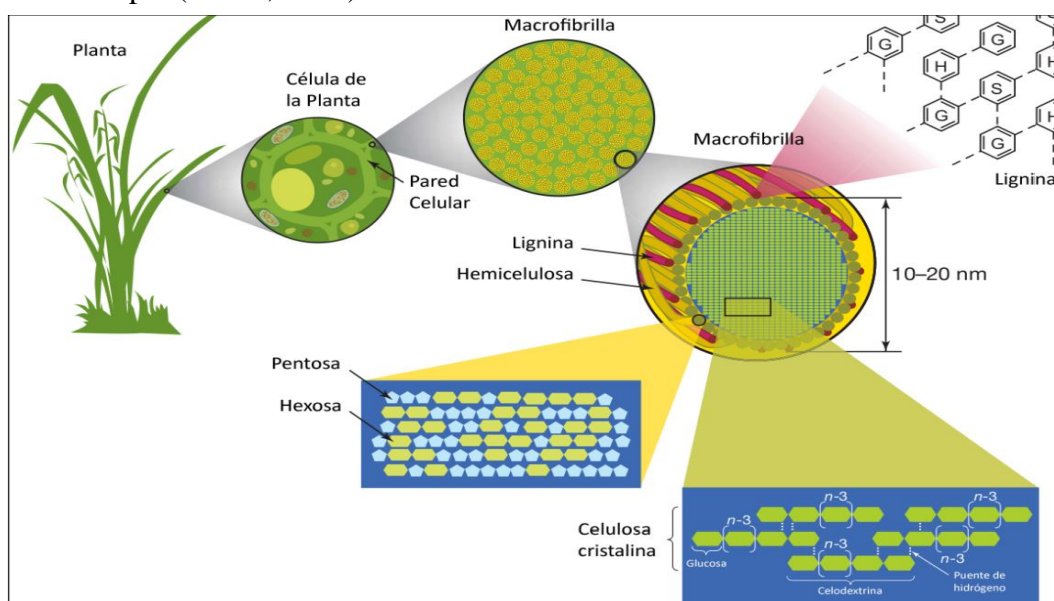


Figura 1. Estructura del material lignocelulósico.

Fuente: Harris (2012).

3.1.1 Biomasa

Según el Manual de energía renovable (como se citó en Cortes, 2011), menciona el término biomasa que abarca a toda la materia orgánica que proviene de árboles, plantas y desechos de animales que pueden lograr convertirse en energía; u originarios de la agricultura (residuos de maíz, café, arroz, macadamia), de aserradero (podas, ramas, aserrín, cortezas) y residuos urbanos (Aguas negras, basura orgánica y otros).

Esta biomasa la podemos utilizar para la producción de energía ya que cubre un amplio rango de materiales y fuentes; como los residuos de la industria forestal y la agricultura, entre estos

tenemos: desechos urbanos y plantaciones energéticas, se usan generalmente, para procesos moderados de conversión que implican la generación de energía, orientados hacia la sustitución de combustible fósiles (Cortes, 2011).

3.1.2 Biomasa lignocelulósica

Anwar et al (como se citó en López, 2016), menciona que la biomasa o los materiales lignocelulósicos son materia prima, además, es la más convincente como fuente natural renovable para producción de energía. Una parte de estos materiales son considerados como resultado de un subproducto residual de prácticas agrícolas y de agroindustrias. Lastimosamente la gran mayoría de la biomasa lignocelulósica es dejada para su descomposición o incinerada. El material lignocelulósico está constituido por varios tejidos de los vegetales cuyas células presentan una pared celular formada por un entramado de microfibras de celulosa formando capas recubiertas y sobre las que se deposita la lignina, se puede observar en la siguiente Figura 2 (Montoya, 2016).

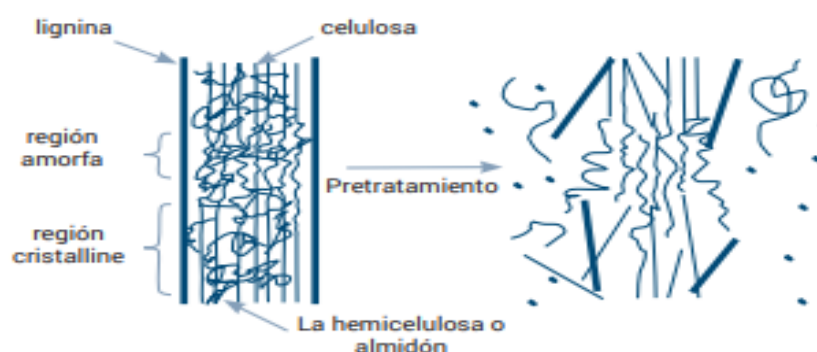


Figura 2. Composición típica de un material lignocelulósico.

Fuente: Cortes (2014).

3.1.3 Características de los materiales lignocelulósicos

Cortínez (2010), señala las fuentes de materiales lignocelulósicos son diversos y están conformados por:

Madera: Bosques vírgenes, plantaciones, residuos primarios de bosques, residuos de procesamiento secundarios.

Residuos agrícolas: De cereales (trigo, arroz, cebada), bagazo (caña de azúcar, sorgo dulce), rastrojos o ameros (maíz), nabo forrajero.

Residuos municipales: Residuos de papel

3.1.4 Componentes estructurales del material lignocelulósico

Principalmente, están compuestos por tres tipos de polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina, cubiertos de una compleja estructura. Además, existe una gran variedad de este tipo de materiales por lo que son abundantes en la naturaleza (Cortes, 2014).

- **Celulosa**

Pettersen (como se citó en Cortes, 2014), menciona que la celulosa está compuesta por subunidades de D-glucosa unidas por un enlace glucosídico β 1-4. En la planta, la celulosa se compone de piezas, con una estructura cristalina. La unión de las capas de celulosa forma las denominadas fibrillas de celulosa o paquetes de celulosa, estas fibrillas de celulosa son en su gran mayoría independientes y débilmente unidos, a través de enlaces de hidrogeno.

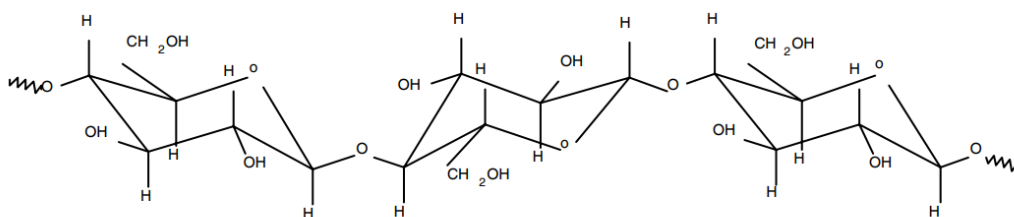


Figura 3. Estructura primaria de la celulosa.

Fuente: Oliva (2003).

- **Hemicelulosa**

Fengel y Weneger (como se citó en Cortes, 2014), menciona que es una estructura compleja de carbohidratos la hemicelulosa que consiste en polímeros de diferentes azúcares como xilosa y arabinosa (pentosas), manosa, glucosa y galactosa (hexosas) y ácidos de azúcar. El componente dominante de la hemicelulosa de la madera y plantas agrícolas es el xilano. Tiene un peso molecular más bajo que el de la celulosa, y con cadenas laterales cortas que constan de diferentes polímeros de azúcares, fáciles de hidrolizar. Laureano et al. (como se citó en Cortes, 2014), menciona que sirve como una conexión entre lignina y las fibras de celulosa; y le da al conjunto de celulosa-hemicelulosa- lignina rigidez.

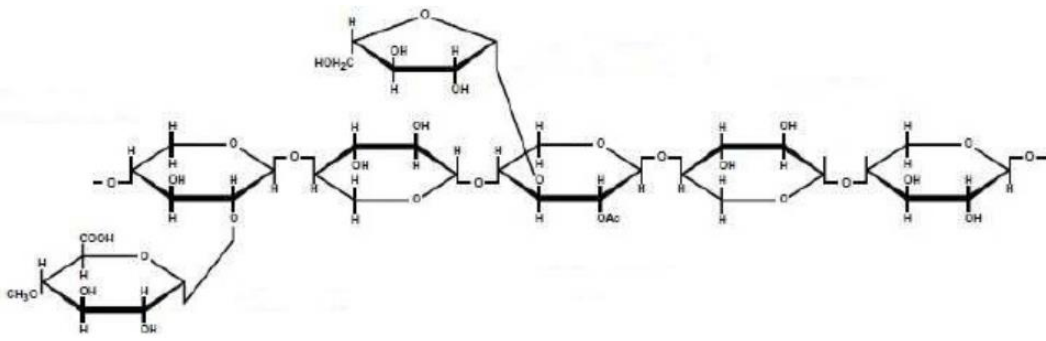


Figura 4. Estructura de la hemicelulosa.

Fuente: Suesca (2012).

- **Lignina**

La lignina es una sustancia aromática polimerizada, son las porciones leñosas de las plantas (Marín, 1999). El propósito de la lignina es dar a la planta el soporte estructural, impermeabilidad y resistencia contra el ataque microbiano y el estrés oxidativo. Por otro lado, es insoluble en agua y se considera ópticamente inactiva, todo esto hace que la degradación de la lignina sea muy difícil.

Es más, es un polímero natural amorfo que actúa como un agente aglutinante entre los componentes del vegetal y está constituido por unidades del tipo hidroxifenil propano. Fengel y Weneger (como se citó en Cortes, 2014), afirma que la lignina está después de la celulosa y la hemicelulosa, uno de los polímeros más abundantes en la naturaleza, es más, se encuentra presente en la pared celular.

Además, la lignina se origina por la polimerización deshidrogenativa al azar de alcoholes para hidroxicinámicos. Es un polímero químicamente heterogéneo y tiene una estructura muy compleja. Por otro lado, todos los monómeros son derivados del fenilpropano y su complejidad resulta un gran número de diferentes enlaces que unen a los monómeros.

La diferencia en la composición de las ligninas se manifiesta en el contenido de grupos metoxi; por ejemplo: 21% en árboles de hojas caducas, 16% en abeto y 14% en gramíneas (Olvera, 2003). Según Steffen y Olvera (como se citó en Huanaco, 2008) mencionan que existen hongos con sistemas ligninolíticos pertenecen principalmente a la clase de los Basidiomycetes y son llamados hongos de la podredumbre blanca, entre los cuales hay especies saprófitas.

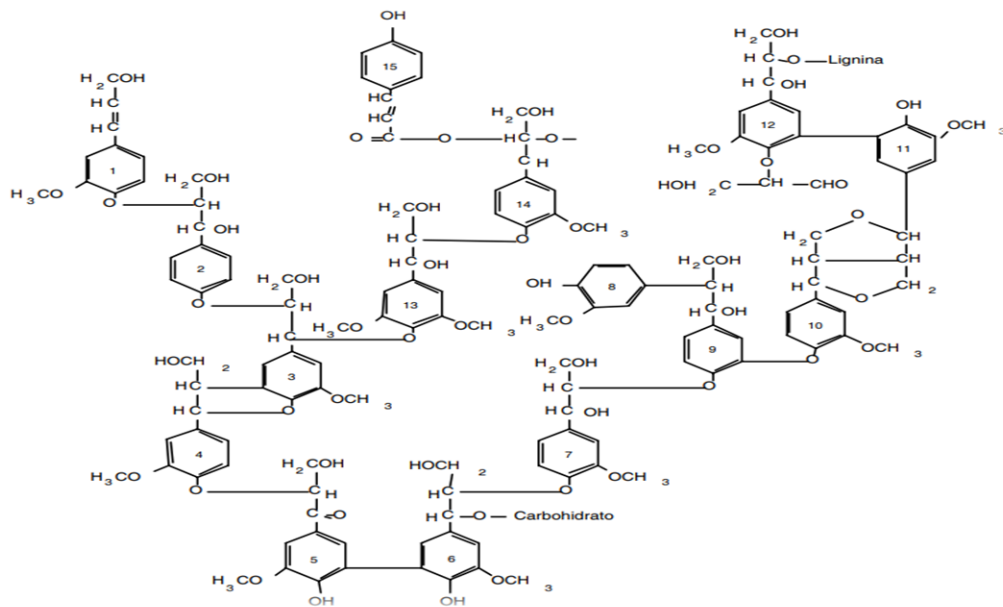


Figura 5. Estructura de la lignina.

Fuente: Oliva (2003).

3.1.5 Proteína Cruda

Según Bourgeois (como se citó en Simbaña, 2014), indica que se llama proteína bruta o cruda porque no solo se determina la proteína, si no también compuestos nitrogenados.

Ávila (como se citó en Simbaña, 2014), afirma. “Se entiende por Proteína Bruta o Nitrógeno Total a la cantidad de Nitrógeno de un alimento determinado por el método de Kjeldahl y multiplicado por 6,25 (100 g P — 16% es N: $100/16 = 6,25$)”.

El método de Kjeldahl, sigue siendo la técnica más confiable para la determinación de nitrógeno orgánico.

3.1.6 Materia seca

Ávila (como se citó en Simbaña, 2014), menciona que la materia seca es la cantidad de agua o humedad presente en un alimento, este valor es esencial para la apreciación del valor nutritivo y su conservación. Además, la muestra a la que se le ha extraído agua por acción del calor.

3.1.7 Humedad

De acuerdo con Mera (como se citó en Báez, 2012); afirma que la determinación de humedad no es tan precisa, es decir, es muy difícil determinarla. El agua se encuentra especialmente en dos formas, como agua enlazada y como agua disponible o libre; el agua enlazada incluye moléculas de agua unidas en forma química, o a través de puentes de hidrógeno a grupos iónicos o polares, mientras que el agua libre es la que no está físicamente unida a la matriz del alimento y se lo puede congelar o perder con facilidad por evaporación o secado. La humedad es la pérdida de peso experimentada por un alimento o pienso cuando se le somete a desecación en estufa de aire, a una temperatura de 100-105°C, hasta peso constante o durante 24 horas. La materia seca (MS) resulta de sustraer al total, el contenido en humedad.

3.1.8 Fibra cruda

La fibra no es un compuesto químico simple, sino una combinación de sustancias químicas que consisten en una variedad de polisacáridos no amiláceos, que incluyen por celulosa, lignina, hemicelulosa, pectina, inulina, agar, quitina, gomas y silicatos; inclusive, algunos autores incluyen, como parte de la fibra algunos compuestos fenólicos, el ácido fítico y otros compuestos antinutricionales presentes en muy pequeñas cantidades en los alimentos. Incluso su composición es diferente dependiendo del origen (Ceballos y Montoya, 2013) (Segura et al., 2007).

La fibra cruda representa la porción no digerible de los alimentos y, por consiguiente, mientras mayor sea su concentración en algún producto dado, menor será su valor alimenticio, aunque es importante mencionarlo para el buen funcionamiento del intestino. La naturaleza química de la fibra cruda, aun cuando no está bien establecida, se cree que está constituida por celulosa, hemicelulosa y lignina. Su determinación se basa en la simulación de la digestión de un organismo por tratamientos ácidos y alcalinos, separando los constituyentes solubles de los insolubles que constituyen los desperdicios a través de las heces (Mendoza y Resendiz, 2008). Es un tratamiento secuencial mediante ácidos y álcalis en condiciones estandarizadas. Con este método se subvalora en forma considerable el contenido de fibra dietética (FDT), es decir, se disuelve gran parte de la lignina y la hemicelulosa, cantidades variables de celulosa y toda la fibra soluble (Grossi, Ohaco y De Michelis, 2015).

3.2 Características Generales de los materiales lignocelulósicos

Los materiales lignocelulósicos son capaces de ser usados en la fermentación en estado sólido y notorios en la bibliografía se destacan: la alfalfa, la paja de cebada y arroz, los residuos de frijón, los pastos, el tamo de trigo, los residuos del maíz, el aserrín de madera, residuos de algodón, de girasol, de cacao, de café, del bagazo de caña, los residuos del plátano, de la soya (Pineda et al., 2015).

Estos tres residuos lignocelulósicos como el bagazo de caña, residuo del frejol y la cascarilla de café, según el investigador Chang y Miles (como se citó en Pineda y Ramos, 2013), mencionan que estos son utilizados como sustratos para la producción de hongos filamentosos, estos hongos, la mayoría son utilizados para la producción de proteína microbiana.

3.2.1 Bagazo de caña (*Saccharum officinarum*)

El bagazo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es un remanente de los tallos de caña, pertenece al grupo de especies no madereras. Leeson y Summers (como se citó en Berman, 2011), menciona que es un residuo fibroso que queda luego de la molienda de la caña de azúcar. Está formado por un grupo de partículas de diferentes tamaños cuyo promedio oscila alrededor de 1 a 25 mm, lo restante consta de sólidos solubles e insolubles. Este está compuesto por celulosa, hemicelulosa y lignina, que se puede visualizarse en la tabla 1 como principales polímeros naturales (Suárez, 2008).

Este no requiere tratamiento previo para ser procesado por los microorganismos, debido al bajo contenido de cenizas, también puede presentar valores de 2,40-8,10% en peso seco, (Pineda et al., 2016), es más, se lo puede utilizar como suplemento en cultivos microbianos para su posterior procesamiento (Grande, 2016). Además, tiene una humedad de 15,00% (Manals et al., 2018).

3.2.2 Tamo de frejol (*Phaseolus vulgaris*)

Según Sánchez (como se citó en Villacís, 2017), menciona que el tallo de los cereales son estructuras que no se usa en la industria alimentaria son llamadas tamo. El tamo crea un desperdicio que comúnmente se usa como alimentación para equinos, tiene un bajo valor comercial, posee un alto contenido de carbohidratos y un bajo porcentaje de lignina, siendo

así más factible su adquisición y ergonómica. También presenta un contenido de materia seca de 43,35% (Macas, 2005).

3.2.3 Cascarilla de café (*Coffea arabica*)

Por cada kilo de café cosechado representa; el 39,40% es pulpa, se deriva 21,60% de mucílago (mielecilla) y el 10,40% es cascarilla; el 19,10% restante se deriva entre residuos en el agua y producto mal formado, es decir, tiene un elevado porcentaje en subproductos no aprovechados. La cascarilla de café o también llamado pergamino de café es la parte que envuelve el grano inmediatamente después de la capa mucilaginosa y representa alrededor de 12,00% del grano (García, 2016).

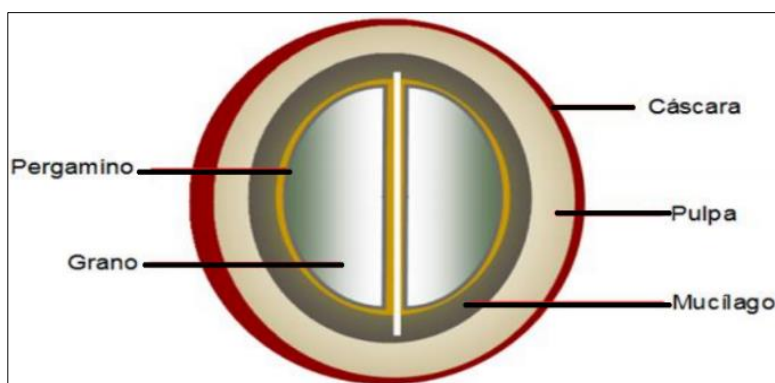


Figura 6. Partes de un grano de café.

Fuente: Manals et al. (2015).

Esta tiene una fuente excelente de celulosa y lignina, pentosas, sílice y cenizas, de la misma manera contribuyen con otros componentes, pero en menor porción (Manals et al., 2018). Esta cascarilla de café se caracteriza químicamente por elevado contenido de fibra cruda, por otro lado, el contenido celular de la cascarilla de café es de 12,00%, mientras que los componentes de las paredes celulares, es decir, de fibra detergente neutra (FDN) y fibra detergente ácida (FDA), se encuentra en valores de 88,00 y 67,00% respectivamente. Además, la celulosa de la cascarilla de café, se la puede utilizar como una fuente de energía para rumiantes; a pesar de esto la utilización de la misma es limitada por la lignina, sílice y otros compuestos. El contenido de cenizas insolubles alcanza niveles de hasta 1,20 a 5,00%, mientras que de humedad presenta un 10,10% (Manals et al., 2018). En cuanto a la materia seca es de 92,80% (Vásquez, 2015), además, según investigaciones por Roa (como se citó en Vásquez, 2015), afirma que tiene un poder calorífico aproximado de 4180,00 Cal. g^{-1} .

Tabla 1

Composición química de la materia prima.

	Componentes	Peso seco (%)	Referencia
Bagazo de caña	Celulosa	46,00-48,00	(Suárez, 2008) y (Villacís, 2017)
	Hemicelulosa	25,00	(Suárez, 2008)
	Lignina	22,00-30,00	(Solorza et al, 2013) y (Antolín y Oliva, 2003)
	Fibra Cruda	55,00-60,00	(Llanes, 2012)
	Proteína Cruda	0,69-0,75	(Manals et al, 2015) y (Gélvez, 2019)
Tamo de frejol	Celulosa	31,00	(González et al, 2011)
	Hemicelulosa	23,00	(González et al, 2011)
	Lignina	9,00-9,35	(González et al, 2011)
	Fibra Cruda	36,19	(Macas, 2005)
	Proteína Cruda	5,10-9,45	(Villacís, 2017) y (Macas, 2005)
Cascarilla de café	Celulosa	36,70	(Arias y Meneses, 2016)
	Hemicelulosa	47,37	(Arias y Meneses, 2016)
	Lignina	15,00-41,00	(Arias y Meneses, 2016) y (Barón, 2014)
	Fibra Cruda	69,00	(García, 2016)
	Proteína Cruda	0,39-1,50	(Vásquez, 2015) y (Salazar et al, 1984)

Fuente: La Autora

3.3 Hongos filamentosos

Este grupo de hongos nos ayuda a mejorar el valor nutritivo de los residuos fibrosos. Estos ayudan a aumentar el contenido de proteínas, vitaminas y la digestibilidad (López, 2016).

Son importantes porque tienen un potencial como fuente de proteína que puede enriquecer la dieta humana. A su vez, se caracterizan por tener cuerpos fructíferos que pueden cosecharse de una manera muy fácil bajo condiciones específicas de cultivo, esto depende del tipo de especie de hongo cultivado ya que estos se propagan de una manera muy fácil en sustratos naturales. Además, estos hongos se caracterizan por incluir nutrientes (proteínas,

grasas, vitaminas y carbohidratos) que favorecen la calidad de vida del ser humano por el consumo de estos organismos, de hecho, varios expertos aconsejan, incorporar estos en la dieta diaria alimenticia (Hernández y López, 2008). Cabe recalcar que este valor de proteína depende del tipo de tejido, estado de desarrollo, sustrato utilizado e inclusive del método de análisis utilizado.

3.3.1 Importancia de los hongos

Estos hongos filamentosos ayudan a mejorar las características de sustratos que tienen bajo valor nutritivo. Además, las paredes celulares de los forrajes, utilizan como fuente primaria de energía para los animales rumiantes. Varios investigadores han demostrado que algunos hongos, especialmente algunas especies de la especie *Pleurotus* pueden colonizar diferentes tipos de desechos o residuos vegetales, de esta forma, aumentan su digestibilidad en cierta forma. Estos estudios de cierta forma demuestran la viabilidad de usar estos residuos para la producción de alimento animal y el sustrato para la producción de un hongo (López, 2016).

3.3.2 Generalidades de los hongos

La taxonomía de los hongos es independiente de los vegetales y los animales, al cual se lo llama Reino Fungí. Lo forman organismos eucarióticos, pluricelulares o unicelulares que pueden ser de carácter microscópico o macroscópico (Grajales, 2015). Estos organismos son dimórficos o pluricelulares, es decir, carecen de clorofila, por lo tanto, son heterótrofos, en otras palabras, obtienen sus alimentos por absorción y el componente esencial de sus paredes celulares es la quitina (Hernández y López, 2008). Por otro lado, son inmóviles, poseen talos unicelulares o filamentosos rodeados por paredes celulares (Martínez, 2014) (Universidad del Valle de Guatemala, 2009).

La mayoría de los hongos se desarrollan como saprófitos en el suelo, sobre restos de plantas o incluso sobre las vivas. Además, estos se organizan a nivel celular, básicamente, en el talo, el cual constituye el aparato vegetativo (normalmente en fase haploide); este se caracteriza por una gran variedad de estructuras, que van desde la forma unicelular (levaduras) a la forma filamentosa, pudiendo presentar un grado considerable de diferenciación. La agrupación de filamentos o hifas se le llama micelio. También los hongos no poseen verdaderos tejidos, como las plantas y los animales, su reproducción es por medio de esporas de manera sexual o asexual (Grajales, 2015).

Alexopoulos y Cols (como se citó en Ozcariz, 2016), menciona que estos hongos se nutren de materia orgánica, se caracterizan por mostrar un sistema filamentosos (micelio) formado por elementos cilíndricos (hifas) que pueden adquirir especialización para constituir estructuras de función reproductora o conservadora.

En los hongos filamentosos, el talo o cuerpo vegetativo, está formado por filamentos delgados denominado hifas, las que muestran un crecimiento apical y en conjunto integran el micelio. Los hongos macroscópicos, su micelio se representa por la masa de apariencia algodonosa y por lo habitual blanquecina que forman un cuerpo de reproducción. Es más, dentro de este se encuentran los Ascomycetes y Basidiomycetes, los cuales presentan una reproducción asexual y/o sexual. (Hernández y López, 2008).

Koneman y Staments (como se citó en Hernández et al, 2008) menciona a los hongos macroscópicos o también llamados Macromycetes y presentan distribución cosmopolita ya que pueden desarrollarse en cualquier tipo de clima, existe una variedad de géneros que pueden crecer entre 4 y 60°C, desde el nivel del mar hasta por encima de los 4000 msnm y en diferentes tipos de maderas.

3.3.3 Género *Trichoderma*

El género *Trichoderma* es muy abundante en la naturaleza, por lo general, se encuentra en madera y en materiales en descomposición en el suelo ya que es un hongo cosmopolita que habita en los suelos. Las especies de este género, reiteradamente son componentes dominantes del microbiota del suelo, es más, producen altos niveles de proteínas extracelulares, y se sabe, que tiene una capacidad de producir enzimas que degradan la celulosa y quitina, y otras enzimas que pueden tener aplicaciones comerciales (Tituaña, 2013). Incluso, comprenden células ubicadas en la superficie de los conidios, de hecho, parece estar envuelto en el ataque inicial de la celulosa. Es más, los productos iniciales de la degradación logran ser tomados por el micelio o ser hidrolizados por β -glucosidasa (Suesca, 2012).

Carlile (como se citó en Suesca, 2012), nos menciona que atacan de manera superficial y son los primeros colonizadores de la madera. Los podemos encontrar de forma natural, viven en asociación con varias plantas, por otro lado, muestran tener un comportamiento endofítico

parecido a las micorrizas, por lo cual, las plantas absorben mejor los nutrientes y se alimentan de los exudados radicales y desechos que se producen (Briones, 2014).

Este género es señalado por Garcés (como se citó en Suesca, 2012), afirma que se encuentra dentro de la división de Ascomycota y de orden Hypocreales. *Trichoderma* es también un eficaz degradador de heteropolisacáridos; como el xilano, a través de la producción de múltiples hemicelulosas y, además, según Cross (como se citó en Suesca, 2012), afirma que algunos aislamientos son agentes de biorremediación, y estos hongos son degradadores de una variedad de pesticidas de alta persistencia en el ambiente.

Daxl (como se citó en Briones, 2014), menciona que favorecen la solubilización de distintos nutrientes como el fósforo que pasan a disposición de la planta, todo esto, junto a un mayor crecimiento y desarrollo del sistema radical, se convierte en una cierta tolerancia del estrés hídrico, más aun, tiene una gran capacidad para absorber nutrientes y, por esta razón, tiene un mayor crecimiento y desarrollo de las plantas protegida.

Este mismo género se caracteriza por presentar conidióforos hialinos, varias veces blanquecinos, no verticilados, fiálides simples o en grupos, conidias hialinas, unicelulares ovoides que yacen en pequeños racimos terminales, se les reconoce brevemente por su rápido crecimiento y el color verde de las conidias (Chávez, 2006).

De entre todos los géneros de hongos el más investigado y estudiado es *Trichoderma*, Reczey (como se citó en Suesca, 2012), afirma que comprende un sistema enzimático con tres clases de enzimas las cuales actúan sinérgicamente para degradar la celulosa a glucosa y lo utilizan para la producción industrial de enzimas, en varios países. En resumen, Carlile (como se citó en Suesca, 2012) revela que han descubierto que *Trichoderma* produce una enzima denominada “hinchadora”, esta rompe enlaces de hidrogeno causando la hidratación de la molécula e hinchamiento, por lo cual ayuda a la degradación.

Whitaker et al (como se citó en Suesca, 2012), menciona que comúnmente la más alta actividad de las enzimas de *Trichoderma* se presenta a un pH 5 y temperaturas < 55°C. Incluso, Ramos (2007) afirma. “La temperatura no debe sobrepasar los 60°C para evitar problemas futuros con los hongos del género *Trichoderma*”.

También presentan enzimas como las hemicelulasas que hidrolizan polisacáridos de plantas no celulósicos e incorporar las xilanasas y mananasas de importancia en la industria papelera. Hoyos et al. (como se citó en Suesca, 2012), menciona que referente a los metabolitos secundarios se da a conocer una amplia variedad de sustancias con actividad anti fúngica (ácido fenílico, 6 pentil α pirona, viridofunginas y harzianopiridona), antisépticos (ácido fenílico, antraquinona, harzianodiona y gliotoxina), reguladores de crecimiento en plantas (ciclonerodiol, harzianopiridona y 6 pentil α pirona), péptidos antimicrobianos e inclusive compuestos fitotóxicos como el viridiol, además de otros con potenciales usos en farmacopea por ser antitumorales e inmunomoduladores (harzianodiona y gliotoxina) y metabolitos no clasificados inhibidores de la síntesis de virus y melanina.

3.3.3.1 Morfología del género *Trichoderma*

Las morfologías de estos hongos presentan un núcleo diferenciado y organelos citoplasmáticos rodeados por membranas con pared celular rígida. En su mayoría son hongos con estructuras vegetativas filamentosas llamadas hifas, es decir, crecen de una forma de largos brazos en todas las direcciones, uniformemente, y delgadas con diámetros de 1 a 2 μ m. Este conjunto de hifas es nominado micelio, el crecimiento es polarizado, sucede en el ápice de la hifa, proliferando a lo largo y mediante el sustrato (Suesca, 2012).

De acuerdo con Garcés y Fraizer (como se citó en Suesca, 2012), argumenta que tiene una reproducción asexual, ósea que, forman un número de células especializadas llamadas esporas, además, al momento de terminar su desarrollo, el género *Trichoderma* se caracteriza por estar formado de micelio septado, multiramificado que finaliza en un esterigma que desprende conidios veré brillantes. Garcés et al. (como se citó en Suesca, 2012), da a conocer. “Este género presenta una célula especializada llamada fiálide, la cual forma fialoconidias. Cada fiálide produce un número de conidias delimitada cada una por un septo, originando una cadena que facilita la dispersión”. Valdés (2014), afirma. “Este género de *Trichoderma* actúa como biodegradante de los agrotóxicos y degrada grupos de pesticidas de alta persistencia en el ambiente, sirviendo como agente descontaminante del suelo”.

Papavizas (como se citó en Niebles, 2012), afirma que se caracterizan por colonizar sustratos en un tiempo muy corto, por lo cual son excelentes competidores por espacio y excluyen a hongos fitopatógenos. Además, son capaces de movilizar y tomar nutrientes del suelo de una

manera más eficaz que muchos organismos, es más, aceptan el alimento del medio, provocando la muerte de los patógenos de las plantas por inanición.

Son capaces de aprovechar grandes cantidades de fuentes de carbono. Martínez (como se citó en Trejo, 2017), afirma. “Tiene una capacidad de producir clamidosporas, es decir, son estructuras vitales para la su sobrevivencia en condiciones adversas”.

De acuerdo con McBeath & Adelman (como se citó en Trejo, 2017), revela:

Son hongos aeróbicos con la capacidad de tolerar un amplio intervalo de temperaturas. Los valores óptimos de pH para su crecimiento se encuentran entre 5,50 a 6,50; y en algunos casos se ha reportado que para su desarrollo en suelos se requiere un 60,00% de humedad. (p. 38)

Como lo señalan Wells et al., Purschwitz et al. y Martínez et al. (como se citó en Trejo, 2017) expresan la alternancia de la luz y su espectro influyen en la esporulación, pigmentación y producción de metabolitos secundarios.

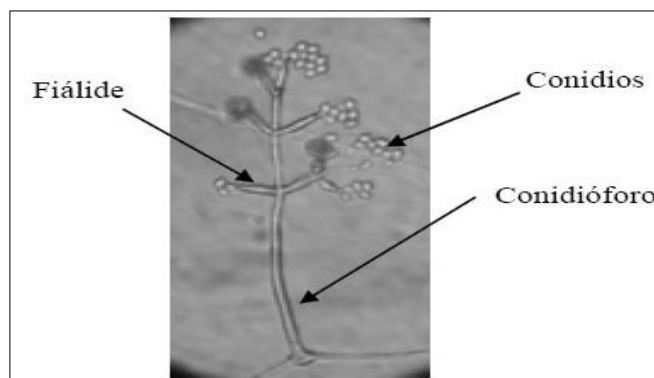


Figura 7. Morfología de hongo *Trichoderma sp.*

Fuente: Infante et al. (2009).

3.3.3.2 Características de *Trichoderma*

Según Silvila y Álvarez (como se citó en Nugra, 2018), menciona las características que presenta el hongo *Trichoderma spp.* se da a conocer en las siguientes:

- Se lo encuentra de forma natural en su mayoría, en suelos agrícolas.
- Se lo encuentra en diferentes zonas y hábitats, de manera especial donde exista materia orgánica, así, como en residuos de cultivos.

- Es un hongo facultativo.
- La mayoría de las colonias de este hongo en un principio es de color blanco, después se toma a verde oscuro amarillento, como consecuencia de una densa esporulación.
- El desarrollo del hongo se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces en las que coloniza muy rápido.
- Tiene una alta capacidad de tolerar un amplio rango de temperaturas, presentando una extensa distribución ecológica.
- Su temperatura óptima oscila alrededor de los 25°C, para su desarrollo y esporulación, cabe mencionar un factor muy importante que se necesita tener en cuenta durante la multiplicación de períodos alternados de luz y oscuridad, que favorezcan la colonización del hongo sobre diferentes sustratos sólidos.
- Tiene una capacidad de degradar sustratos muy complejos como almidón, pectina y celulosa entre otros, y emplearlos para su desarrollo gracias al gran complejo enzimático que posee (enzimas hidrolíticas como amilasas, pectinasas, celulasas y quitinasas, entre otras).
- Se lo encuentra en diferentes zonas y hábitats, de manera especial donde exista materia orgánica, así, como en residuos de cultivos.
- Las condiciones para su desarrollo de *Trichoderma spp*, crece en ambientes ligeramente ácido y tiempos cortos de exposición a la luz. Es más, sus requerimientos nutricionales no son exigentes (Yépez, 2019).

3.3.3.3 Temperatura de crecimiento de *Trichoderma*.

Humeres (como se citó en Nugra, 2018), afirma que varias investigaciones mencionan las temperaturas de crecimiento de *Trichoderma spp*. señalando la activación del crecimiento miceliar de *T. harzianum* fue de 8 a 10°C y la temperatura óptima de crecimiento de 25 a 28°C, alcanzando un máximo de 35°C. Es decir, tiene una alta capacidad de *Trichoderma spp*. de tolerar un amplio rango de temperaturas.

3.3.3.4 Requerimientos nutricionales del *Trichoderma spp*.

Es importante conocer sus necesidades nutricionales de *Trichoderma spp*. Tiene la capacidad de degradar sustratos muy complejos como almidón, pectina y celulosa entre otros y

emplearlos para su beneficio gracias al gran complejo enzimático que posee (enzimas hidrolíticas como amilasas, pectinasas, celulasas y quitinasas, entre otras). De la misma manera, *Trichoderma* capta como fuente de nitrógeno compuesto tales como aminoácidos, urea, nitritos, amoníaco y sulfato de amonio (proceso de fermentación en estado sólido para la producción de *Trichoderma spp* a partir de los residuos agroindustriales como; la cascarilla de arroz (*Oriza sativa*) y residuos de papa (*Solanum tuberosum*) (Nugra, 2018).

3.3.3.5 Relación C/N

La relación C/N (10:1) quiere decir que cuando la concentración de carbono es mayor a la de nitrógeno, la producción de conidios se eleva; y viceversa, cuando la concentración de nitrógeno es mayor a la de Carbono, la esporulación se vuelve nula, el hongo no llega a su reproducción (Yépez, 2019).

3.3.3.6 Propagación de *Trichoderma spp.* en sustratos.

El fin de la propagación del hongo en sustratos es para enriquecer proteicamente los mismos, es decir, para lograr mantener activas las cepas del hongo dentro de un producto agrícola, estas estas una vez purificadas en cajas Petri en medio PDA, son colocadas dentro de sustratos como arroz o arrocillo, que cumplen con sus necesidades nutricionales como almidón, pectina y celulosa (Agamez et al., 2008) (Nugra, 2018).

3.3.3.7 *Trichoderma asperellum*

El hongo *T. asperellum*, Arias (como se citó en Briones, 2014), sostiene que esta especie es un potente antagonista de otros hongos, incluso, son capaces de parasitar los (hiperparasitismo o mico parasitismo) o inhibir su crecimiento y desarrollo. Además, corresponde a la subdivisión deuteromicetes, se caracteriza por no mostrar un estado sexual determinado, inclusive no se conoce que dicho microorganismo sea patógeno de ninguna planta.

Según Briones (2014), afirma. “Esta especie se utiliza como agentes de control biológico a un amplio espectro de hongos patógenos de plantas, como: *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Gaeumannomyces*, *Botrytis*, *Colletotrichum*, y muchos géneros”.

Las principales ventajas de *T. asperellum*, está el parasitismo directo sobre otros hongos, así mismo, este secreta enzimas (celulosas, glucanasas, lipasas, proteinasas y quitanasa), por otra parte, ayudan a disolver la pared celular de las hifas del huésped o patógeno. Briones (2014), afirma. “Facilita la inserción de estructuras especializadas para absorber los nutrientes del interior del hongo huésped, el mismo queda vacío y con perforaciones provocadas por la inserción de las estructuras, causando su muerte”.

Tabla 2.

Clasificación Taxonómica de T. asperellum

Dominio	Eucariotas
Reino	Hongos
Subreino	Dikarya
Phyllum	Ascomycota
Subphyllum	Pezizomycotina
Clase	Sordariomycetes
Subclase	Hypocreomycetidae
Orden	Hypocreales
Familia	Hypocreaceae
Género	Trichoderma
Descriptor Específico	Asperellum
Nombre Científico	<i>Trichoderma asperellum</i>

Fuente: Briones (2014).

Suesca (2012), afirma. “La especie de *T. asperellum* es un hongo filamentoso, por lo que representa dos genotipos distintos con diferentes perfiles metabólicos y preferencias de hábitat”. Por lo general, cualquier tipo de materia orgánica se puede utilizar como sustrato para este tipo de hongos, estos sustratos deben contener lignina y celulosa, cabe recalcar que casi todos los residuos agrícolas lo contienen.

3.3.3.8 Condiciones de crecimiento del hongo *T. asperellum*

Según Sánchez (2009), menciona las mejores condiciones de crecimiento para el hongo *Trichoderma spp.*

- **Temperatura:** se desarrolla dentro de un rango entre 15 y 35, siendo la óptima de 25°C.
- **Humedad relativa:** este hongo es capaz de crecer entre un rango de 20 y 80% siendo la mejor de 70%.
- **pH:** para su desarrollo tiene un rango de 6,00 a 6,50 pero este puede sobrevivir en rangos mayores, debido a la capacidad que este presenta de acidificar el medio en el que se encuentra, mediante secreción de ácidos orgánicos.
- **Carbono:** su principal fuente de carbono que asimila es la celulosa.

3.4 La fermentación en estado sólido (FES)

Esta técnica se la conoce como el crecimiento de microorganismos en medios sólidos, o semisólidos, en ausencia de agua libre. Más aun, esta misma muestra el cultivo aerobio o anaerobio de los microorganismos que se desarrollan en una superficie o al interior de una matriz sólida porosa. Además, la matriz puede estar formada por un sustrato humedecido o por un soporte inerte apto de absorber los nutrientes que se hallen disueltos en una solución sin escurrimiento de líquidos.

3.4.1 Ventajas

Varias investigaciones muestran las ventajas que tiene la FES (fermentación en estado sólido) en relación a las fermentaciones sumergidas. En este caso, Durand (como se citó en Benítez, 2016) indica que en estos procesos no se requiere necesariamente de un medio de cultivo, pues los microorganismos crecen en sustratos sólidos. Supone que estas son tecnologías limpias, pues los bajos niveles de humedad reducen los problemas de contaminación. Por otro lado, menciona condiciones de crecimiento de los microorganismos que son similares a su hábitat natural, además, su alta concentración de producto que se obtiene al final se lo puede secar e incorporar directamente a la alimentación animal.

Singhania (como se citó en Benítez, 2016) menciona las siguientes ventajas de la fermentación en estado sólido:

- Las fermentaciones de este tipo presentan una baja demanda de agua, por lo que existe una disminución de los residuos líquidos del proceso.
- Se consigue una alta concentración de los productos finales y una mayor estabilidad.

- Hay una menor represión catabólica.
- No es necesario de altas condiciones de esterilización, ya que se debe a la baja actividad de agua utilizada en estos procesos.
- Tiene una fácil aireación esto se debe a los espacios entre las partículas de la fibra y la mezcla de partículas.
- Existe una mayor productividad volumétrica, ya que se debe a una alta concentración de sustrato por unidad de volumen.

3.4.2 Desventajas

Aunque tienen grandes ventajas en estos procesos, se menciona algunas desventajas que presenta la fermentación en estado sólido (FES), es por esto que han desalentado el uso de esta técnica para la producción industrial, Holker (como se citó en Benítez, 2016), indica que los principales inconvenientes se encuentran al momento de llevar los resultados del laboratorio a una escala mayor, es debido a la acumulación de altos gradientes de temperatura. Otro inconveniente que se puede observar es el control del resto de las variables de importancia en el proceso, es decir, este aspecto tiene vital importancia en el estudio de las fermentaciones en estado sólido (FES).

3.4.3 Influencia de Factores Ambientales en la fermentación en estado sólido

Con relación a la fermentación en estado sólido las condiciones ambientales como humedad, pH, temperatura, concentración y disponibilidad del sustrato, aireación, tamaño de partícula y forma de inoculación afectan de manera significativa en el crecimiento y la formación de productos. Doelle (como se citó en Días, 2006) menciona una desventaja con el mezclado, la transferencia de oxígeno, el intercambio de calor, el control de humedad y pH, esto se debe a la heterogeneidad y la consistencia del sistema, por otro lado, se recomienda prestar mucha atención en el control de estos factores durante la fermentación en estado sólido (FES).

Humedad

Oriol (como se citó en Días, 2006), considera que la Humedad en fermentación en estado sólido (FES) puede variar entre 30 y 80% en relación al sólido utilizado, el microorganismo y el propósito del proceso (formación de producto, crecimiento de la biomasa).

Kim (como se citó en Días, 2006) reconoce que la humedad no es solo la cantidad de agua que existe en sistema sino la que ejerce sobre la eficiencia del proceso, es más, es la interacción entre el agua y el medio sólido.

pH

Mitchell (como se citó en Días, 2006), revela que el pH afecta en el desarrollo de los procesos en la fermentación en estado sólido (FES). El control de esta variable es un inconveniente que no se pobra controlar ya que depende de la oxidación. Incluso el mezclado de los sólidos fermentados también complica el control de esta variable.

Temperatura

Bernard (como se citó en Días, 2006), considera a la temperatura como una variable de control en la fermentación en estado sólido (FES), se tiene en cuenta como el más crítico debido a la alta concentración de sustrato por unidad de volumen y a la baja conductividad térmica del sistema heterogéneo sólido - líquido - gas, lo que beneficia a la acumulación del calor metabólico en el sistema y un aumento en la temperatura del cultivo. Por otro lado, Gutiérrez (como se citó en Días, 2006), menciona el aumento de temperatura beneficia a tres desventajas: La actividad microbiana se disminuye o se para, se deshidrata el medio sólido y el metabolismo se aleja como un mecanismo de defensa ante el calor o ante la deshidratación.

La concentración y disponibilidad del sustrato.

Guzmán (como se citó en Catucuamba, 2013), menciona que el sustrato que se emplee en la investigación debe de estar relacionado con su composición química, este tendrá que contar con todos los nutrientes indispensables para el crecimiento del hongo. Entre ellos debe estar la celulosa, las hemicelulosas, y la lignina, además, funcionan como fuentes principales de lignina y nitrógeno. De la misma forma, se sugiere que el sustrato esté libre de sustancias antifisiológicas que perjudiquen el crecimiento del micelio, como son táninos, fenoles, ácidos, resinas, compuestos aromáticos, etc., originarios de fumigaciones o de malos manejos. Días (2006), afirma “Las relaciones entre algunos de sus elementos son de particular importancia, por ejemplo, carbono-nitrógeno y fósforo-oxígeno; esta última de manera relevante en lo referido a la eficiencia de conversión energética y a la respiración”.

Aireación

Las aireaciones en los procesos de fermentación en estado sólido (FES) en su mayoría intervienen microorganismos aerobios, y la aireación es un factor principal para el desarrollo del proceso. Este mismo se usa para suministrar oxígeno necesario, para quitar el CO₂ formado, así como para quitar el calor metabólico evolucionado, de manera que el flujo óptimo de aire debe tomar en consideración la naturaleza del microorganismo, los requerimientos de oxígeno para el crecimiento y la formación del producto deseado. (Días, 2006, p. 24)

Tamaño de partícula

Moo Young (como se citó en Días, 2006), afirma. El tamaño de partícula está vinculado a la transferencia de masa en el sistema de fermentación en estado sólido (FES), en donde se tiene que analizar la intrapartícula y la interpartícula. La gran mayoría de investigaciones son realizadas con hongos filamentosos (Días, 2011). Los hongos filamentosos (*Aspergillus*, *Claviceps*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Trichoderma*) son los microorganismos más adaptados al cultivo en medio sólido.

Días (2011), afirma. “El crecimiento en forma de micelio y su tolerancia a bajas actividades de agua y condiciones de alta osmolaridad hacen que los hongos sean la microflora natural más adecuada para la fermentación sólida”. Por otro lado, las bacterias y levaduras necesitan de una alta actividad de agua ($A_w > 0,98$); los hongos filamentosos son capaces de crecer con valores de A_w tan bajos como 0,85; es por eso que estos microorganismos son muy aptos para la fermentación en estado sólido (FES). Pandey (como se citó en Días, 2011) considera que un bajo nivel A_w favorece la germinación y el crecimiento miceliar de los hongo.

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Ubicación

La elaboración y control de la presente investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Química Analítica Instrumental, Bromatología y Microbiología de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede-Ibarra, donde se hizo la respectiva caracterización a la materia prima (Tamo de Frejol, Cascarilla de Café y Bagazo de caña) con los siguientes materiales y equipos.

La ubicación de los Laboratorios de Química, Bromatología y Microbiología se detalla en la tabla 3.











Tabla 3

Ubicación de los Laboratorios ECAA

Provincia	Imbabura	Longitud	W 078 °
Cantón	Ibarra	Latitud	06'24"
Parroquia	El Sagrario	Altitud	N 0°21'01"
Ciudadela	La Victoria	Temperatura	2221 msnm 18°C

Fuente: Estación Meteorológica PUCE-SI, año 2019.

4.2 Materiales

-  Pinzas
-  Matraz
-  Tubo digestor
-  Crisol de fibra y porcelana
-  Desecador
-  Refrigerante
-  Balón de destilación
-  Succionador
-  Vaso de precipitación
-  Pipeta graduada

- ✚ Bureta
- ✚ Balón de fondo plano
- ✚ Peletizadora
- ✚ Matraz Kjeldahl
- ✚ Mortero con pistilo
- ✚ Filtros de disco de membrana de 47mm
- ✚ Hilo de celulosa
- ✚ Tiras de pH
- ✚ Vidrio reloj
- ✚ Platos de aluminio

4.3 Equipos

- ✚ Balanza desecadora AE ADAM; Adam Equipment
- ✚ Bomba calorimétrica PARR; 6100
- ✚ Potenciómetro OAKTON; pH 6 +
- ✚ Molino mezclador y homogenizador Retsch; GM 200
- ✚ Cabina de flujo Haier; HRCS-25
- ✚ Mufla DAIHAN; FH-12
- ✚ Digestor Berth; Inkel M
- ✚ Estéreo microscopio Micros Austria; MS 1030
- ✚ Autoclave ICANCLAVE; INV/9
- ✚ Cabina de bioseguridad N-BIOTEK, Cámara de flujo laminar
- ✚ Destilador TE-0364; TECNAL
- ✚ Analizador de fibra VELP; FIWE
- ✚ Microscopio Motic; BI-220
- ✚ Balanza analítica Adam; PW 254
- ✚ Shaker Incubator N-BIOTEK; NB-205L
- ✚ Bomba de vacío BOEGO; R-300
- ✚ Estufa Memmert; SNB 300
- ✚ Manta calefactora DAIMAN Scientific; Heating Mantle

4.4 Reactivos

- ✚ Agua destilada
- ✚ Ácido benzoico
- ✚ Ácido Sulfúrico
- ✚ Catalizador
- ✚ NaOH 40%
- ✚ Ácido bórico 2%
- ✚ Indicador Rojo tashiro
- ✚ H₂SO₄ 0,1N
- ✚ Ácido sulfúrico al 1,25%
- ✚ Hidróxido de potasio al 1,25%
- ✚ Ácido sulfúrico al 72% y al 3%

4.5 Software

Para el estudio estadístico y toma de datos se utilizaron los siguientes programas:

- ✚ Microsoft Excel 2016; versión 16.0
- ✚ R-Studio; versión 1.2.1335
- ✚ HOBOWare; versión 3.74

4.6 Objeto de estudio

4.6.1 *Trichoderma asperellum*

Este hongo fue proporcionado por el laboratorio del Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente (CEBA).

4.6.2 **Materia prima**

La obtención del material lignocelulósicos/sustrato se llevó a cabo en tres lugares distintos, que se da a conocer a continuación:

- ✚ **Tamo de frejol** (*Phaseolus vulgaris*)

El tamo de frejol (TF) fue proporcionado de los agricultores de la Comunidad de Alor que se localiza hacia el oriente del cantón Bolívar, de la provincia del Carchi, sus coordenadas

son 18 N 0176325 y UTM 0049497 con una altura de 2256 msnm. Esta localidad cuenta con una precipitación de 20 mm, una Humedad relativa de 65% y una temperatura de 17°C.

Cascarilla de café (*Coffea arábica*)

La cascarilla (CC) se obtuvo de la cosecha de café de la granja de la ECCA de la PUCE-SI ubicada en la provincia de Imbabura del cantón Ibarra perteneciente a la parroquia el Sagrario de la ciudadela la Victoria. Además, sus coordenadas son 17N 0822226 y UTM 0038707 con una altura de 2200 msnm. Este lugar tiene una temperatura 22°C, una precipitación de 48 mm.

Bagazo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*)

El bagazo de caña de azúcar (BC) se obtuvo de la agroindustria del Ingenio Azucarero del Norte (IANCEM) que se encuentra ubicado en la Panamericana Norte a 25 km, vía Tulcán, en el sector de Tababuela, este pertenece a la provincia de Imbabura del cantón Ibarra de la parroquia Ambuquí, sus coordenadas son 17N 0823044 y UTM 00552975 al este, tiene una altura de 1556 msnm y una temperatura de 22°C. También, tiene una precipitación de 20 mm.

4.7 Métodos

Se realizó una caracterización a la materia prima (Tamo de frejol, cascarilla de café y bagazo de caña), en donde, se desarrolló un análisis bromatológico con las variables dependientes e independientes, siguiendo los respectivos métodos detallados en el ítem 4.10.1. C

4.7.1 Hipótesis

El enriquecimiento proteico de los residuos lignocelulósicos con el hongo filamentoso *T. asperellum*, incrementa al menos el 10% del contenido de proteína.

4.8 Análisis Estadístico Experimental

4.8.1 Diseño Experimental

En esta investigación se realizó el Diseño Completamente al Azar (DCA), con 3 tratamientos, 4 repeticiones con un total de 12 unidades experimentales. En caso de detectarse diferencias significativas entre tratamientos se utilizará la prueba de significancia Tukey al 5%.

Los datos que se obtendrán en este experimento se los analizará a través de un análisis de varianza (ANOVA) de factor único. Se evaluará entre tratamientos las variables (proteína, lignina y fibra cruda) para determinar el incremento o disminución de estas, mediante el uso del hongo *T. asperellum*.

Tabla 4

Análisis de varianza

FV	GL
Total	11
Tratamientos	2
Error exp.	9

Fuente: La Autora

4.8.1.1 Unidad Experimental

En esta investigación, sus unidades experimentales son; bagazo de caña, tamo de frejol y cascarilla de café, además a estas tres unidades experimentales se les aplicará el mismo tratamiento con una misma dosis de concentración de hongo (*T. asperellum*).

Se tomó como referencia la investigación de Llenque et al. (2015), para determinar la dosis, se realizó un conteo de esporas equivalentes a una concentración final de $9,0 \times 10^8$ esporas ml^{-1} , por recuento en cama de Neubauer, constituyendo el inóculo.

Para la realización del inóculo de *T. asperellum* se preparó primeramente el cultivo puro, en donde, se sembró en caldo nutritivo y se incubó a 30°C por 24 horas. Luego se realizó la suspensión de esporas en agua destilada estéril dando una concentración final de 9×10^8 esporas ml^{-1} . De igual forma en este ensayo se inóculo 50ml de esporas a los tubos de PVC (Fig. 22) conteniendo 100 g de sustrato (bagazo de caña, tamo de frejol y cascarilla de café); además se incubó a una temperatura ambiente (23 a 25°C). Se realizó un monitoreo de la producción de proteína, pero se lo hizo al culminar el ensayo que fue el día 21. En la tabla 5 se detalla la composición de cada uno de tratamientos.

Tabla 5

Composición de Tratamientos

Tratamientos	Tipo de materia prima	Cantidad de materia prima (g)	Dosis del hongo <i>T. asperellum</i> (esporas ml ⁻¹)
T1	Tamo de frejol	100	9x10 ⁸
T2	Cascarilla de café	100	9x10 ⁸
T3	Bagazo de caña	100	9x10 ⁸

Fuente: La Autora

4.9 Otras variables evaluadas

➤ Curva de crecimiento

La curva de crecimiento se realizó para observar el crecimiento del hongo, es necesario aclarar que el monitoreo se lo realizó, pasando un día, desde el día uno hasta el día 21. Con base a Arana et al. (2010) y Nugra (2018) se siguió el siguiente proceso, donde se extrajo 1 g de cada unidad experimental incubada, que fueron colocadas en tubos de ensayo; luego se colocó 8 ml de agua destilada, debido a esto se tuvo que realizar las respectivas diluciones y se procedió al recuento de esporas ml⁻¹ (*T. asperellum*) en cámara de Neubauer .

➤ Temperatura, Humedad, Materia seca

La temperatura fue evaluada por medio de este equipo HOBOWare, se tomó cada 4 horas, así que, se lo realizó para conocer las diferentes temperaturas a las que estuvo expuesto el hongo (*T. asperellum*). Además, se evaluó también la humedad y materia seca (Trejo, 2017).

4.10 Caracterización del material lignocelulósico

Es importante conocer el contenido de cada sustrato en los diferentes parámetros que requiere esta investigación, obteniendo una base de datos inicial para su respectiva comparación al finalizar el experimento con el hongo inoculado en el medio sólido (material lignocelulósico) (Pineda y Ramos, 2013).

4.10.1 Análisis Bromatológico

Determinación de humedad

Para la determinación de humedad se usó el Método rápido de la termobalanza para alimentos, se lo encuentra de la siguiente manera NMX-F-428-1982 en las Normas Mexicanas (NMX), descrito por la Sociedad Mexicana de Normalización y Certificación S.C. (NORMEX).

De acuerdo con las Normas Mexicanas (NMX, 1982); recomienda el siguiente procedimiento estándar:

- Soltar el sujetador del plato para muestra, revisándolo para asegurarse de que el plato corre libremente sobre su soporte finamente punteado, y que esté limpio y seco.
- Ajustar al 0 y 100%.
- Colocar 5 g de la muestra, pesando en la misma balanza desecadora y distribuirla cuidadosamente y uniformemente en el platillo.
- Con la fuente de potencia debidamente ajustada, bajar la tapa de la balanza. La muestra comenzará a perder humedad. Presionar enter para dar inicio al proceso.
- Se demora de 10 a 20 minutos, deberá tomarse la lectura, y si ésta permanece estable durante 2 minutos se registrará como porcentaje total de humedad.
- Por medio de esto se determinará el porcentaje de humedad y materia seca.



Figura 8. Termo balanza.

Fuente: La Autora

✚ Determinación de pH

Para la determinación de pH se empleó el Método I (en agua destilada); se lo encuentra descrito por de la siguiente manera AOAC 973.04, detallado en la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC, 1990).

De acuerdo con la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC, 1990); recomienda el siguiente procedimiento:

- En la balanza analítica se taró y se pesó 5 g de muestra.
- Se colocó la muestra en un vaso de precipitación de 500 ml a la cual se le adicionó 200 ml de agua destilada (H₂O₂).
- Se agitó constantemente con un agitador magnético por 30 minutos.
- Luego, durante 20 minutos se dejó decantar la muestra y se procedió a la toma de lectura con un potenciómetro tomando en cuenta que no esté en contacto con las paredes del vaso, para que no altere la lectura.

Nota: El 973.04 identifican el método por año de adopción de la primera aparición en los métodos oficiales de análisis (métodos más antiguos). El 973 = primera acción 1973; 04= secuencia de adopción en 1973.



Figura 9. Determinación de pH.

Fuente: La Autora

Determinación de Energía

Se utilizó el método de bomba calorimétrica. De acuerdo con Mera (como se citó en Báez, 2012); recomienda el siguiente procedimiento:

- Encender el equipo “Bomba calorimétrica” de 15 a 30 minutos antes del análisis para estabilización y Registro de condiciones (Establecer método de determinación y unidades).
- Elaborar una pastilla cuyo peso sea lo más cercano a 0,5 g; en base seca (Con ayuda de la peletizadora).
- Colocar la pastilla en el recipiente metálico, asegurarla mediante un hilo de celulosa al alambre conductor de la tapa del calorímetro.
- Adicionar 8 ml de agua destilada a la bomba calorimétrica.
- Colocar con cuidado (con el menor movimiento posible) la tapa de la bomba y cerrar.
- Llenar la bomba de oxígeno durante 60 segundos con ayuda del control de mando del equipo. Luego, asegurar todas las llaves de presión y verificar que estén cerradas.
- Introducir la Bomba calorimétrica dentro del baño de enfriamiento, lleno con dos litros de agua destilada.
- Conectar las terminales eléctricas de equipo a la bomba.
- Cerrar la tapa e iniciar el proceso (pulse tecla empezar).
- Registrar la identificación de la muestra el número de bomba (1) y el peso de la pastilla (con cuatro cifras decimales).
- Limpiar los datos de la gráfica del display del equipo
- Tiempo de análisis 15 minutos, más tiempo de estabilización 5 minutos (datos establecidos en la estandarización).
- Registrar los datos obtenidos

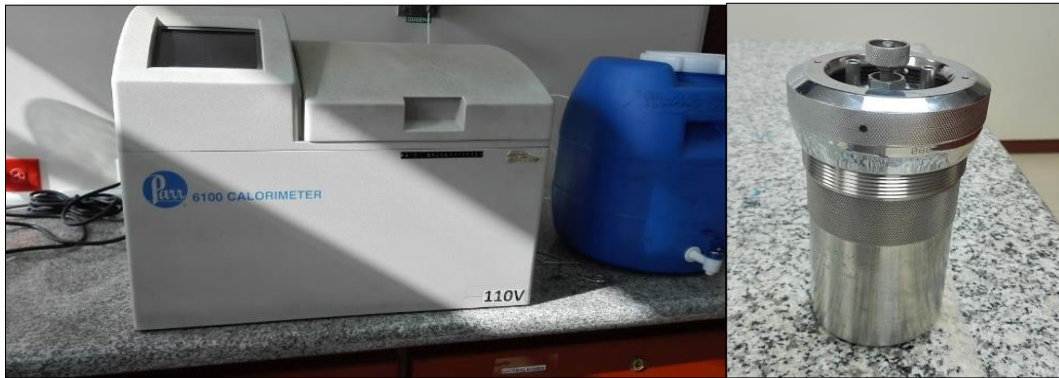


Figura 10. Bomba calorimétrica.

Fuente: La Autora

Determinación de Proteína

Para la determinación de Proteína se empleó el Método de Nitrógeno Total y Proteína Bruta de Kjeldahl para alimentación animal; se lo encuentra descrito de la siguiente forma AOAC 984.13 en la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC, 1990) y (Molina, 2014).

De acuerdo con la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC, 1990); da a conocer el siguiente procedimiento estándar:

- Triturar y pesar 2 g de cada muestra, anotar su peso.
- Colocar las muestras en cada tubo de ensayo grande y etiquetar.
- Colocar los tubos en el digestor.
- Encender la maquina (Digestor) y calentar a 80 °C.

Agregar en cada muestra:

- Añadir la pastilla catalizadora.
- Añadir 12 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 98% c + 3,3 ml de H_2O_2 al 10% V/V todo esto se realizó dentro de la soborna y con las ventanas cerradas.
- Colocar las tapas en los tubos.
- Encender la soborna y bajar la tapa de esta para que se extraigan los gases.
- Digestar por un periodo de 3 horas hasta que cambie de color. De negro a amarillo pálido.

Destilado:

- Retirar los tubos del digestor.
- Dejar enfriar dentro de la soborna.
- Neutralizar las muestras agregando 50 ml de agua destilada y 50 ml de NaOH al 35%, agregando estas cantidades lentamente para evitar quemaduras.
- Encender el destilador, conectar la máquina y abrir la llave de agua.
- Dejar que la máquina se caliente hasta que se programe el tiempo de 3 minutos que aparecerá en la pantalla.
- Lavar la máquina colocando un tubo con agua destilada y presionar start.
- Retirar el tubo con guante y con cuidado (muestra caliente).
- En un matraz Erlenmeyer de 250 ml colocar 50 ml de ácido bórico y 4 gotas de rojo tashiro.
- En el destilador colocar el matraz y tubo de ensayo con la muestra ya neutralizada
- Comprobar si la solución del matraz cambie de color a verde. Una vez que cambie de color la muestra retirar el tubo y matraz.

Titulación:

- Con la solución que queda en el matraz de color azul, adicionar el Ácido clorhídrico (HCL) al 0,2 Normal.
- Titular con el HCL hasta que cambie de color a rosado pálido.
- Anotar la cantidad de ml de HCL (Mera, 2015).

Calcular por medio de la fórmula el % de proteína y nitrógeno:

$$\%N = \frac{(VM \times VB \times 0,014)}{PM} \times 100$$

$$\%PB = \%N \times Fc$$

Donde:

VM: Volumen de la muestra, VB: volumen del blanco, PM: peso de la muestra

PB: Proteína Bruta, Fc: Factor de conversión (6,25 para forrajes)



Figura 11. Digestando, Destilando y Titulando.

Fuente: La Autora

Determinación de Cenizas

Para la determinación de Cenizas se empleó el Método de Cenizas Totales o Gravimétrico para alimentos especiales, se lo encuentra descrito de la siguiente forma AOAC 942.05 en la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (Serna y Torres, 2015).

De acuerdo con la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC, 1990); recomiendan el siguiente procedimiento:

- Pesar 2 g de la muestra en un crisol de porcelana y colocar en la mufla las muestras a una temperatura de 550°C durante 3 horas. Mantener esta temperatura durante el tiempo antes mencionado. Transferir el crisol directamente a un desecador, enfríe y pese inmediatamente, y luego pesar y anotar su peso.

Calcular por medio de la formula.

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{CC - C}{PM} \times 100$$

Donde:

CC: Peso crisol más ceniza

C: Peso crisol vacío.

PM: Peso Muestra



Figura 12. Mufla.

Fuente: La Autora

Determinación de Fibra Cruda

Para la determinación de Fibra Cruda se usó el Método de Weende para alimentación animal, se lo encuentra descrito de la siguiente forma AOAC 962.09; en la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC, 1990).

De acuerdo con la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC, 1990); da a conocer el siguiente procedimiento estándar:

Lavar y secar completamente los crisoles a utilizar.

- Pesar los crisoles y anotar su peso inicial.
- Secar los crisoles en la estufa a 110°C por 1 hora.
- Pesar los crisoles, comparar si están tarados y anotar su peso.
- Pesar 0,5 g de la muestra, anotar su peso y colocar en cada crisol.
- Colocar cada crisol en el analizador de fibra, bajar la palanca y comprobar si no hay fugas.
- Colocar 6,44 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 97% + 493,52 ml de H_2O_2 en la jarra verde para obtener un H_2SO_4 al 1,25%. Esta preparación en cada crisol hasta la segunda muesca, durante 30 minutos a una temperatura de 8°C.
- Una vez transcurrido el tiempo presionar vacum y drenar lo restante, lavar 3 veces con H_2O_2 caliente, adicionar KOH.
- En el recipiente morado colocar 6,28 ml KOH al 85% + 500 ml de H_2O_2 para obtener KOH al 1,25%. Durante 30 minutos a una temperatura de 7 °C, transcurrido el tiempo

presionar Vacuum y Drenar lo restante, lavar 3 veces con H₂O₂ caliente y 1 vez con agua destilada fría.

- Adicionar el 25 ml de acetona por muestra lavar por 1 minuto muy suave, proceder a evacuar lo restante, retirar el crisol.
- Colocarlos en la estufa los crisoles a 110°C (F1) por 1 hora.
- Dejar en el desecador por 15 minutos, pesar y anotar su peso.
- Colocar en la mufla a 400°C (F2) por 3 horas.
- Dejar en el desecador durante 15 minutos, pesar y anotar su valor.

Calcular por medio de la formula.

$$\%Fibra Cruda = \frac{F1 - F2}{F0} \times 100$$

Donde:

F1: Peso después de secar en la estufa a 110°C.

F2: Peso después de sacar de la mufla a 400°C por 3 horas

F0: Peso de la muestra



Figura 13. Extractor de Fibra cruda.

Fuente: La Autora

Determinación de lignina insoluble en ácido

Para la determinación de Lignina Insoluble se empleó el Método Klason, en donde se usó los procedimientos estándares descritos en TAPPI 222 om-02. La Asociación Técnica de la Industria del Papel y la Pulpa (TAPPI) es la encargada de dar este tipo de normas estandarizadas.

De acuerdo con la Asociación Técnica de la Industria del Papel y la Pulpa (TAPPI, 2002); da a conocer el siguiente procedimiento estándar:

- Las muestras (trituradas) pesar $1,0 \pm 0,1$ g (W), es decir, con precisión de 0,0001 g.
- Añadir 20 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 72% en los vasos de precipitación (100 ml) que contienen las muestras.
- Se añadirá gradualmente en pequeños incrementos mientras se agita suavemente, de ser necesario, la maceración del material con una varilla de vidrio.
- Después se dispersa el espécimen, cubrir el vaso con un vidrio de reloj y mantenerlo en un baño a $20 \pm 1^\circ C$ durante 2 horas.
- Agitar el material con frecuencia durante este tiempo para asegurar la solución completa.
- Transferir el material en un balón aforado
- Enjuagar y diluir con 770 ml de agua destilada hasta tener una concentración de ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 3%.
- Conectar el balón aforado a un refrigerante y se mantiene a ebullición durante 4 horas en una manta calefactora, manteniendo un volumen constante.
- Se deja sedimentar el material insoluble (lignina), manteniendo el balón aforado en una posición inclinada. Si la lignina es finamente dispersa, puede requerir un periodo más largo de tiempo o una noche para asentarse.
- Sin agitar el precipitado, se filtra mediante una bomba de vacío con ayuda de un filtro de disco de membrana de 47 mm (Figura 14).
- El sólido filtrado se lava con agua desionizada caliente hasta que el pH del agua de lavado no sea ácido o esté libre de ácido
- Secar las muestras en estufa a $105^\circ C$ hasta tener un peso constante.
- Enfriar en un desecador y pesar (A) (Fuentes, 2018).

El contenido en lignina se calcula con la siguiente expresión:

$$\%Lignina = \frac{A \times 100}{W}$$

Donde:

A: peso seco de la muestra a 105°C.

W: peso inicial



Figura 14. Manta calefactora y bomba de vacío.

Fuente: La Autora

4.11 Preparación de la materia prima e inoculación

✚ Recolección y preparación de la materia prima

Se recolectó aproximadamente 24 kg de cada sustrato (Tamo de frejol, cascarilla de café y bagazo de caña). En el caso del bagazo de caña fue tamizado en tamaños de 0,6 y 1,8 cm (Bermejo, 2016). El tamo de frejol se llevó a una disminución de tallo en el cual fue cortado con ayuda de tijeras podadoras. Estos sustratos nos sirvieron como seguro de alimentación para el cultivo del hongo seleccionado (*T. asperellum*) y sobre este crece el micelio; es decir, sus propiedades físico químicas determinarán los organismos que pueden crecer en él. A continuación, se detalla todos los procesos que se usó en los sustratos seleccionados antes de ser inoculados con el hongo *T. asperellum*.



Figura 15. Preparación de los sustratos.

Fuente: La Autora

+ Lavado

Una vez colectado los sustratos como el tamo de frejol, la cascarilla de café y el bagazo de caña, se los lavó con agua de la llave para retirar el polvo o suciedad que exista, si lo requiere (Vargas y Guerrero, 2010). En el caso del bagazo se retiró manualmente impurezas y residuos no deseados. Solo se dejó exclusivamente el bagazo (Bermejo, 2016).

+ Secado

Los diferentes sustratos se los dejó secar con el sol durante un par de días. En cuanto al bagazo de caña es importante su secado ya que tiene la finalidad de hacer que la caña pierda la clorofila que este posee dado que los hongos no crecen en sustratos que contienen este compuesto. Luego, se almaceno en fundas por no más de 30 días, para prevenir que se contamine con microorganismos indeseables (Oviedo et al., 2016).

+ Procesamiento del Material

El tamaño de partícula del material vegetal entre 2 a 5 cm es el que mejores resultados arroja. Se obtuvo este tamaño con el tamo de frejol con la ayuda de una tijera podadora. En el bagazo de caña no fue necesario ya que cuenta con una disminución de partícula. En la cascarilla de café fue innecesario ya que tiene un tamaño aproximado de 5 cm (Vargas y Guerrero, 2010).



Figura 16. Molino mezclador y Homogenizar.

Fuente: La Autora

Preparación de los medios de cultivo

Primero, el medio de cultivo y el material previo a usar fue esterilizado en una autoclave. En segundo lugar, se desinfectó la cámara de flujo laminar con alcohol. Después, se sembró la cepa en 12 tubos de ensayo, de hecho, estos contenían 9 ml de caldo nutritivo estéril. La siembra del hongo se lo hizo con la ayuda del aza haciendo un leve raspado sobre las colonias de *T. asperellum*, ósea, se introdujo la misma en los tubos antes mencionados, esto se lo realizó de manera aséptica, previamente etiquetados y tapados con algodón. Se incubó por 24 horas a 30°C.



Figura 17. Medio de cultivo con *T. asperellum*.

Fuente: La Autora

Preparación del inóculo

Se inició con 12 matraces Erlenmeyer estériles y listos para añadir el medio de los tubos ya propagados con el hongo. Las esporas que fueron producidas en los 12 tubos de ensayo en la fase de propagación, se realizó un traspaso a los matraces de 250 ml. Esto se colocó en

una incubadora de agitar (modelo NB-205L) a 30°C durante 24 horas. La finalidad de esto es incrementar el número de microorganismos.



Figura 18. Cultivo en matraces e incubadora de agitar.

Fuente: La Autora

✚ Medios de cultivo con la misma dosis

Es necesario explicar cómo se obtuvo la dosis. Es decir, se logró luego del procedimiento del traspaso de los tubos de ensayo ya propagados por el hongo *T. asperellum* a los matraces Erlenmeyer, los cuales contenían 50 ml de caldo nutritivo estéril. Se los dejó en la incubadora durante 24 horas a 30°C. Una vez transcurrido este tiempo, se realizó el conteo de esporas equivalentes a una concentración final de $9,0 \times 10^8$ esporas ml^{-1} , por recuento en cámara de Neubauer (Llenque et al., 2015). Se utilizó esta misma en la siembra de los tres tratamientos.



Figura 19. Tratamientos con hongo *T. asperellum* con la misma dosis.

Fuente: La Autora

4.12 Cámara de Neubauer

Estas cámaras de recuento se usan para determinar el número de partículas por unidad de volumen de un líquido. Las partículas pueden ser leucocitos, eritrocitos, trombocitos, bacterias, esporas, polen etc. Esto es posible hacer el conteo por medio de un microscopio para lograr visualizar las partículas (Nugra, 2018).

Concentración (cel ml⁻¹) = N° de células x 10000/N° de cuadros contabilizados.

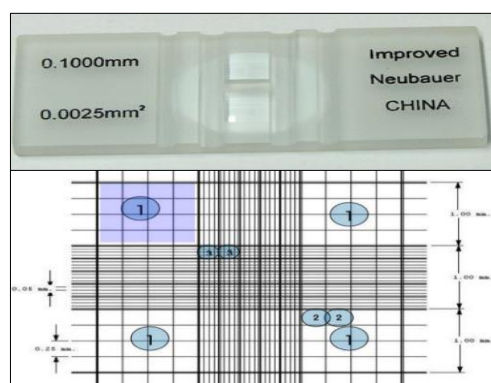


Figura 20. Cámara de Neubauer y su estructura.

Fuente: La Autora; Yépez (2019).

4.12.1 Conteo de esporas de *T. asperellum*

Es importante mencionar que esto se lo realizó durante todo el transcurso del ensayo, desde los días 1 al 21, es decir, se lo hizo cada 48 horas. El conteo de esporas nos sirvió para calcular la biomasa contenida en 1 ml en cada medio de cultivo, es decir, se realizaron hasta tres diluciones en tubos de ensayo. De esta manera; se colocó tres tubos de ensayo, con 9 ml de agua destilada y se etiquetó (10^1 , 10^2 , 10^3) cada uno.

La primera dilución de (10^1), se la realizó de la siguiente manera; se colocó 1 ml de esporas cosechadas y se procedió a agitar para obtener una dilución homogénea, después, con la ayuda de una macropipeta de 100 μ l, se tomó 1 ml de la primera dilución y se colocó en el segundo tubo obteniendo una dilución de 10^2 , nuevamente se tapó y se agitó, finalmente se tomó 1 ml de la dilución 10^2 y se colocó en el siguiente tubo obteniendo una dilución (10^3), si lo requiere se tendrá que hacer más diluciones.

La tercera dilución (10^3), se utilizó para la realización del conteo de esporas en la cámara de Neubauer, en esta se procedió a colocar 20 μ l (0,2 ml) de la dilución y se cubrió con una

porta objetos, evitando la formación de burbujas. Se colocó la cámara en un microscopio y se observó desde los lentes objetivos 4x, 10x y 40x; con el último lente objetivo se logró visualizar mejor las esporas. El conteo se lo hizo en los 25 cuadros que contiene la cámara y en los dos hemisferios norte y sur para así obtener un total de esporas en 1 ml. Se tomó una muestra por cada tratamiento y se realizó en conteo en la cámara.

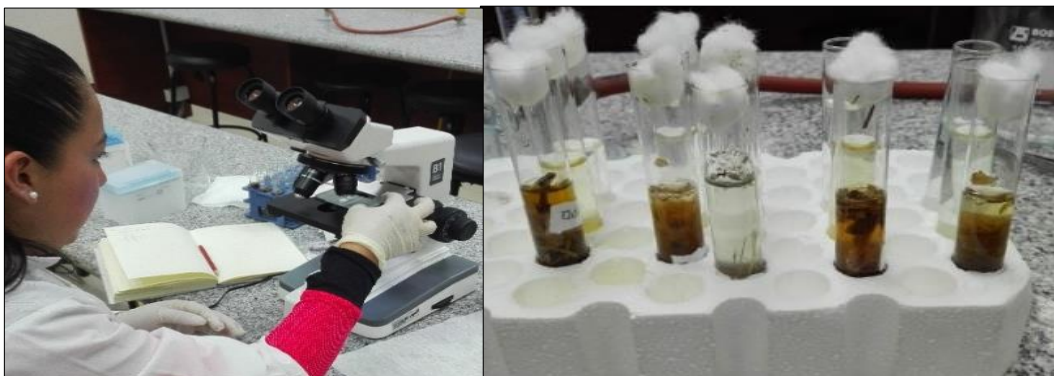


Figura 21. Diluciones para el conteo en cámara de Neubauer.

Fuente: La Autora

4.13 Esterilización de los sustratos

Los sustratos se pusieron en fundas de tela, se esterilizaron en una autoclave (modelo NB-1080); según López y Bárbaro (como se citó en Giampaoli et al., 2014) revela que la temperatura de la autoclave debe estar a 121°C por 30 minutos, a una presión de 1,2 atm, para su posterior mezcla. Realizada la esterilización de los sustratos se los extrajo de la autoclave y se los depositó en un lugar limpio y cerrado (cámara laminar) y se esperó que su temperatura baje.

4.13.1 Siembra del inóculo de *T. asperellum* en los diferentes sustratos

La cantidad fue la misma para cada sustrato ya que no se consideró el volumen de estos. Se pesó 100 g de cada sustrato (tamo de Frejol, cascarilla de café y bagazo de caña), y se procedió a realizar la inoculación del caldo nutritivo colonizado por el micelio del *T. asperellum* (Llenque et al., 2015). Una vez preparado el sustrato, se revolvió uniformemente el caldo previamente cultivado junto con el sustrato, luego se colocó en tubos de PVC, previamente esterilizados con alcohol. Además, la humedad se ajustó a un 70% (Sánchez, 2009). Los tubos de PVC (4 pulgadas) fueron previamente cortados, cada tubo se cortó 20 cm de largo con un diámetro de 11 cm, además, en cada tubo se hicieron orificios con una

distancia de 5 cm. Se cerraron los tubos con papel aluminio, de esta manera, se tiene una mayor protección contra los agentes contaminantes. A fin de que las muestras se incubaran a una temperatura promedio de 25 a 35°C en un invernadero hidropónico por 15 días hasta que el hongo se adapte y a los 21 días se realizará la cosecha (Nugra, 2018).



Figura 22. Siembra del inóculo de *T. asperellum*.

Fuente: La Autora

4.13.2 Hidratación

Se la realizó por medio de aspersión y dependió del tipo de sustrato; el bagazo de caña y tamo de frejol se dio cada 48 horas, mientras que la cascarilla cada 24 horas ya que esta no retenía mucho la humedad y por ende tendía a secar muy rápido (Sánchez, 2009).

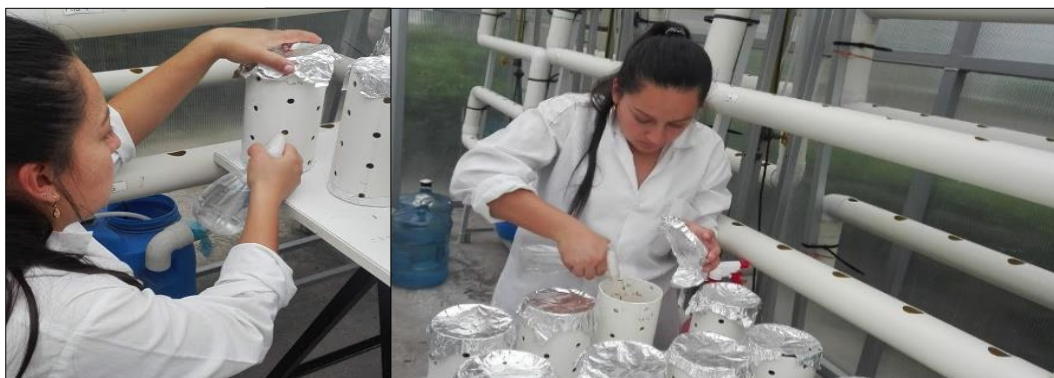


Figura 23. Hidratación por aspersión.

Fuente: La Autora

4.13.3 Cosecha de los sustratos enriquecidos con *T. asperellum*

La cosecha se realizó a los 21 días de los tres sustratos (Tamo de frejol, cascarilla de café y bagazo de caña) enriquecidos con el *T. asperellum*. Se recolectó en fundas de papel

previamente etiquetadas. Con estas muestras finales se realizará diferentes análisis como determinación de Proteína, Fibra Cruda, Materia seca, Humedad y Lignina (Llenque et al., 2015).



Figura 24. Cosecha.

Fuente: La Autora (2019).

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Caracterización del material lignocelulósico

La biomasa lignocelulósica de Tamo de frejol (TF), Cascarilla de café (CC) y Bagazo de Caña (BC) se caracterizó con el fin de definir las condiciones favorables para la realizar la siembra del hongo *T. asperellum*. En la Tabla 6 se puede observar los valores obtenidos en la caracterización físico-química: pH, %Cenizas, %Humedad, Energía, etc., en su fase inicial.

Tabla 6

Composición físico- química de la materia prima

Parámetro	Unidades	Tamo de Frejol (TF)	Cascarilla de Café (CC)	Bagazo de Caña (BC)
<i>Ph</i>	Unidades de pH	6,80	5,09	6,50
<i>Energía</i>	cal.g ⁻¹	3920,72	4340,57	4034,37
<i>Cenizas</i>	%	0,03	0,38	2,93
<i>Humedad</i>	%	8,83	9,49	9,62
<i>Materia seca</i>	%	91,17	90,51	90,38
<i>Lignina</i>	%	34,51	51,36	34,05
<i>Fibra cruda</i>	%	64,93	95,96	61,72
<i>Proteína</i>	%	4,35	1,95	0,92

Fuente: La Autora

En esta investigación presentaron las siguientes características:

pH

El pH de la cascarilla de café fue de 5,09 con relación a este resultado varios investigadores mencionan lo siguiente: (Arias y Meneses, 2016) obtuvo un valor de 5,30; incluso (Ortíz et al., 2003) da a conocer el siguiente valor de 6,46; quiere decir que es similar al obtenido. Con este valor se puede decir que afecta el desarrollo de *T. asperellum* ya que él se desarrolla en un pH de 6,00-6,50.

En el caso del bagazo de caña fue de 6,50; desde el punto de vista de (García et al., 2011) tiene un dato de 5,80; por otro lado, (Hernández y López, 2015) presenta los siguientes rangos 5,20-6,30; lo que quiere decir que está dentro de lo estimado, según esto, es bueno para el crecimiento del hongo filamentoso ya que este presenta un pH favorable para su desarrollo al igual que tamo de frejol con un valor de 6,80.

Energía

En la cascarilla de café fue de 4340,57 cal.g⁻¹, el reporte de (Vásquez, 2015) presenta un valor de 4180,00 cal.g⁻¹, esto está dentro del intervalo. El bagazo de caña se obtuvo un valor de poder calorífico de 4034,37 cal.g⁻¹, según los autores (Agüero et al., 2004) señalan un dato de 4600,00 cal.g⁻¹; pero (Antolín y Oliva, 2003) revela una cantidad de 3986,00 cal.g⁻¹; es decir que nuestro valor obtenido está igual a lo establecido por otras investigaciones. Además, en el tamo de frejol presentó 3920,72 cal.g⁻¹.

Cenizas

La cascarilla de café tiene un contenido de 0,38%, el reporte de (Manals et al., 2018) es de 1,20%; pero, (Vásquez, 2015) menciona valores mínimos de cenizas están entre 0,50 a 0,60%; también los autores (Arteaga y Casinio, 2018) indican un valor de 0,36%, esto quiere decir que el valor obtenido es similar. En el bagazo de caña se obtuvo 2,93%, pero (Llanes, 2012) indica 1,73%; quiere decir, que es alto. En el tamo de frejol presento un valor de 0,03%, de este modo, representan el contenido de minerales, quiere decir que suponen menos del 5,00% de materia seca en este residuo.

Humedad

En cuanto a este parámetro la cascarilla de café fue de 9,49%, pero (García, 2016) indica 11,85%; es más, (Arias y Meneses, 2016) muestra 8,60% de la cascarilla en base seca, también reporta Gómez (como se citó en Manals et al., 2018); de 10, 10% esto quiere decir que el valor obtenido es casi similar. El valor mínimo reportado de humedad esta entre 10,00 y el 12,00% después de ser secada al sol (Arias y Meneses, 2016). En vista de estos resultados, se tiene que adaptar a la humedad requerida por el hongo.

En lo que respecta a la humedad en el tamo de frejol se tuvo 8,83%, según (Llanes, 2012) reporta 7,41% en su base seca. En el bagazo de caña hubo 9,62%; sin embargo (Manals et

al., 2018) menciona una humedad de 15,00%, además, (Pineda et al., 2016) reporta un valor de 6,00%. En esta comparación es alto, pero no es un problema, ya que, según la bibliografía, el hongo se desarrolla en 70,00% de humedad sin este requerimiento, tendrá dificultad en su desarrollo. Para lograr obtener esta misma se adicionará agua.

Materia seca

El tamo de frejol tiene un contenido de materia seca de 91,17%; lo reportado por (Macas, 2005) es de 43,35%; esto quiere decir, que los resultados obtenidos son altos. En la cascarilla de café presento un valor de 90,51% en lo que respecta a materia seca, pero (Vásquez, 2015) muestra 92,80%; también (Ortíz et al., 2003) presenta un valor de 91,44%; esto quiere decir que es similar al valor obtenido. En el bagazo de caña presentó un porcentaje de 90,38%, el reporte por (Llanes, 2012); fue de 95,58%; esto quiere decir, que los valores obtenidos se encuentran casi similares.

Fibra cruda

Su composición es diferente dependiendo del origen de la planta (Ceballos y Montoya, 2013), es por esta razón que varía en esta investigación.

El tamo de frejol presenta un valor de 64,93% en su materia prima; pero el reporte de (Macas, 2005) es de 36,19% esto quiero decir que sigue siendo valores altos a los obtenidos. En la cascarilla de café tiene 95,96%; el reporte de (García, 2016), es de 69,00% en base seca, pero el reporte de (Ortíz et al., 2003) es de 69,36; según lo obtenido es alto. En el caso del bagazo de caña de azúcar, se obtuvo un resultado de 61,72%, el reporte por (Llanes, 2012) está dentro de un intervalo de 55,00- 60,00%, esto quiere decir, que el valor obtenido es similar al que se obtuvo en la caracterización del bagazo de caña.

Lignina

Es importante conocer que el contenido en masa de lignina depende del origen y de la especie de la especie vegetal que se esté tratando (El Mansouri, 2007). Las coníferas presentan comúnmente un contenido más elevado de esta que las frondosas.

El problema de una definición precisa para la lignina se asocia con la naturaleza de sus múltiples unidades estructurales, las cuales no suelen repetirse de forma regular, dado que

la composición y estructura de la lignina varían dependiendo de su origen y el método de extracción o químicos (Chávez y Domine, 2013). El contenido en maderas varía entre 19 y 35% (El Mansouri, 2007). Es por ello, que diferentes investigadores presentan varios valores de contenido de lignina, ya que el método empleado para su extracción no es el mismo o el origen del lugar extraído del material lignocelulósico no es igual. Los valores obtenidos en este trabajo de investigación son los siguientes:

En el tamo de frejol es de 34,51%; el reporte de (Villacís, 2019) tiene un porcentaje de 9,35%. Pero (Gonzales et al., 2011) menciona un 9,00%; llegando a hacer bajos. En el caso de la cascarilla de café tiene 51,36%; sin embargo (Arias y Meneses, 2016) indican un 15,93%; es más (Barón, 2014) expresa un 41,86%. En el bagazo de caña presenta un 34,05%; según (Solorza et al., 2013); es de 22,90-25,00% (Antolin y Oliva, 2003) mencionan rango de 10,00-30,00%, nuestros contenidos de lignina presentes en la materia prima son altos en comparación a estos autores.

Proteína

El contenido de proteína depende del origen de la planta y de la especie, incluso en algunas investigaciones no concuerdan con los valores obtenidos en estos residuos lignocelulósicos (Ceballos y Montoya, 2013).

El tamo de frejol tiene 4,35%, pero según (Villacís, 2019) menciona 5,10%; (Macas, 2005) es de 9,45%; esto quiere decir que es muy bajo el contenido de proteína en nuestra muestra original. En la materia prima de la cascarilla de café obtenida es de 1,95%; el reporte de (Salazar, García y Olaya, 1984); es de 1,50% para la especie de Café arábica; mientras que para la especie de café arbusto presenta un contenido de proteína de 2,20%; esto indica que el valor obtenido es similar. El bagazo de caña se obtuvo 0,92%; sin embargo (Gélvez, 2019), presenta 0,75%; pero (Juárez et al., 2009); menciona un contenido bajo de proteína.

5.2 Resultados de análisis Bromatológico

En la tabla 7 se muestra los análisis realizados al tamo de frejol (TF), cascarilla de café (CC) y bagazo de caña (BC) enriquecidos proteicamente con *T. asperellum* bajo una misma dosis (9×10^{-8} esporas ml^{-1}), en el laboratorio de Bromatología de la escuela ECCA, de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra.

Tabla 7

Análisis bromatológico de los sustratos (TF, CC y BC) con el hongo T. asperellum

PARÁMETROS	Tamo de frejol (TF) (%)	Cascarilla de café (CC) (%)	Bagazo de caña (BC) (%)
<i>Materia Seca</i>	40,08	64,41	21,00
<i>Fibra cruda</i>	62,27	82,09	51,75
<i>Lignina</i>	28,64	38,98	29,71
<i>Proteína Cruda</i>	5,13	2,50	1,69

Fuente: La Autora

De los resultados obtenidos de los análisis bromatológicos del tamo de frejol, cascarilla de café y bagazo de caña enriquecidos proteicamente, según Varios autores han utilizado la técnica de fermentación en estado sólido (FES), esto resuelve la falta de uso de los desechos agroindustriales, estos generalmente carecen de proteína y que a través de esta fermentación permite el desarrollo de una biomasa microbiana. Los microorganismos se desarrollan en un sustrato fermentado, estos mismos contienen más del 50,00% de su materia seca en forma de proteína. Varias investigaciones aseguran que tienen un buen efecto positivo en el enriquecimiento proteico de materiales lignocelulósicos en donde se menciona a algunos:

En 1995, produjeron un alimento para sustituir el tradicional, los mismos no contaban con efectos negativos en la producción y salud animal, también le sirvió como suplemento en la dieta de rumiantes, ósea, fueron alimentados con estos forrajes. Además, utilizaron como inóculo *Candida utilis*, propagada en una planta de “biomasa proteica”. Respecto a la opinión técnica indica que esta variante es viable, alcanzando una proteína efectiva, el promedio oscila entre 7,00 y 8,00%, aunque se mantiene valores inferiores a 15,00% respecto a la fibra bruta. (Águila et al., 2014)

Los investigadores del ICIDCA (1990), propusieron dos variantes tecnológicas para el enriquecimiento proteico de residuos de la cosecha de caña, en donde utilizaron como inóculo cepas de hongos filamentosos, pertenecientes al género *Aspergillus*. El producto obtenido por las dos variantes de fermentación: RECASEN-1 y RECASEN-2, con una

adición de miel al sustrato original y sin ella, contiene 6,00 y 9,00% de proteína, respectivamente.

Pedraza (como se citó en Valiño et al., 2004), mencionan a los resultados obtenidos en el enriquecimiento del bagazo de caña de azúcar hasta alcanzar entre 6,00 y 11,00% de proteína, mediante la utilización de diferentes fuentes de inóculo.

Ruiz et al (como se citó en Castillo y Ruiz, 2013), afirma que la fermentación de bagazo de manzana tuvo un incremento de la proteína bruta (pb) de 36,02% en 24 horas de fermentación y 35,57% luego de 72 horas de fermentación. En 24 horas de fermentación, se logró 21,15% de proteína verdadera (pv) y después de 72 horas de fermentación se obtuvo 18,12%. El pH tuvo un comportamiento de 3,85 en 24 horas y de 3,81 después de 72 horas. Se concluyó que el descenso del pH durante el proceso de FES (Fermentación en estado sólido). del bagazo de manzana afecta negativamente a la población de levaduras, lo cual influyó de manera negativa en los indicadores de pb y pv.

El reporte Ruqayyah et al. (2014), inoculándole el basidiomiceto *Panus tigrinus*, obteniendo un incremento proteico del 55,16%. Algunas investigaciones cultivaron bacterias y levaduras para enriquecer residuos agroindustriales, el reporte de Hsu et al. (2013), emplearon pastos forrajeros y *Entrophospora* y *Bacillus*, en donde obtuvo un incremento de 13,90%. Por lado, Correia et al. (2007), emplearon la levadura *Saccharomyces cerevisiae* sobre residuos de piña obteniendo un incremento proteico del 22,00%.

Como ejemplos de enriquecimiento con hongos filamentosos reportados por Álvarez et al (2010) que cultivaron sobre residuos de banano con *Aspergillus niger* en donde aumento la proteína en un 9,56%. Además, Bustamante et al. (2008), reporta el aumento de proteína utilizando bagazo de naranja como sustrato para el crecimiento del *Aspergillus niger*. La concentración de Nitrógeno orgánico inicial de 0,71% aumentó a los 7 días a 1,18%, a los 14 días a 2,05%, a los 21 días a 2,49%, alcanzando a los 28 días un valor de 2,89%. Con base en estos resultados, se observó que la proteína aumenta desde 4,45% hasta 18,06%, existiendo un incremento del 30,50% en 28 días de crecimiento del *Aspergillus niger* sobre el bagazo de naranja.

Según estas investigaciones se logra verificar que el aumento de proteína en material lignocelulósica es completamente viable y se corrobora que es efectivo. Lo que sustenta a la presente investigación.

Además, Valiño et al. (2004), menciona que demostró que el uso de la cepa *T. viride* M5-2 como inóculo en bagazo fresco e hidrolizado permite obtener productos con una mejor calidad nutritiva como alimento para animales monogástricos, con aumento de la digestibilidad en 10,00 % y disminución de la fibra entre 5,00 y 10,00 %. De igual manera introdujeron una agitación en el biorreactor de FES (Fermentación en estado sólido), ya que este permitió obtener un producto con aproximadamente 11,00 % de contenido proteico, con disminución de 6,00 % en la celulosa y 11,00 % de hemicelulosa, debido a la actividad celobiohidrolasa de 27 UI/g de MS, además del incremento de la digestibilidad del bagazo en 20,00 %. De esta manera, se demuestra que es una buena opción para la utilización de residuos de la industria azucarera, destinados a la alimentación animal. También encontraron una variación de lignina con valores entre 2,00 y 3,00 %.

Valiño et al. (2003), afirma que según los resultados obtenidos en las interacciones que produjeron entre la carga microbiana del bagazo de caña auto fermentado y el efecto de la inoculación de la cepa *Trichoderma viride* 137, durante 21 días de auto fermentado. Se comprobó la disminución de cuatro unidades porcentuales en FAD, FND, lignina y celulosa, respecto al bagazo almacenado sin la adición de nutrientes, excepto en la lignina en la que se mantuvieron constante. Además, observaron un ligero aumento en la proteína bruta en las tres variantes (sin adición de nutrientes, con nutrientes y estéril), con respecto al tiempo de fermentación y en la actividad enzimática celulítica.

Pham et al. (como se citó en Valiño et al., 2003) informa una reducción del 30,00 % del contenido de lignina del bagazo de caña con la cepa *Lentinus edodes* BIOT 3036^a, lo que mejoró la digestibilidad del producto final. Además, Chahal, Gupta y Madamwar (como se citó en Valiño et al., 2003), mencionan que hallaron una reducción del 85,00 % de lignina con la cepa *T. reesei* MCG80, con un previo tratamiento, por otro lado, realizaron una mezcla de cultivos de *Aspergillus*, en donde, mejoraron la digestibilidad después de 8 días de fermentación, utilizando también un pretratamiento del bagazo con hidróxido de calcio (2,00 %).

Valiño et al., (2004) describe que aplicó una cepa microbiana en el bagazo de caña de azúcar como alimento para animales, mediante una fermentación en estado sólido con *T. harzianum*, en donde, obtuvo un resultado de una disminución de 0,84% de lignina y 3,00% en fibra cruda en el bagazo de caña.

5.3 Análisis estadísticos de cada uno de los parámetros medidos antes y después del uso de *T. asperellum* con tamo de frejol, bagazo de caña y cascarilla de café.

Hipótesis para fibra cruda y lignina

Para lignina y fibra cruda se realizó una prueba pareada en R-Studio de cada uno de los tratamientos y por separado. En donde, el promedio de antes “materia prima” es mayor al promedio después de “incorporar hongo *T. asperellum* en la materia prima”.

La Hipótesis es la siguiente:

- $H_a: \mu_1 > \mu_2$

Luego de aplicar la prueba pareada y obtener el valor de P en cada materia prima se plantearán las siguientes hipótesis.

p-value < 0.05 H_a se acepta

p-value > 0.05 H_a se rechaza

Al aplicar la prueba pareada se obtiene los siguientes datos (ver los Ítems 5.3.1 y 5.3.2), en donde, se acepta la hipótesis alternativa y nos indica que el promedio antes “materia prima sin tratar” es mayor que el promedio después de “incorporar el hongo”, por lo tanto, se verifica lo antes mencionado, es decir, que, al incorporar el hongo, este produjo una disminución significativa en la materia prima (media antes); en los parámetros de lignina y fibra cruda.

Hipótesis para proteína

Para la variable proteína se realizó una prueba pareada en R-Studio de cada uno de los tratamientos y por separado. En donde, el promedio antes “materia prima” es menor al promedio después de “incorporar hongo *T. asperellum* en la materia prima”

La Hipótesis es la siguiente:

- $H_a: \mu_1 < \mu_2$

Luego de aplicar la prueba pareada y obtener el valor de P en cada materia prima se plantearán las siguientes hipótesis.

p-value < 0.05 Ha se acepta

p-value > 0.05 Ha se rechaza

Al aplicar la prueba pareada se obtiene los siguientes datos (ver Ítem 5.3.3), se acepta la hipótesis alternativa, en donde indica que el promedio antes (materia prima sin tratar) es menor que al promedio después (incorporación del hongo), por lo tanto, se verifica que la cantidad de proteína es menor en la materia prima sin tratar, es decir, que al momento de incorporar el hongo (*T. asperellum*) en esta, este produce un incremento de proteína en los tres tratamientos.

5.3.1 Resultados del parámetro Fibra Cruda antes y después de la utilización de *T. asperellum* con tamo de frejol, bagazo de caña y cascarilla de café.

Los datos obtenidos en la tabla 8, representan el valor de P del promedio después del parámetro fibra cruda. Se realizó una Prueba pareada (antes y después) para cada uno de los tratamientos por separado. En donde, la cascarilla de café presentó una diferencia altamente significativa ($p < 0,0001$), al igual que en el bagazo de caña con un valor P de 0,002; es decir, mediante estas dos comparaciones de antes y después, se logró visualizar que existió una disminución de fibra cruda significativa.

En el tamo de frejol presentó diferencias significativas ($p > 0,05$), con un valor de P de 0,04. A través de estos resultados se alcanzó observar que mediante el uso de *T. asperellum* se puede disminuir la fibra cruda.

Tabla 8.

Análisis de la prueba pareada del porcentaje de los promedios de la concentración de fibra cruda con el uso de T. asperellum

Materia Prima	Promedio (%)		Prueba pareada (Valor P)	Significancia
	Antes	Después		
TF	64,93	62,27	0,04	*
CC	95,96	82,09	8,47x10 ⁻⁵	***
BC	61,72	51,75	0,002	**

• TF: Tamo de frejol; CC: Cascarilla de café; BC: Bagazo de caña; MP: Materia prima

Fuente: La Autora

5.3.2 Resultados del parámetro Lignina antes y después de la utilización de *T. asperellum* con tamo de frejol, bagazo de caña y cascarilla de café.

En la tabla 9, se detallan los datos obtenidos en la prueba pareada (antes y después) en R-Studio, esto se lo realizó para cada uno de los tratamientos y por separado. En esta misma se presenta el valor de P del promedio después del parámetro de lignina.

En donde, la cascarilla de café presentó una diferencia altamente significativa ($p < 0,05$). En el caso del tamo de frejol y del bagazo de caña presentan diferencias significativas con valores de P de 0,04 y 0,02. Según los resultados de esta prueba de antes y después se logró visualizar que hubo una disminución de lignina significativa.

Tabla 9.

Análisis de la prueba pareada del porcentaje de los promedios de la concentración de lignina con el uso de T. asperellum

Materia Prima	Promedio (%)		Prueba Pareada (Valor P)	Significancia
	Antes	Después		
TF	34,51	28,64	0,04	*
CC	51,36	38,98	0,002	**
BC	34,05	29,72	0,02	*

* TF: Tamo de frejol; CC: Cascarilla de café; BC: Bagazo de caña

Fuente: La Autora

5.3.3 Resultados del parámetro Proteína antes y después de la utilización de *T. asperellum* con tamo de frejol, bagazo de caña y cascarilla de café.

Los datos obtenidos en la tabla 10, representan el valor de P del promedio de después del parámetro proteína. Se realizó una prueba pareada (antes y después) para cada uno de los tratamientos por separado.

De acuerdo con esta prueba pareada y los resultados obtenidos se establece los niveles de significancia que presentan cada uno de estos tratamientos. Para el bagazo de caña y el tamo de frejol mediante esta prueba presentan diferencias altamente significativas ($p < 0,05$); es decir, indica que realmente el uso de *T. asperellum* provoca un incremento de proteína microbiana al comparar el antes y el después, en cambio para la cascarilla de café tuvo un valor de P de 0,02 presentando una diferencia significativa.

Tabla 10.

Análisis de la prueba pareada del porcentaje de los promedios de la concentración de proteína con el uso de T. asperellum

Materia Prima	Promedio (%)		Prueba Pareada (Valor P)	Significancia
	Antes	Después		
TF	4,35	5,13	0,007	**
CC	1,95	2,50	0,02	*
BC	0,92	1,69	0,0007	***

* TF: Tamo de frejol; CC: Cascarilla de café; BC: Bagazo de caña

Fuente: La Autora

5.4 Análisis del porcentaje de fibra cruda en los tres tratamientos con *T. asperellum*

Para la variable fibra cruda se determinó la existencia de normalidad ($p\text{-value} = 0,23$) y la homogeneidad de varianzas ($p\text{-value} = 0,53$). Los resultados alcanzados con el análisis de varianza (tabla 11) demuestran que el porcentaje de fibra cruda mediante el uso de *T. asperellum* en un tiempo de 21 días presentó una diferencia altamente significativa ($p > 0,05$), con un valor de P de $1,44 \times 10^{-8}$. Además, el coeficiente de variación fue de 3,82% lo que determina que existe una mínima dispersión de datos con respecto al análisis de fibra cruda (%) con un promedio de 65,37%.

Tabla 11

Análisis de varianza de la variable fibra cruda (%) de los tres tratamientos

FV	GL	SC	CM	F	Pr (>F)	Significancia
Total	11	1934				
Tratamientos	2	1899	949,40	244,30	1,44x10 ⁻⁸	***
Error exp.	9	34,94	3,90			

CV: 3,02%; \bar{X} : 65,37%

*Presenta diferencias significativas, ** Diferencias altamente significativas, *** Diferencias altamente significativas; CV: Coeficiente de variación; \bar{X} : promedio media.

Fuente: La Autora

Según la figura 25, la prueba Tukey al 5% para la variable fibra cruda entre los tres rangos de significancia (tamo de frejol, cascarilla de café y bagazo de caña). En donde, la mejor en porcentaje de fibra cruda fue la cascarilla de café, el cual tiene el primer rango de significancia con un valor de 82,09%, mientras que el peor tratamiento fue el bagazo de caña por ser parte de este, comparte el tercer rango de significancia con 51,75%.

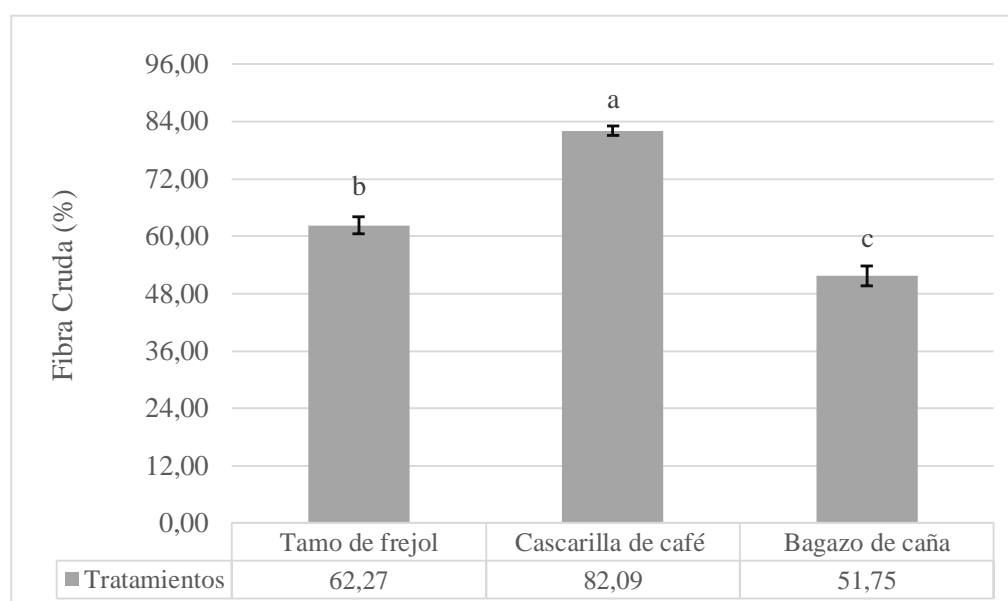


Figura 25. Prueba Tukey al 5% para los tres tratamientos de la variable Fibra cruda

Fuente: La Autora

Según los autores, Valdiño, (2004) y Julián, (2008) dan a conocer una disminución de hasta 3,00% y 5,00%. Recapitulando lo mencionado anteriormente y relacionado con los resultados obtenidos por el presente estudio se logra comprobar el uso de *T. asperellum* es efectivo en la disminución de fibra cruda según los análisis estadísticos. Es necesario recalcar que en varias investigaciones usaron otras especies de microorganismos de *Trichoderma sp.*, y este pudo ser un factor negativo para este experimento ya que no se encuentra suficientes datos en cuanto a fibra cruda.

Es necesario aclarar que se tuvo un buen manejo de los factores ambientales como: humedad, temperatura ya que de esta manera no alteró el desarrollo del hongo. Según Pedraza et al., (como se citó en Julián, 2008) usaron algunos aditivos y derivados de la caña de azúcar, para facilitar su degradación y lograr disminuir de forma significativa.

5.5 Análisis del porcentaje de lignina en los tres tratamientos con *T. asperellum*

Para la variable lignina se determinó la existencia de normalidad (p-value = 0,53) y la homogeneidad de varianzas (p-value = 0,60). Los resultados alcanzados con el análisis de varianza (tabla 12) demuestran el porcentaje de lignina mediante el uso de *T. asperellum* durante 21 días, presentó una diferencia altamente significativa ($p > 0,05$); con un valor de P de 0,004. Además, el coeficiente de variación fue de 10,75% lo que determina que los datos son homogéneos y poco dispersos con respecto al análisis de lignina (%) con un promedio de 32,45%.

Tabla 12

Análisis de varianza de la variable lignina (%) de los tres tratamientos

FV	GL	SC	CM	F	Pr (>F)	Significancia
<i>Total</i>	11	368,10				
<i>Tratamientos</i>	2	258,60	129,27	10,62	0,004	**
<i>Error exp.</i>	9	109,50	12,17			
CV: 10,75%; \bar{X} : 32,45%						

*Presenta diferencias significativas, ** Diferencias altamente significativas, *** Diferencias altamente CV:

Coeficiente de variación; \bar{X} : promedio. Fuente: La Autora

En la figura 26, se muestra la prueba Tukey al 5% en los tres tratamientos: Tamo de frejol, Cascarilla de Café y Bagazo de caña. Para la variable lignina según esta prueba, el tratamiento de la cascarilla de café fue el mejor rango que presentó, con un valor de 38,98% totalmente diferente de los demás, mientras que, los tratamientos Tamo de frejol y bagazo de caña compartieron el último rango con valores de 28,64% y 29,71% respectivamente, demostrando que son similares entre sí.

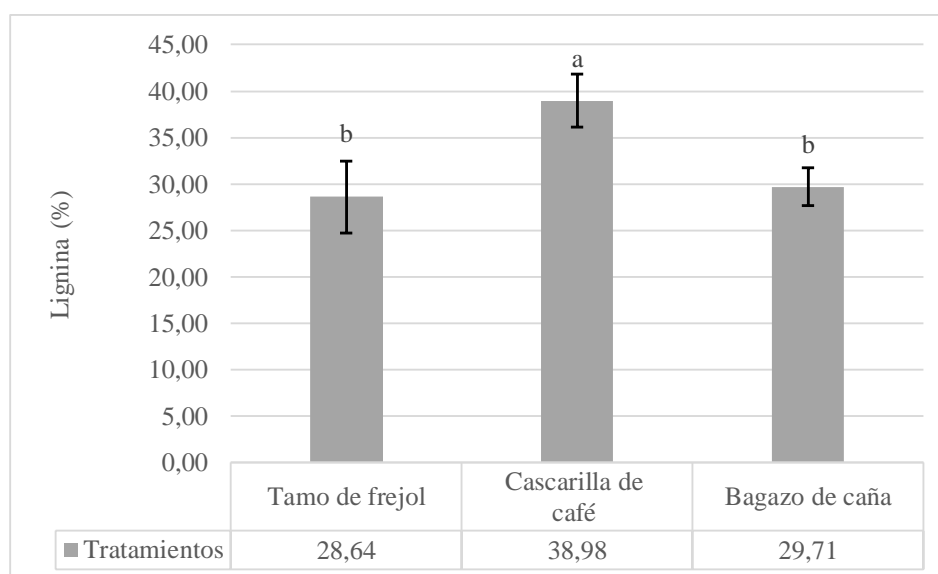


Figura 26. Prueba Tukey al 5% para los tres tratamientos de la variable lignina
Fuente: La Autora.

En la figura 26, se identifica que no existió una disminución de lignina en el Tamo de frejol y bagazo de caña, pero en la cascarilla de café ocurrió lo contrario obteniendo una disminución de significativa con el uso de *T. asperellum* aplicando una misma dosis. Sin embargo, en la ejecución del análisis estadístico, tuvo diferencias altamente significativas, siendo la cascarilla la que produjo mayor disminución de lignina.

En la investigación realizada por Valdés, (2008), y Valiño, (2004), afirman que al utilizar la especie *Trichoderma sp.* en proceso de fermentación en estado sólido con bagazo de caña, logran la disminución de lignina de un 2,00%. Según los resultados obtenidos en esta investigación se obtuvo un parecido similar a lo reportado por los dos autores.

Es importante aclarar que según Steffen y Olvera, (como se citó en Huanaco, 2008), menciona que para tener una degradación significativa de lignina se debe de contar con una

buena aireación, presencia de oxígeno y tener una dosis adecuada de glucosa, ya que este es un polímero y es difícil de romper, y se ha descubierto que los microorganismos que tienen sistemas ligninolíticos demuestran la capacidad de degradar la lignina. Según los resultados arrojados por la cascarilla de café son similares debido a su tamaño de partícula de 5cm, permitiéndole una buena aireación.

Además, se menciona otro factor que puede influir en la disminución de lignina, según los autores Huanaco (2008) y Lin (1980), revelan que la lignina presenta un color café, esto se debe a los grupos cromóforos unidos a la molécula de la lignina para que se reduzca este color es necesario la presencia de oxígeno y peróxido de hidrógeno, el proceso oxidativo causa ruptura en los enlaces insaturados carbono-carbono de las cadenas propanoides de la lignina destruyendo algunos grupos cromóforos. Se concluye que, se debe contar con buena aireación, presencia de oxígeno y con tener una dosis adecuada de glucosa se obtendrá una exitosa degradación de la lignina al cabo de 7 días, esto ocurre según varios investigadores cuando las enzimas son expresadas durante la fase secundaria de crecimiento (idiofase) cuando la limitación de carbono, nitrógeno y sulfuro. Estos hongos tienen la inhabilidad de utilizar el carbono inorgánico, además, la glucosa es uno de los compuestos más simples, estos hongos degradan la lignina a dióxido de carbono pero en presencia de otra fuente de carbono como la celulosa, celobiosa o glucosa (Arias y Piñeros, 2008). Es por ello que en el caso del bagazo de caña y tamo de frejol no ocasionó una disminución significativa.

5.6 Análisis del porcentaje de proteína en los tres tratamientos con *T. asperellum*

Para la variable proteína se determinó la existencia de normalidad (p -value = 0,98) y la homogeneidad de varianzas (p -value = 0,36). Con el análisis de varianza (tabla 13) se logró determinar una diferencia altamente significativa ($p > 0,05$); para la variable proteína con un valor P de $4,73 \times 10^{-8}$ esto se dio a través de *T. asperellum* durante un período de 21 días. Además, el coeficiente de variación fue de 8,49% lo que determina que existe una dispersión considerable de los datos con respecto al análisis de Proteína (%) con un promedio de 3,10%.

Tabla 13

Análisis de varianza de proteína cruda (%) de los tres tratamientos

FV	GL	SC	CM	F value	Pr (>F)	Significancia
Total	11	26,51				
Tratamientos	2	25,88	12,94	186,50	4,73x10 ⁻⁸	***
Error exp.	9	0,62	0,07			

CV: 8,49 %; \bar{X} : 3,10%

*Presenta diferencias significativas, ** Diferencias altamente significativas, *** Diferencias altamente significativas. CV: Coeficiente de variación; \bar{X} : promedio.

Fuente: La Autora.

En la figura 27, se presenta la prueba Tukey al 5% para la variable proteína entre los tres tratamientos; Tamo de frejol, Cascarilla de Café y Bagazo de caña. El mejor porcentaje de proteína cruda fue el tratamiento del Tamo de frejol con un valor de 5,13% totalmente diferente del resto, mientras que el tratamiento de bagazo de caña fue el peor rango con un valor de 1,69%.

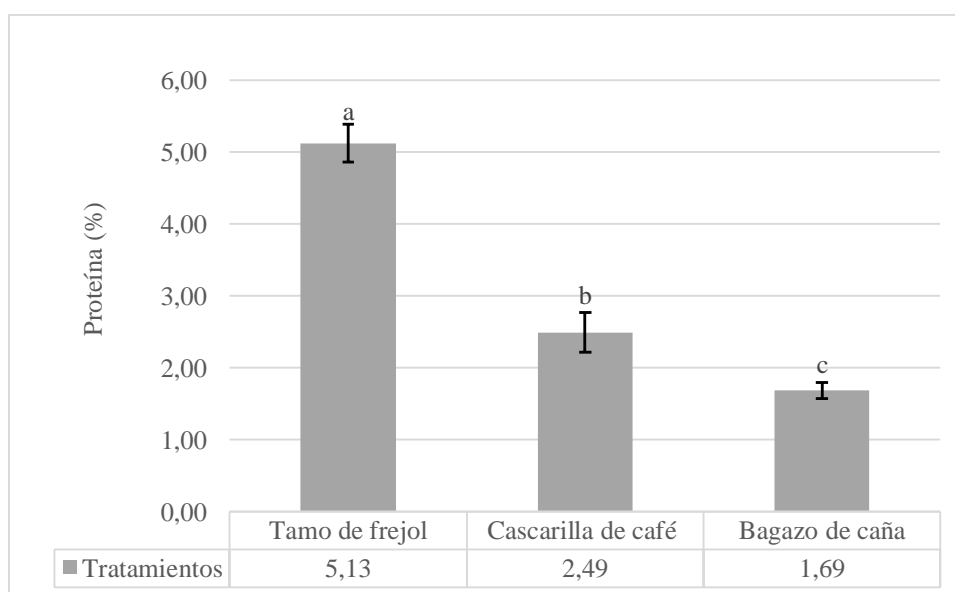


Figura 27. Prueba Tukey al 5% para los tres tratamientos de la variable proteína.

Fuente: La Autora

Debido a los resultados antes mencionados se concluye que fue el bagazo de caña que tuvo un aumento de proteína altamente significativa con un valor de 0,92% a 1,69% aumentando un 84%, pero al momento de realizar una comparación entre los tres tratamientos en la prueba Tukey nos muestra que el tamo de frejol tiene mayor contenido de proteína con un valor de 5,13%, después de ser enriquecidos con el hongo *T. asperellum* ya que este, por naturaleza tiene en su tejido más proteína con un valor de 4,35% que el bagazo aumentando un 18%, seguido de la cascarilla y bagazo de caña.

Los resultados obtenidos son similares a las investigaciones de Ruqayyah (2004), Castillo y Ruiz (2013), Álvarez (2010) entre otras, según estos autores se puede atribuir que existió una mayor población microbiana, los cuales estimularon el crecimiento del hongo.

Además, en el caso de la cascarilla de café un tuvo un incremento del 28,00% y en el tamo de frejol un 18,00%, demostrando que *T. asperellum* posee un menor crecimiento en estos tratamientos, como se muestra en el análisis realizado en la prueba pareada. Los resultados se compararon con algunas investigaciones de Valdiño (2014), Bustamante (2008) y Hsu et al. (2013). En base a estos estudios realizados en esta investigación y por otros autores se puede discutir que el aumento de proteína microbiana es exitoso.

De este modo, como se ha mencionado antes y se ha relacionado con varios estudios vinculados en el incremento de proteína con el género *Trichoderma sp.*, se determina que el microorganismo usado en esta investigación se denomina de carácter positivo para el incremento de proteína microbiana con un total de 84,00% en el tratamiento de bagazo de caña, en la cascarilla con un 28,00% y en el tamo de frejol con un 18,00%, considerando que se debe a la dosis de nutrientes puesta en cada uno de estos, como una fuente de nitrógeno, bajo condiciones apropiadas de pH, humedad, aireación y temperatura, debido a estos factores importantes el microorganismo (*T. asperellum.*) puede desarrollarse.

5.7 Sustratos enriquecidos con *T. asperellum* durante 21 días

Tamo de frejol

El desarrollo del hongo *T. asperellum* en el tamo de frejol se fue observando a partir del octavo día, primero se observó unos pequeños puntos blanquecinos, no se presentaron en grandes cantidades en los primeros días a partir del día 11 se fue visualizando una mayor cantidad de estos. El tamo de frejol (tratamiento 1), en las repeticiones (R1, R2 Y R4) se

logró observar un gran progreso, pero en la repetición (R3) no se notó el mismo. También se contó con una buena hidratación para mantener la humedad requerida por el hongo, la apta para que exista un buen desarrollo es de 70,00% y un pH de 6,00 a 6,50; el tamo de frejol presenta un pH de 6,80, es decir, que cuenta con una característica favorable para su desarrollo.

Cascarilla de café

La principal desventaja que tiene este sustrato es su pH de 5,09; ya que no es una buena característica para el crecimiento de *T. asperellum*, a causa de esto su aumento fue lento. A partir del día 8 se pudo mirar el desarrollo de este hongo, por otro lado, este no fue muy notorio como en el tamo de frejol, es decir, presentó un diminuto crecimiento y su mayor incremento se observó en el día 18. La cascarilla de café (tratamiento 2), en las repeticiones (R2, R3 y R4) se logró observar un gran progreso, pero en la repetición (R1) no se notó un buen avance. Respecto a la hidratación, en la cascarilla de café se tuvo que hacerla de manera constante, es decir, se lo hizo diariamente, debido a que tendía a resecarse muy fácilmente. Por esta razón fue muy difícil mantener la humedad requerida por el hongo.

Bagazo de caña

Su principal ventaja es su pH de 6,50; debió a esta característica presente el hongo pudo crecer. Su desarrollo se visualizó a partir del día 10, por otra parte, no fue tan visible su crecimiento. A partir del día 15 al 18 su aumento fue demasiado notorio, presentando varios puntos blancos en forma de hilos. El bagazo de caña (tratamiento 3), en las repeticiones (R1, R2, R3 y R4) se logró mirar un gran progreso de aumento del hongo. Respecto a la hidratación, el bagazo de caña fue un buen sustrato ya que mantenía la humedad requerida y no necesitaba de ser hidratado frecuentemente, es decir, se lo hizo cada 2 a 3 días y por ende no se manipulo muy seguido evitando posibles contaminaciones.

5.8 Determinación de la morfología de *T. asperellum* en el aéreo microscopio Motic B1-220 con cámara.

Con la ayuda del aéreo microscopio con cámara se logra observar la estructura o forma que presenta el hongo *T. asperellum* en los tres sustratos (materia prima). Las cepas de este género presentaron colonias con aspecto polvoriento, forma anular, color blanco y con adherencia a los sustratos. Visto con los lentes 16x/11 10/20 se logra observar conidios en

forma de racimos y hay presencia de fiálides son cortas y nacen en ángulos delgados de las hifas que llevan racimos díticos a las conidias (Fig. 28, 29,30).

TAMO DE FREJOL (T1d1R2)

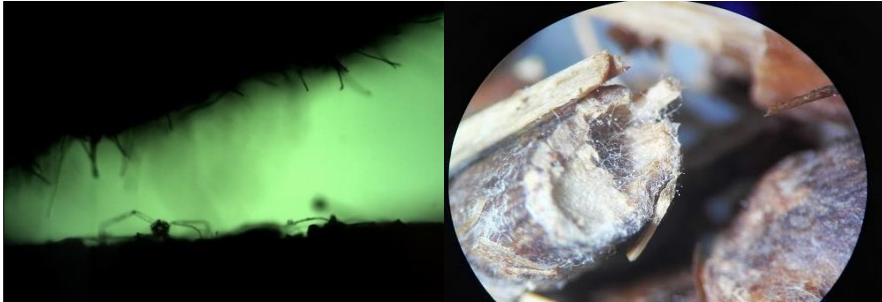


Figura 28. Morfología de *T. asperellum* con cámara en tamo de frejol. T1d1R2, tratamiento 1, dosis 1, repetición 2.

Fuente: La Autora

CASCARILLA DE CAFÉ (T2d1R1)

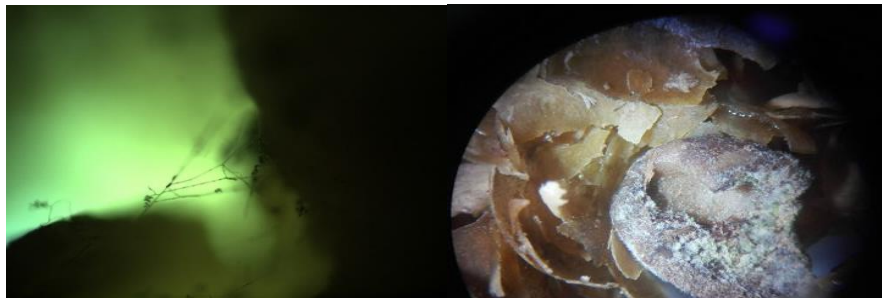


Figura 29. Morfología de *T. asperellum* con cámara en cascarilla de café. T2d1R1, tratamiento 2, dosis 1, repetición 1.

Fuente: La Autora

BAGAZO DE CAÑA (T3d1R1)

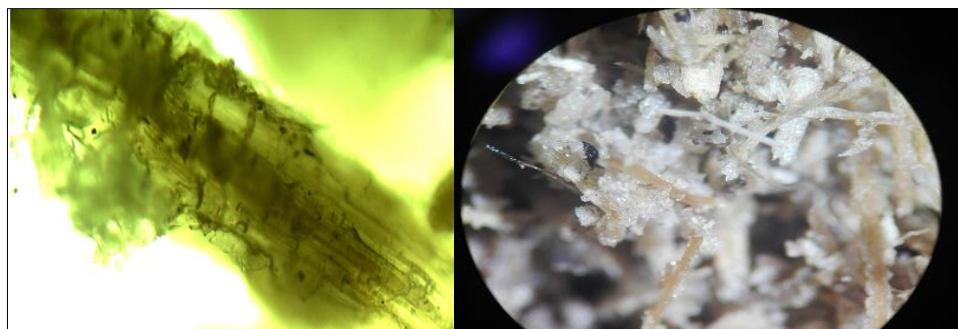


Figura 30. Morfología de *T. asperellum* con cámara del Bagazo de caña. T3d1R1, tratamiento 3, dosis 1, repetición 1. Fuente: La Autora

5.9 Otras variables evaluadas

🚩 Curva de crecimiento del hongo *T. asperellum*

El bagazo de caña tuvo un conteo de $349,55 \times 10^8$ esporas ml^{-1} , por lo tanto, refleja una excelente adaptación y reproducción. El que menor crecimiento que tuvo fue en el tamo de frejol con un conteo de $85,87 \times 10^8$ esporas ml^{-1} . Mientras que en la cascarilla de café tuvo $239,57 \times 10^8$ esporas ml^{-1} .

De acuerdo con los resultados obtenidos en la figura 31, el hongo *T. asperellum* se desarrollo mejor a partir del día 15, pero a partir del día 18 se observo que en el bagazo de caña disminuyo su población microbiana y luego se mantuvo en latencia ya que no se tiene más datos, mientras que el tamo de frejol se encontró en latencia. La cascarilla de café se observa que existio un crecimiento hasta el día de la evaluación, pero no se pudo verificar en que día entra en latencia.

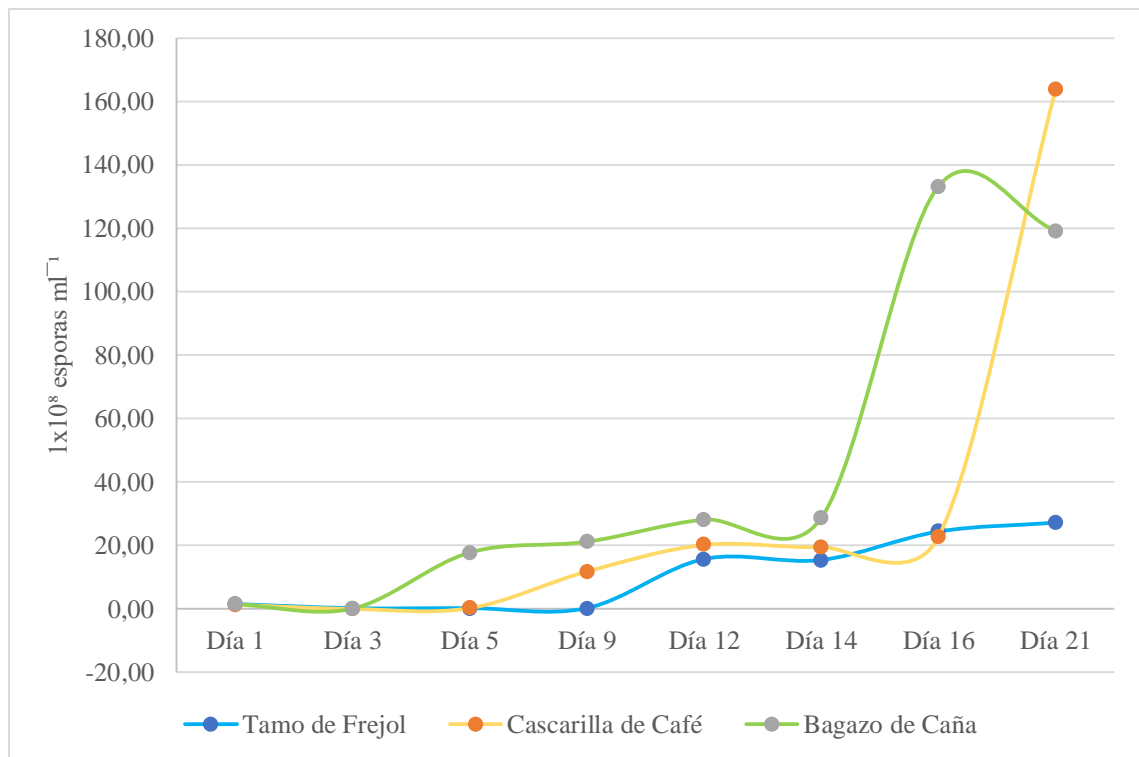


Figura 31. Curva de crecimiento: *T. asperellum*.

Fuente: La Autora.

🚩 Monitoreo de la temperatura

En esta investigación se realizó en un invernadero hidropónico y se monitorio la temperatura y humedad con la ayuda de un datalogger HOBO Pro v2 durante 21 días. El hongo *T. asperellum* se desarrolló a una temperatura promedio de 19,92°C siendo su temperatura máxima de 33,13°C y su mínima de 10,73°C; mientras que en la humedad relativa tuvo un promedio de 62,53% y su máxima fue de 90,51% y su mínimo de 31,70%.

Según Negra (2018), menciona una temperatura óptima de 25 a 28°C, llegando a alcanzar una máxima de 35°C, siendo esta la mejor para el desarrollo del hongo *T. asperellum*. En nuestra investigación se trató de mantener esta temperatura para el desarrollo del mismo. Siendo así que este hongo tiene una capacidad de tolerar un amplio rango de temperaturas lo que favoreció en esta investigación. Se tuvo una variación de temperaturas (ver figura 32). Los tratamientos (tamo de frejol, cascarilla de café y bagazo de caña) tuvieron un efecto positivo en el crecimiento del hongo, lo cual coincide con la investigación de Negra.

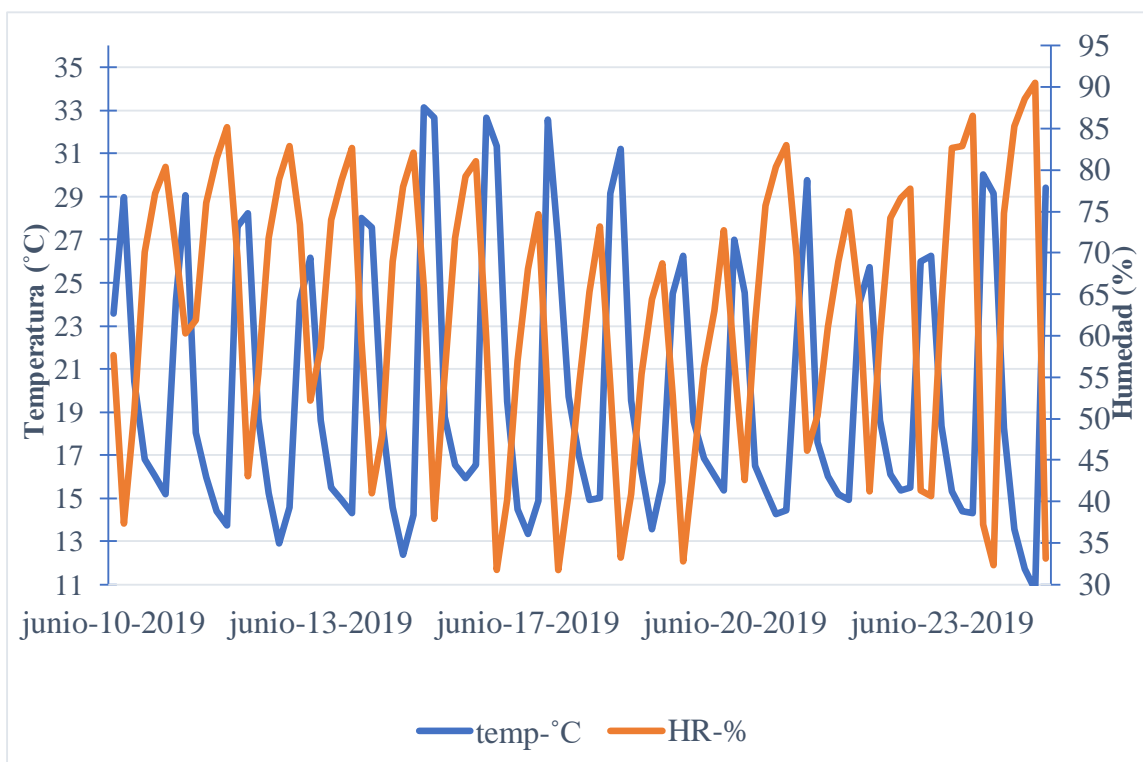


Figura 32. Variaciones de Temperatura vs humedad en el invernadero hidropónico; *T. asperellum*.

Fuente: La Autora

5.10 Socialización

Esta socialización se realizó el 8 de agosto del 2019, en el laboratorio de Biotecnología de la Pontificia Universidad católica del Ecuador Sede-Ibarra (PUCESI) con la participación de 9 personas, se invitaron a docentes y estudiantes de la carrera de Ciencias Ambientales y Ecodesarrollo, con la finalidad de socializar el trabajo de investigación “*T. asperellum* en el enriquecimiento proteico de residuos lignocelulósicos”.

Primeramente, se dio a conocer el problema ambiental que enfrenta el medio ambiente, debido a que las agroindustrias no llevan un manejo adecuado de estos residuos lignocelulósicos llevando a un complicación grave hacia la naturaleza, también se mencionó la metodología empleada en la investigación, como se llevó a cabo la caracterización de estos residuos, tratamiento y análisis que se realizó para determinar el incremento de la proteína que se dio en los sustratos, posteriormente se presentó los resultados de la investigación. Seguidamente se presentó las respectivas conclusiones y recomendaciones, y se culminó el proceso de socialización con el panel de preguntas por parte del auditorio.

Además, este proyecto de investigación tuvo una gran acogida por el público presente, lo que se evidencio en la tabulación de las encuestas realizadas, siendo estos mismos muy relevantes, se tuvo un 89,00% de los encuestados que consideran que el tema de investigación posee relevancia para algún otro actor, un 89,00% valora que la investigación posee perspectivas para estudios complementarios posteriores, un 100,00% cree que esta misma, genera actualmente o a futuro un gran beneficio concreto para alguna organización, empresa pública o privada, comunidad o institución y en función de los objetivos propuestos en la investigación de conformidad a un nivel alto, los asistentes respondieron que se cumplió en un 78,00% (ver anexo 14).



Figura 33. Socialización.

Fuente: La Autora

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES.

Después de haber finalizado la fase experimental del proyecto y obtenidos los resultados antes mencionados se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- Al culminar el experimento, se acepta la hipótesis de la investigación. El mejor tratamiento fue el bagazo de caña que logra incrementar un 84% en una concentración de proteína bruta de después de usar el hongo *T. asperellum*.
- La caracterización físico-química se realizó con la finalidad de evidenciar el contenido bromatológico antes y después de la investigación, para determinar las condiciones que podrían favorecer el desarrollo del hongo *T. asperellum*.
- Al comparar las concentraciones de lignina en los residuos lignocelulósicos, antes y después de la investigación, se determina que el hongo *T. asperellum* es lignívoro puesto que la disminución es significativa. Este hongo también es capaz de degradar fibra.
- La adaptabilidad de este hongo frente a uno u otro residuo no solo está determinada por las características bromatológicas, sino también por la ambientales: luz, humedad y temperatura.
- El pH recomendado (dato bibliográfico), para favorecer el crecimiento microbiano oscila entre 5,50 y 6,50. Esto coincide con los tratamientos tamo de frejol (6,08), y bagazo de caña (6,50), no así con el de la cascariila de café (5.09), sin embaro, en esta última también se puedo evidenciar un desarrollo considerable del hongo, por lo que el rango del pH es mucho mayor al descrito como óptimo.
- La temperatura media a la que se desarrolló de *T. asperellum* fue de 19,92°C, con variaciones máximas y mínimas entre 33,13 y 10,73°C. La humedad relativa media fue de 62,53% con una máxima de 90,51% y su mínima de 31,70%.

- En las curvas de crecimiento de *T. asperellum*, se evidencia que en el bagazo de caña fue el que mejor crecimiento tuvo a partir del día 15, pero a partir del día 18 se observó que disminuyó su población microbiana y luego se mantuvo en latencia ya que no se tiene más datos, mientras que el tamo de frejol se encontró en latencia. La cascarilla de café se observa que existió un crecimiento hasta el día de la evaluación, pero no se pudo verificar en que día entra en latencia.
- La socialización se la realizó con el fin de dar a conocer los resultados obtenidos en este trabajo e incentivar a los asistentes a realizar más investigaciones sobre este tema, ya que es el momento de dar valor agregado a desechos agroindustriales y obtener un nuevo uso con beneficios económicos.

CAPÍTULO VII

RECOMENDACIONES.

Con base a lo experimentado se sugiere lo siguiente:

- Para lograr un buen crecimiento microbiano de *T. asperellum* es necesario mantenerlo en un ambiente cerrado, controlar la luz, humedad y temperatura, para conseguir una mayor población y por ende, lograr un incremento de proteína.
- Realizar una evaluación de crecimiento de *T. asperellum* por mas de 21 días en la cascarilla de café, para verificar en que momento este entra en latencia y evidenciar cuanto contenido de proteína incrementa en esos días.
- Colocar suplementos vitamínicos o reactivos limitantes como carbono, nitrógeno, azufre, hierro y otros minerales, ya que estos son indispensables para la producción enzimática y crecimiento de los hongos. Como fuente de carbono se pueden usar algunos carbohidratos: glucosa, fructosa y almidón; Como aporte nutricional de nitrógeno se usan compuestos como el cloruro de amonio, peptona y extracto de malta (Rojas y Hormaza, 2014).
- Evaluar la proteína en períodos de crecimiento del *T. asperellum* cada 7, 14 y 21 días para determinar en qué período existe un mayor incremento de proteína, por otro lado, establecer en que tiempo se puede cosechar.
- Realizar mas estudios para evaluar si este producto enriquecido en proteínas sirve para alimentación en animales de rápido crecimiento y así, probar si el proceso de fermentación en estado solido es efectivo.
- Realizar más estudios para evaluar si este producto enriquecido en proteínas sirve para alimentación en animales de rápido crecimiento y así, probar si el proceso de fermentación en estado sólido es efectivo.

CAPÍTULO VIII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Agüero, A., Pisa, J., Agüero, C., y Torres, A. (2004). Poder calorífico del bagazo de caña de azúcar. *Revista de Ciencias Exactas e Ingeniería*, 13(24), 33-37.
- Águila, B., Camacho, M., y Serrat, M. (2014, enero). Enriquecimiento proteico de residuales agroindustriales mediante fermentación sólida con el hongo filamentoso *Aspergillus niger*. *Revista Cubana de Química*. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=443543737003>> ISSN 0258-5995
- Álvarez, M., Larrea, P., y Paredes, M. (2010). *Fermentación sólida del banano de rechazo utilizando Aspergillus niger para alimento animal* (Tesis de grado). Escuela Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- Antolín, G., & Oliva, D. (2003). Caracterización del bagazo de caña de azúcar mediante análisis térmico. *Revista de Información Tecnológica*, 14, 3-25.
- AOAC. (1990). *Official Methods of Analysis*. Recuperado de <https://law.resource.org/pub/us/cfr/ibr/002/aoac.methods.1.1990.pdf>
- Arana, I., Orruño, M., y Barcina, I. (2010). Como abordar y resolver aspectos prácticos de Microbiología. Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, 1-2.
- Arellano, C. (2015). *Obtención de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos sometidos a hidrólisis enzimática*. (Tesis de maestría). Universidad Veracruzana, México. Recuperado de <https://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/46812/2/ArellanoPeralesCarla.pdf>
- Arias, R., y Meneses, D. (2016). *Caracterización físico-química de residuos agroindustriales (cascarilla de arroz y cascarilla de café), como materia prima potencial para la obtención de bioetanol* (Tesis de grado). Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua, Nicaragua. Recuperado de <http://repositorio.unan.edu.ni/3793/1/53860.pdf>

- Arias, E., y Piñeros, P. (2008). *Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz verde* (Tesis de grado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Recuperada de <https://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis226.pdf>
- Arteaga, T., & Casiano, L. (2018). *Influencia de la temperatura y pH en la fermentación de azúcares hidrolizados para la obtención de etanol a partir de la cáscara de café (Coffea arábica L.)* (Tesis de grado). Universidad Nacional del Trujillo, Trujillo, Perú. Recuperado de http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/10522/ArteagaCastillo_T%20-%20CasianoBlas_L.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Báez, S. (2012). *Elaboración de cargas energéticas a partir de residuos lignocelulósicos (Bagazo de cama), como alternativa energética para el Ingenio Azucarero del Norte IANCEM.* (Tesis de grado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra, Imbabura, Ibarra.
- Bardales, C., León, J., y Cabos, J. (2017). *Enriquecimiento proteico de los principales residuos lignocelulósicos agroindustriales de la Región La Libertad con la asociación mixta de Trichoderma reesei, Chaetomiun cellulolyticum y Candida utilis para alimentación animal.* (Tesis de grado). Universidad Privada Antenor Orrego, Perú.
- Barón, L. (2014). *Evaluación de la cascarilla de café como material adsorbente para la remoción de iones plomo pb2+ presente en soluciones acuosas* (Tesis de grado). Universidad Libre, Bogotá. Recuperado de <https://repository.unilibre.edu.co/bitstream/handle/10901/11234/DOCUMENTO%20FINAL%20LAURA%20BAR%C3%93N.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Benítez, A. (2016). *Utilización de diferentes niveles de urea en la dinámica de fermentación de la pulpa de café para uso en la alimentación de rumiantes en la provincia de Loja* (Tesis de grado). Universidad Nacional de Loja, Loja, Ecuador. Recuperado de <http://192.188.49.17/jspui/bitstream/123456789/10282/1/TESIS%20FINAL.pdf>
- Berman, J. (2011). *Desarrollo de alimento animal melazado, y enriquecido a partir de insumos no-convencionales y subproductos de la caña de azúcar, para engorda de*

ganado bovino en etapa de finalización (Tesis de grado). Instituto Politécnico Nacional, Altamira, Tamaulipas. Recuperado de <https://tesis.ipn.mx/xmlui/bitstream/handle/123456789/11785/Tesis%2C%20Josu%2C%20Berman.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Bermejo, D. (2016). *Remoción de plomo y cadmio presente en aguas residuales mineras mediante biosorción en columnas con bagazo de caña y cáscara de cacao* (Tesis de grado). Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador. Recuperado de <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/25710/1/Tesis.pdf>

Bustamante, Z., Galindo, E., Huanca, M., y Ballesteros, F. (2008). Obtención de bioproteína a partir de bagazo de naranja (*Citrus sinensis*) con *Aspergillus niger*. Programa Fármacos, Alimentos y Cosméticos, (PROFAC), Facultad de Bioquímica y Farmacia, Universidad Mayor de San Simón.

Briones, G. F. (2014). *EFEECTO DE Trichoderma asperellum SOBRE LA INCIDENCIA Y SEVERIDAD DE Rhizoctonia solani y Gaeumannomyces graminis EN LA ZONA DE DAULE* (Tesis de grado). Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador. Recuperado de <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/8162/1/Tesis%20Guillermo%20Francisco%20Briones%20Huac%20C3%B3n.pdf>

Castillo, Y., y Ruiz, O. (2013). Fermentación en estado sólido (FES) de subproductos agroindustriales como alternativa para obtener alimento animal. En E. Bautista., Y. Castillo., y O. Sánchez. (Ed.), Alternativas de la cadena del valor, Primer Congreso Internacional Agromerca (53-62). Ciudad Juárez, México. Dirección General de Difusión Cultural y Divulgación Científica

Catucuamba, J. (2013). *Evaluación de la producción del cultivo del hongo comestible (PLEUROTUS OSTREATUS), sobre tamo de cebada, con aplicación de afrecho, y diferente porcentaje de micelio, en la parroquia Pifo, provincia Pichincha* (Tesis de grado). Universidad Estatal de Bolívar, Guaranda, Ecuador. Recuperado de http://www.usfx.bo/nueva/vicerrectorado/citas/AGRARIAS_7/Ingenieria%20Agronomica/90.pdf

- Ceballos, A., y Montoya, S. (2013). Evaluación química de la fibra en semilla, pulpa y cáscara de tres variedades de aguacate. *Revista de Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(1), 103 – 112. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v11n1/v11n1a13.pdf>
- Chávez, M. (2006). *Producción de Trichoderma sp. y Evaluación de su efecto en cultivo de crisantemo (dendranthema grandiflora)* (Tesis de grado). Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Recuperado de <https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis286.pdf>
- Chávez, M., y Domine, M. (2013). Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Revista de Avances en Ciencias e Ingeniería*, 4(4), 15-46. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=3236/323629266003>
- Correia, R., Magalhaes, M., Macedo, G., 2007, Protein enrichment of pineapple waste with *Saccharomyces cerevisiae* by solid state bioprocessing, *Jornal of Scientific & Industrial Research*, 66, 259- 262.
- Cortes, W. (2014). Tratamientos Aplicables a Materiales Lignocelulósicos para la Obtención de Etanol y Productos Químicos. *Revista de Tecnología*, 13(1), 39-44. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6041572>
- Cortes, W. (2011). Materiales lignocelulósicos como fuente de biocombustibles y productos químicos. *Revista Tecno Esufa*, 16 (1), 41-46. Recuperado de <https://publicacionesfac.com/index.php/TecnoESUFA/article/view/366/486>
- Cortínez, V. (2010). *Comparación de pretratamientos en residuos forestales para la producción de bioetanol de segunda generación: hidrólisis ácida y líquidos iónicos* (Tesis de maestría). Universidad de Chile, Santiago de Chile, Chile. Recuperado de http://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2010/cf-cortinez_vv/pdfAmont/cf-cortinez_vv.pdf

- Días, D. (2006). *Producción de proteína microbiana a partir de manzana de desecho adicionada con urea y pasta de soya* (Tesis de grado). Universidad Autónoma de Chihuahua, Chih, México. Recuperado de <http://www.lebas.com.mx/files/Tesis.pdf>
- Días, D. (2011). *Aprovechamiento y uso de la manzana de desecho en la ganadería del Estado de Chihuahua* (Tesis de grado). Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua, México. Recuperado de <http://www.lebas.com.mx/files/APROVECHAMIENTO-Y-USO-DE-LA-MANZANA-DE-DESECHO.pdf>
- Dustet, J., Peña, J., Pérez, W., y Díaz, M. (2002). Evaluación de un nuevo prototipo de biorreactor para fermentaciones en estado sólido de residuos fibrosos. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. Recuperado de <https://www.redalyc.org/html/1930/193018080011/>
- El Mansouri, N. (2007). Despolimerización de lignina para su aprovechamiento en adhesivos para producir tableros de partículas (Doctoral dissertation, Universitat Rovira i Virgili). Recuperado de <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/8538/TesisNourEddineElMansouriTDX1.pdf?sequence=1>
- Fuentes, I. (2018). *Extracción de celulosa a partir de Opuntia ficus para la evaluación sobre la retención de flúor (F-)* (Tesis de pregrado). Universidad Autónoma del Estado de México, México.
- García, A. (2016). *Propuesta de diseño para el aprovechamiento de los residuos generados en las actividades de producción de café* (Tesis de Grado). Universidad de las Américas, Quito, Ecuador. Recuperado de <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/6188/1/UDLA-EC-TDGI-2016-16.pdf>
- García, R., Ríos, E., Martínez, A., Ramos, F., Cruz, J., y Cuevas, M. (2011). Uso de cachaza y bagazo de caña de azúcar en la remoción de hidrocarburos en suelo contaminado.

Revista Internacional de Contaminación Ambiental, 27 (1), 31-39. Recuperado de <http://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v27n1/v27n1a3.pdf>

Gélvez, L. (24 de jul. de 19). Caña de azúcar bagazo [Mensaje en un Blog]. Recuperado de https://mundo-pecuario.com/tema61/nutrientes_para_rumiantes/cana_azucar_bagazo-522.html

Giampaoli, G., Brandán de Weht, C., Enrico, R., Coll Aráoz, M., y Lencina, V. (2014). Efecto de la esterilización con métodos físicos en suelo, sobre la flora micorrícica y en el cultivo del yacón (*Smallanthus sonchifolius*) en Horco Molle, Tucumán. *Rev. agron. noroeste argent*, 34 (2), 36-39. Recuperado de https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/37830/CONICET_Digital_Nro.7ac41f36-9421-49e8-a09c-0ccd57c5c126_A.pdf?sequence=2

Greenfield, H., y Southgate, D. (1992). *Food Composition Data. Production, Management and Use*. London, Elsevier Applied Science. Recuperado de http://www.fao.org/fileadmin/templates/food_composition/images/FCD.pdf

Grossi, G., Ohaco, E., y De Michelis, A. (2015). Determinación de fibra dietética total, soluble e insoluble en hongos comestibles de cultivo *Pleurotus ostreatus*. *Rev. Instituto de tecnología agropecuaria*, 4(1), 4-35. Recuperado de https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_determinacin_de_fibra.pdf

Gómez, J., Correa, G. y Barahona, R. (2014). Evaluación del Residuo del Cultivo de *Agaricus bisporus* como Alimento de Vacas Lecheras en Lactancia Media. *Revista de la Facultad nacional de agronomía*, 67(2), 7321-7333. doi: 10.15446/rfnam.v67n2.44174

Gómez, J., Yepes, S., y Barahona R. (2013). Caracterización nutricional del residuo del cultivo de la seta *Agaricus bisporus* como alimento potencial para bovinos. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/3214/321428109004.pdf>

- Goyenola, G. (2007). Red de Monitoreo Ambiental Participativo de Sistemas Acuáticos. Recuperado de http://imasd.fcien.edu.uy/difusion/educamb/propuestas/red/curso_2007/cartillas/tematicas/Determinacion%20del%20pH.pdf
- Grajales, D. (2015). *Inducción de lipasas/ferulol esterasas de Aspergillus ochraceus con residuos de la industria del maíz para la síntesis de ésteres de valor biotecnológico* (Tesis de maestría). Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Guadalajara, México. Recuperado de <http://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1023/22>
- Gualtieri, A., Villalta, C., Díaz, L., Medina, G., Lapenna, E., y Rondón, M. (2007). Producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis* usando residuos de pulpa de *Coffea arábica* L. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 38(2), 31-37. Recuperado en 26 de julio de 2018, de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-04772007000200004&lng=es&tlng=es
- Harris, J. (2012). *Selección de pretratamientos en base a la caracterización físico-química de residuos de Eucalyptus globulus y Populus canadensis para la producción de bioetanol* (Tesis de maestría). Universidad de Chile, Santiago de Chile, Chile. Recuperado de <https://pdfs.semanticscholar.org/50fd/f0ebb8bb9f07a1ae4093e4a2f1cffe5f6adf.pdf>
- Hernández, R., y López, C. (2008). *Evaluación de crecimiento y producción de pleurotus ostreatus sobre diferentes residuos agroindustriales del departamento de Cundinamarca* (Tesis de grado). Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Recuperado de <https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis257.pdf>
- Hernández, J., y López, U. (2015). Bagazo de caña, sustrato orgánico para la producción de pepino en invernadero. *Revista del Centro de Investigación Regional del Noreste*. Recuperado de http://www.campopotosino.gob.mx/modulos/Docs-descargar/SUSTRATO_PEPINO.pdf

- Huanaco, J. (2008). *Aislamiento de hongos filamentosos con actividades ligninolíticas en Calagrotis nitidula Pilger* (Tesis de grado). Universidad Nacional mayor de San Marcos, Lima, Perú. Recuperado de http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/876/Laura_hj.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Hsu, P., Liu, C., Liu, L., Chang, C., Yang, S., 2013, Protein enrichment and digestion improvement of napiergrass and pangolagrass with solid-state fermentation, *Immunology and Infection*, 46(3), 171-179. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2012.04.001>
- Infante, D., Martínez, B., González, N., y Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de Trichoderma frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección vegetal*, 24 (1), 14-21. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S101027522009000100002
- Instituto Nacional de Normalización. (1988). Determinación de la humedad y materias volátiles en granos o semillas oleaginosas (NCh 484 CR 88). Recuperado de <http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/010/ah833s/AH833S07.pdf>
- Juárez, F., Vilaboa, J., y Díaz, P. (2009, 18 de mayo). La caña de azúcar (saccharum officinarum): una alternativa para la sustitución de maíz (zea mays) en la alimentación de bovinos de engorda. *Revista de Ganadería*. Recuperado de <https://www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/cana-azucar-saccharum-officinarum-t27953.htm>
- Julián, R., Claridad, M., y Ramos, B., L. (2007). Fermentación en estado sólido (I). *Revista de Tecnología Química, XXVII* (3), 17-22. Recuperado de <http://www.redalyc.org/html/4455/445543754003/>
- Julián, M. (2016). *Evaluación de la digestibilidad aparente in vitro de dietas isoenergéticas e isoprotéicas utilizando dos niveles de palmiste en la alimentación de conejos en CEU* (Tesis de grado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Kirk, R., Sawyer, R., y Egan, H. “Composición y Análisis de Alimentos de Pearson”. Segunda edición. Editorial CECSA. México 1996.

- Llerena, J. (2015). *Respuesta del suelo y del cultivo de fresa (fragaria x ananassa) a la aplicación de lactofermentos enriquecidos en el sector querchaca cantón Cevallos* (Tesis de grado). Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador.
- López, C. (2016). *Composición química y digestibilidad in situ de las cáscaras de banano (musa paradisiaca), frejol gandul (Cajanus cajan), y maíz (Zea mays) colonizados con hongos (pleurotus sp)* (Tesis de grado). Universidad Técnica Estatal De Quevedo, Los Ríos, Ecuador. Recuperado de <http://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/1903/1/T-UTEQ-0045.pdf>
- López, F. (2008). Desarrollo tecnológico de la producción de proteína unicelular para la alimentación animal a partir de efluentes líquidos y gaseosos de las destilerías. *ICIDCA*. Recuperado de http://karin.fq.uh.cu/acc/2016/CIENCIAS_TECNICAS/032/New/Documentaci%C3%B3n/Parte%20IV/Bibliograf%C3%ADa/Cap.%20III.2/71.pdf
- Llanes, D. (2012). *Desarrollo técnico-económicamente viable de harinas forrajeras predigeridas y enriquecidas proteicamente a partir del bagazo de la caña de azúcar* (Tesis de grado). Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada, Altamira, México. Recuperado de <https://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/16125/1/Tesis%20Diana%2022-Enero2012.pdf>
- Llenque, L., Muñoz, M., Espejo, E., Moreno, A., (2015). Producción de células por *Aspergillus niger* a partir de bagazo de caña de azúcar en biorreactor aireado. *Revista de Ciencia y Tecnología*. 11(4), 39-49.
- Manals, E., Salas, D., y Penedo, M. (2018). Caracterización de la biomasa vegetal de cascarilla de café. *Revista de Tecnología Química*, 38(1), 169-181. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-61852018000100013&lng=es&tlng=es
- Marín, A. (1999). *Utilización del alga Sargassum spp. como complemento alimenticio de ganado ovino* (Tesis de grado). Instituto Politécnico Nacional Cicimae Centro

- Interdisciplinario De Ciencias Marinas, La paz, México. Recuperado de <http://www.biblioteca.cicimar.ipn.mx/oasis/Medios/tesis/marina1.pdf>
- Martínez, D. (2014). *Producción de tres especies de Pleurotus spp. utilizando diferentes sustratos* (Tesis de grado). Universidad Rafael Landívar, Coatepeque, Guatemala. Recuperado de <http://biblio3.url.edu.gt/Tesario/2014/06/17/Martinez-Daniel.pdf>
- Mendoza, A., y Resendiz, L. (5 de noviembre de 2008). Practica #3 Determinación de fibra cruda [Mensaje en un blog]. Recuperado de <http://qfbalimentoslaboratory.blogspot.com/2008/11/determinacion-de-fibra-cruda.html>
- Mera, M. (2015). Guía d actividades prácticas n° 01 Determinación de humedad, PUCESI, consultado en febrero del 2020.
- Mera, M. (2015). Guía d actividades prácticas n° 02 Determinación de cenizas totales, PUCESI, consultado en febrero del 2020.
- Mera, M. (2015). Guía d actividades prácticas n° 07 Determinación de proteína, PUCESI, consultado en febrero del 2020.
- Mera, M. (2015). Guía d actividades prácticas n° 09 Determinación de Energía, PUCESI, consultado en febrero del 2020.
- Molina, M. (2014). Elaboración de ensaladas orgánicas con los productos de la granja María Carlota situada en el cantón Quero de la provincia de Tungurahua. (Tesis de grado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. Recuperado de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/9908/1/84T00343.pdf>
- Montoya, J. (2016). *Producción de Biogás a partir de paja de Frijol sometida a diferentes pretratamientos* (Tesis de grado). Instituto Politécnico Nacional, Zacatecas, México. Recuperado de <https://tesis.ipn.mx/jspui/bitstream/123456789/21815/1/64-T4.pdf>
- NMX-1982, Norma Mexicana (1982) que establece la determinación de humedad en alimentos (método rápido de la termobalanza). NMX-F-428-1982. Dirección General de Normas. Octubre 7, 1982.

- Nugra, A. (2018). *Evaluación de sustratos orgánicos para la propagación del Trichoderma spp* (Tesis de grado). Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca, Cuenca, Ecuador. Recuperado de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15121/1/UPS-CT007457.pdf>
- Oliva, J. (2003). *Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre Kluyveromyces marxianus* (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España. Recuperado de <http://webs.ucm.es/BUCM/tesis//bio/ucm-t26833.pdf>
- Ortiz, A., Valdiviá, M., & Elías, A. (2003). La cascarilla de café como cama avícola. Primera crianza. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 37 (1), 21-26. Recuperado de <http://www.redalyc.org/comocitar.oa?id=193018072003>
- Ozcariz, M. (2016). *Aprovechamiento de Residuos Agroforestales, con particular interés en los originados en explotaciones de Nuez Pecán (Carya illinoensis), por medio del cultivo de Hongos Saprófitos Saludables Ibéricos* (Tesis doctoral). Universidad de Valladolid, Valladolid, España. Recuperado de <https://uvadoc.uva.es/bitstream/10324/16680/1/Tesis942-160406.pdf>
- Pineda, J. A. y Ramos, L. B. (2013). Producción de proteínas comestibles con fuentes alternativas de materias primas. *Revista Axioma*, 1(10), 5-9. Recuperado de <http://pucesinews.pucesi.edu.ec/index.php/axioma/article/view/370/360>
- Pineda, J., Soto, C., Guzmán, R., Santiago, N., Huaca, J., Duarte, S., y Pineda, A. (2016). Producción de hongo ostra (Pleurotus spp) en bagazo de caña. *ICIDCA. Revista sobre los derivados de la Caña de Azúcar*, 50 (1), 50-54. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223148420009.pdf>
- Pineda, J., Ramos, L., Soto, C., Freitas, A., y Pereira, L. (2015). Crecimiento de cepas ecuatorianas de Pleurotus ostreatus en residuos agroindustriales no suplementados. *Revista Técnica Universidad de Zulia*. Recuperado de <http://www.produccioncientifica.luz.edu.ve/index.php/tecnica/article/view/19883/19823>.

- Quintana, G., Velásquez, J., Gómez, C., y Echavarría, Y. (2008, 27 de junio). Adsorción de NI(II) en carbón activado de cascarilla de café. *Revista de Investigaciones Aplicadas*. Recuperado de <https://revistas.upb.edu.co/index.php/investigacionesaplicadas/article/view/142/116>
- Ramos, G. (2007). *Pleurotus ostreatus cultivo en residuos de la palma aceitera como importante fuente proteica para la dieta humana* (Tesis de grado). Universidad Politécnica, Riobamba, Ecuador. Recuperado de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/221/1/236T0002.pdf>
- Ramos, I. (1999). *Producción de Pleurotus ostreatus var florida sobre residuales de cacao*. (Tesis de maestría). Escuela Superior Politécnica De Chimborazo, Riobamba, Ecuador. Recuperado de <repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/373/1/T-SENESCYT-0144.pdf>
- Ramos, I. (2015). Caracterización química de tres residuos lignocelulósicos generados en la región del Cantón Alausí. *Revista del Instituto de Investigación*, (20), 80-85. Recuperado de revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/iigeo/article/download/14393/12728
- Rojas, J., y Hormaza, A. (2014). Evaluación del crecimiento y compatibilidad de hongos de la podredumbre blanca. *Revista de Ciencia en Desarrollo*, 5(2), 197-205. Recuperado de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-74882014000200015&lng=en&tlng=es.
- Román, P., y Ramón, D. (2012). *Análisis De La Capacidad Degradativa De Residuos Lignocelulósicos Utilizando El Hongo, Pleurotus ostreatus var. Florida* (Tesis de grado). Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca, Cuenca, Ecuador. Recuperado de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/2811/6/UPS-CT002462.pdf>
- Ruqayyah, T., Jamal, P., Alam, M., Mirghani, M., Jaswir, I., y Ramli, N. (2014). Application of response surface methodology for protein enrichment of cassava peel as animal

- feed by the white-rot fungus *Panus tigrinus* M609RQY. *Food Hydrocolloids*, 42(2), 298-303.
- Salazar, J., García, C. D., & Olaya, J. M. (1984). Dosificación de hormigones ligeros con cascarilla de café. *Revista en Ingeniería e Investigación*, (8), 51-56. Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/22813/1/19485-64217-1-PB.pdf>
- Sánchez, M. (2009). *Aislamiento y Caracterización molecular y agronómica de Trichoderma spp. Nativos del norte de Tamaulipas* (Tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional Centro de Biotecnología Genómica, Reynosa, México.
- Sánchez, A., Gutiérrez, A., Muñoz, J., y Rivera, C. (2010). Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. *Revista Tumbaga*, 5, 61-91. Recuperado de <http://revistas.ut.edu.co/index.php/tumbaga/article/view/58/58>
- Segura, F., Echeverri, R., Patiño, A., y Mejía, A. (2007). Descripción y discusión acerca de los métodos de análisis de fibra y del valor nutricional de forrajes y alimentos para animales. *Revista de Facultad de química farmacéutica*. 14(1), 72-81. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v14n1/v14n1a11.pdf>
- Serna, C., y Torres, L. (2015). Potencial agroindustrial de cáscaras de mango de las variedades Keitt, y Tommy Atkins (*Mangifera indica*). *Revista Acta Agronómica*. doi: 10.15446/acag.v64n2.43579
- Simbaña, M. (2012). *Determinación de la digestibilidad aparente de materia seca, proteína bruta y extracto etéreo en raciones alimenticias con intestinos conocidos de pollo en cerdo en etapa de crecimiento* (Tesis de grado). Universidad central del Ecuador, Quito, Ecuador. Recuperado de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/6665/1/T-UCE-0014-013.pdf>
- Solorza, J., Rendón, R., Sánchez, J., y Flores, E. (2013, 24 de octubre). Composición del bagazo de caña por análisis termo gravimétrico. *Revista de Ingeniería Química*. Recuperado de https://www.researchgate.net/profile/Emmanuel_Huicochea/publication/258848531_Composicion_del_bagazo_de_cana_por_analisis_termogravimetrico/links/00b4952

93dfb6c8627000000/Composicion-del-bagazo-de-cana-por-analisis-termogravimetrico.pdf

- Suesca, A. (2012). *Producción de enzimas celulolíticas a partir de cultivos de Trichoderma sp, con biomasa lignocelulósico* (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. Recuperado de <https://docplayer.es/60101525-Produccion-de-enzimas-celuloliticas-a-partir-de-cultivos-de-trichoderma-sp-con-biomasa-lignocelulosica.html>
- Suárez, G. (2008). *Tratamiento Primario de Vinazas de Destilería Empleando Candida utilis en un Sistema de Lecho Ecurrido* (Tesis de grado). Instituto Superior Politécnico “José Antonio Echeverría”. La Habana, Cuba. Recuperado de http://karin.fq.uh.cu/acc/2016/CIENCIAS_TECNICAS/032/New/Documentaci%C3%B3n/Parte%20IV/Bibliograf%C3%ADa/Cap.%20II.1/4.pdf
- TAPPI, T. (2002). 222 om-02. Acid-insoluble lignin in wood and pulp. Technical Association of the Pulp and Paper Industry, 2006. Recuperado de <https://www.tappi.org/content/SARG/T222.pdf>
- Tituaña, F. (2013). *Uso del hongo Trichoderma asperellum en plántulas de pimiento (Capsicum annum) y su efecto sobre la supervivencia y productividad en campo* (Tesis de grado). Universidad San Francisco de Quito, Quito, Ecuador. Recuperado de <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/2485/1/106815.pdf>
- Valdes, S. (2007). *Caracterización fisiológica de levaduras aisladas de la filosfera de mora* (Tesis de grado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Valiño, E., Elías, A., Carrasco, T., y Albelo, N. (2003). Efecto de inoculación de la cepa Trichoderma viride 137 en el bagazo de caña de azúcar autofermentado. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 37(1), 43-49. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/1930/193018072007.pdf>
- Valiño, E., Elías, A., Torres, V., Carrasco, T., y Albelo, N. (2004). Mejoramiento de la composición del bagazo de caña de azúcar por la cepa Trichoderma viride M5-2 en un biorreactor de fermentación en estado sólido. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 38 (2), 145-153.

- Valiño, E., Elías, A., Torres, V., y Nereida, A. (2004). Estudio de la carga microbiana en el bagazo de caña de azúcar fresco como sustrato para la alimentación animal, mediante fermentaciones en estado sólido. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 36(4), 373-378.
- Vázquez, O. (2015). *Etanol lignocelulósico, a partir de cascarilla de café, por medio de hidrólisis química-enzimática y fermentación* (Tesis de grado). Universidad Veracruzana, Veracruz, México. Recuperado de <https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/41986/VazquezMoralesOscar.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Villacís, C. (2017). *Estandarización de un protocolo para la producción de semillas de hongo ostra Pleurotus ostreatus adaptado a las condiciones de laboratorio* (Tesis de pregrado). Universidad de las Américas del Ecuador, Quito, Ecuador. Recuperado de <http://200.24.220.94/bitstream/33000/7380/3/UDLA-EC-TIAG-2017-02.pdf>
- Yépez, T. (2019). *Aprovechamiento de residuos vegetales de mercado en la producción de Trichoderma ssp. para uso comercial* (Tesis de grado). Universidad Técnica del Norte, Ibarra, Ecuador. Recuperado de <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/9229/1/03%20EIA%20480%20TRABAJO%20DE%20GRADO.pdf>

ANEXOS

Anexo 1 . Abreviaturas

ECAA	Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales
PUCESI	Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra
IANCEM	Ingenio Azucarero del Norte, Compañía de Economía Mixta
ANOVA	Análisis de Varianza
AOAC	AOAC Internacional (Asociación de Químicos Analíticos Oficiales); o, La asociación de las comunidades Analíticas
TAPPI	Norma estándar para Lignina Insoluble en ácido para madera y pulpas
NMX	Normas Mexicanas
NORMEX	Sociedad Mexicana de Normalización y Certificación S.C.
DCA	Diseño experimental completamente al azar
FES	Fermentación en estado sólido
FDN	Fibra detergente neutra
FDA	Fibra detergente ácida
FDT	Fibra dietética
C/N	Relación entre carbono y nitrógeno
TF	Tamo de Frejol
CC	Cascarilla de café
BC	Bagazo de caña
PDA	Agar papa dextrosa
°C	Centígrados
cal	Calorías
cm	Centímetros
kg	Kilogramos
GL	Grados de Libertad
ml	Mililitros
g	Gramos
ufc	Unidades formadas de colonias
MS	Materia seca

PB	Proteína bruta
SCE	Suma de cuadrados del error
SCT	Suma de cuadrados Total
SCTr	Suma de cuadrados de tratamientos
Hum	Humedad
Cen	Cenizas
MP	Materia Prima

Anexo 2. Sustratos enriquecidos con *T. asperellum* a los 21 días

TAMO DE FREJOL



Figura 34. Tamo de Frejol enriquecido. T1d1R1, Tratamiento 1, dosis 1(misma dosis), repetición (1, 2, 3 y 4)

Fuente: La Autora

CASCARILLA DE CAFÉ

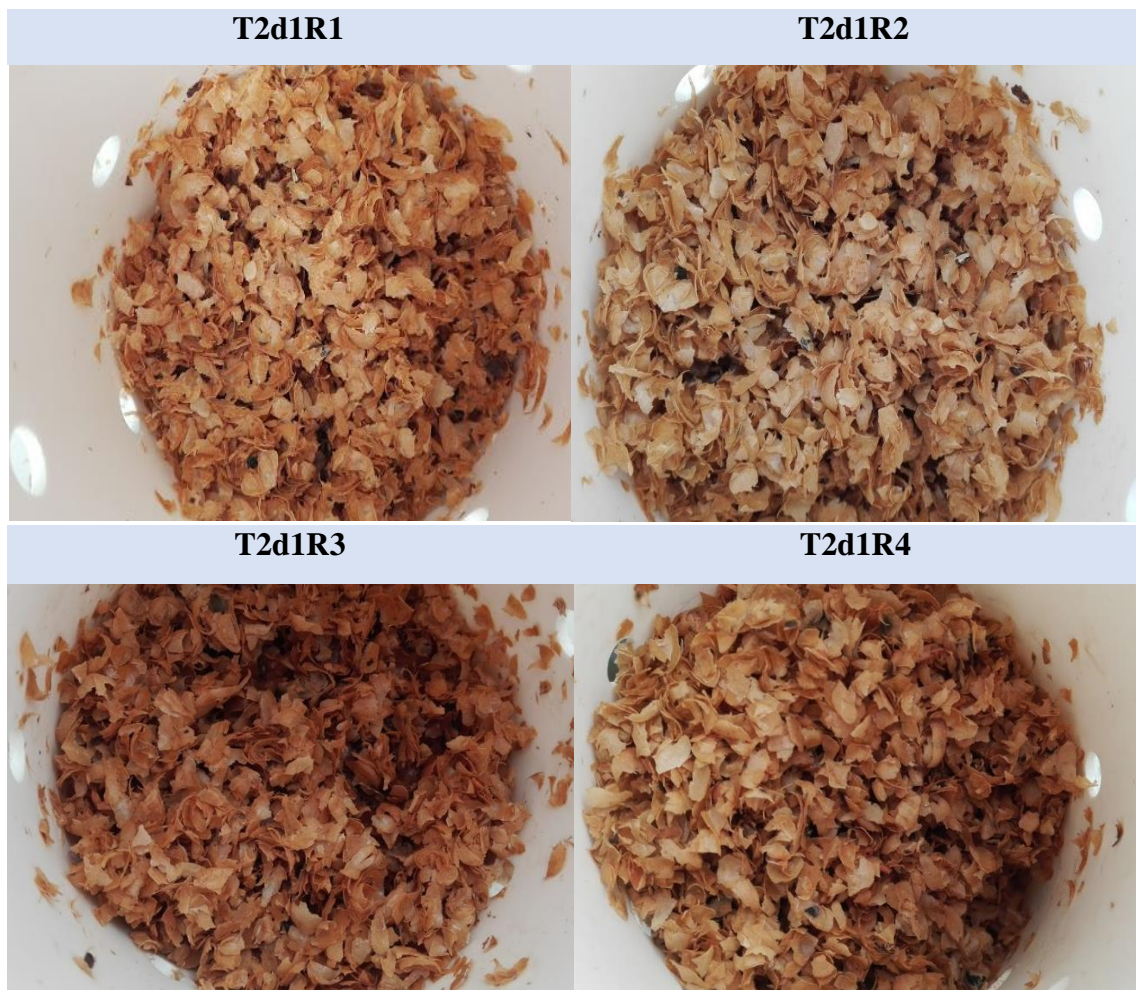


Figura 35. Cascarilla de café enriquecida. T2d1R1, Tratamiento 2, dosis 1(misma dosis), repetición (1, 2, 3 y 4)

Fuente: La Autora

BAGAZO DE CAÑA





Figura 36. Bagazo de azúcar enriquecido. T3d1R1, Tratamiento 3, dosis 1(misma dosis), repetición (1, 2, 3 y 4)

Fuente: La Autora

Anexos 3. Comparaciones de Lignina entre los tres sustratos con el hongo *T. asperellum*.

Tabla 14

Tamo de frejol, comparación de lignina (no tratado y tratado con el hongo)

TAMO DE FREJOL	Antes (%)	Después (%)
R1	34,51	32,21
R2	34,51	31,74
R3	34,51	28,09
R4	34,51	22,52
Media	34,51	28,64
Mediana	34,51	29,92
Desv. Estándar	0,00	4,48
Estándar Error	0,00	2,24

Fuente: La Autora

Tabla 15

Cascarilla de café, comparación de lignina (no tratado y tratado con el hongo)

CASCARILLA DE CAFÉ	Antes (%)	Después (%)
R1	51,36	42,84
R2	51,36	40,27
R3	51,36	37,58
R4	51,36	35,23
Media	51,36	38,98
Mediana	51,36	38,93
Desv. Estándar	0,00	3,30
Estándar Error	0,00	1,65

Tabla 16

Bagazo de caña, comparación de lignina (no tratado y tratado con el hongo)

BAGAZO DE CAÑA	Antes (%)	Después (%)
R1	34,05	32,77
R2	34,05	30,00
R3	34,05	29,00
R4	34,05	27,09
Media	34,05	29,72
Mediana	34,05	29,50
Desv. Estándar	0,00	2,37
Estándar Error	0,00	1,18

Fuente: La Autora

Anexo 4. Porcentaje de Proteína, comparación de los tres sustratos.

Tabla 17

Tamo de frejol, comparación de proteína (no tratado y tratado con el hongo)

TAMO DE FREJOL	Antes (%)	Después (%)
R1	4,35	5,46
R2	4,35	5,21
R3	4,35	4,73
R4	4,35	5,10
Media	4,35	5,13
Mediana	4,35	5,16
Desv. Estándar	0,00	0,30
Estándar Error	0,00	0,15

Fuente: La Autora

Tabla 18

Cascarilla de café, comparación de Proteína (no tratado y tratado con el hongo)

CASCARILLA DE CAFÉ	Antes (%)	Después (%)
R1	1,95	2,60
R2	1,95	2,19
R3	1,95	2,30
R4	1,95	2,89
Media	1,95	2,50
Mediana	1,95	2,45
Desv. Estándar	0,00	0,32
Estándar Error	0,00	0,16

Fuente: La Autora

Tabla 19

Bagazo de caña, comparación de Proteína (no tratado y tratado con el hongo)

BAGAZO DE CAÑA	Antes (%)	Después (%)
R1	0,92	1,73
R2	0,92	1,54
R3	0,92	1,63
R4	0,92	1,84
Media	0,92	1,69
Mediana	0,92	1,68
Desv. Estándar	0,00	0,13
Estándar Error	0,00	0,06

Fuente: La Autora

Anexo 5. Porcentaje de Fibra Cruda, comparación de los sustratos con *T. asperellum*.

Tabla 20

Tamo de frejol, comparación de Fibra Cruda (no tratado y tratado con el hongo)

TAMO DE FREJOL	Antes (%)	Después (%)
R1	64,93	64,21
R2	64,93	63,82
R3	64,93	61,11
R4	64,93	56,95
Media	64,93	62,27
Mediana	64,93	62,47
Desv. Estándar	0,00	2,07
Estándar Error	0,00	1,04

Fuente: La Autora

Tabla 21

Cascarilla de café, comparación de Fibra Cruda (no tratado y tratado con el hongo)

CASCARILLA DE CAFÉ	Antes (%)	Después (%)
R1	95,96	83,40
R2	95,96	82,29
R3	95,96	82,13
R4	95,96	80,53
Media	95,96	82,09
Mediana	95,96	82,29
Desv. Estándar	0,00	1,19
Estándar Error	0,00	0,59

Fuente: La Autora

Tabla 22

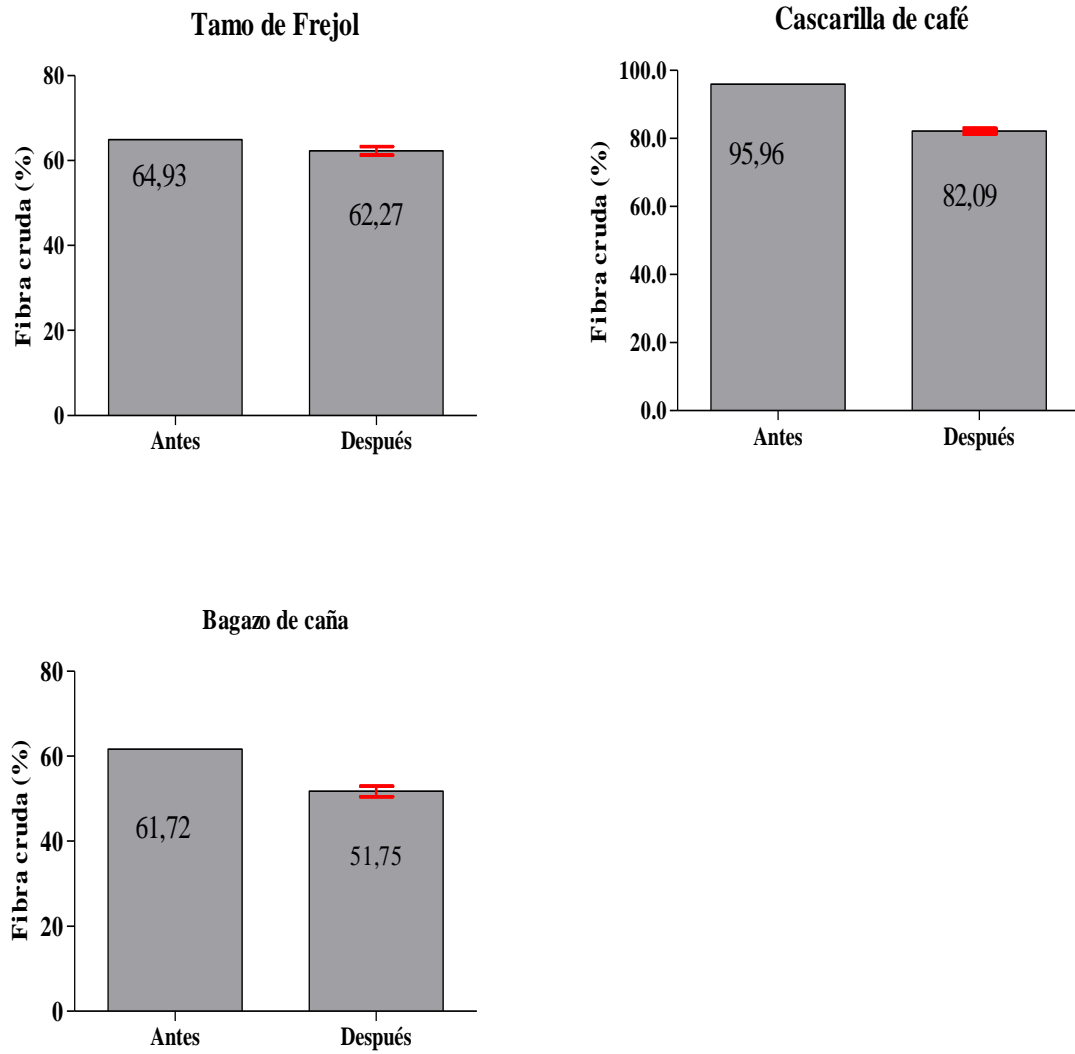
Bagazo de caña, comparación de Fibra Cruda (no tratado y tratado con el hongo)

BAGAZO DE CAÑA	Antes (%)	Después (%)
R1	61,72	54,48
R2	61,72	53,13
R3	61,72	49,71
R4	61,72	49,66
Media	61,72	51,75
Mediana	61,72	51,42
Desv. Estándar	0,00	2,44
Estándar Error	0,00	1,22

Fuente: La Autora

Anexo 6. Disminución de fibra cruda: comparación de los tres sustratos

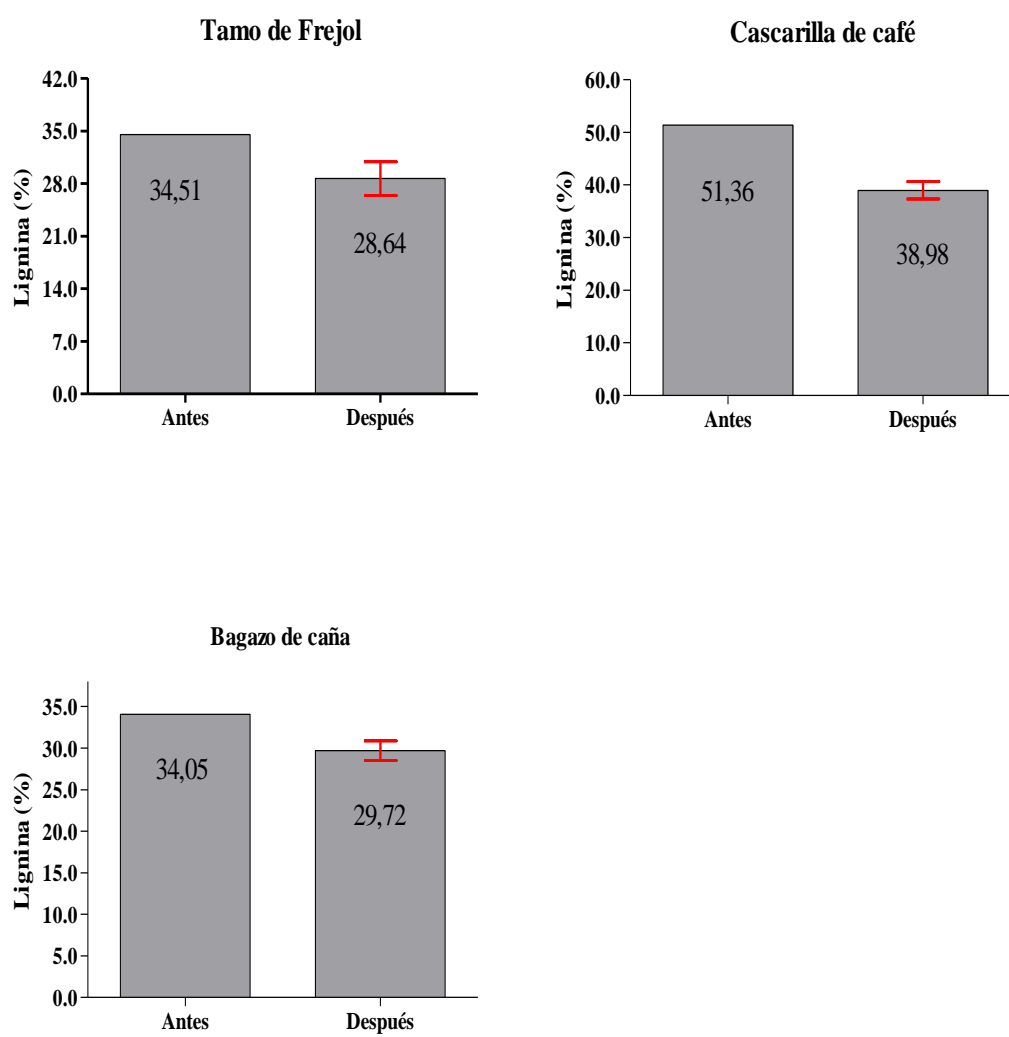
Tratados y no tratados con *T. asperellum*.



Fuente: La Autora

Anexo 7. Disminución de lignina: comparación de los tres sustratos

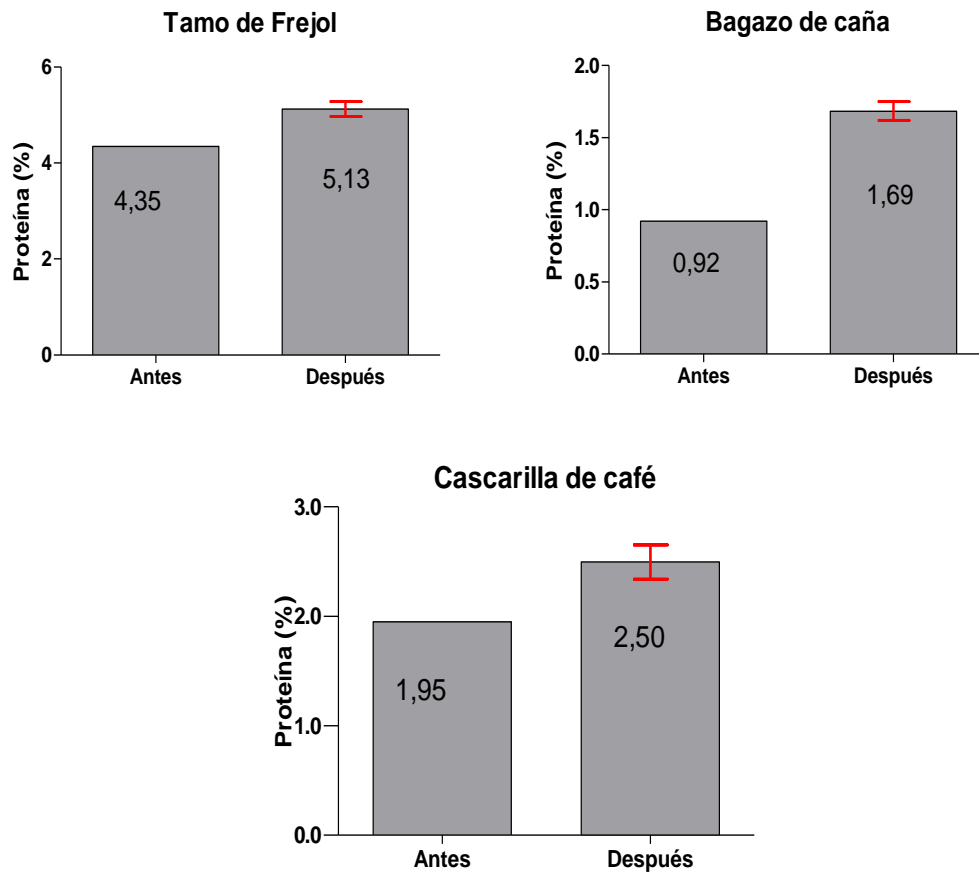
Tratados y no tratados con *T. asperellum*



Fuente: La Autora

Anexo 8. Incremento de proteína microbiana: comparación de los tres sustratos

Tratados y no tratados con *T. asperellum*.



Fuente: La Autora

Anexo 9. Crecimiento de *T. asperellum*


Tabla 23

Crecimiento de T. asperellum

Nº	Tiempo	Tamo de Frejol <i>x10⁸</i>	Cascarilla de Café <i>x10⁸</i>	Bagazo de Caña <i>x 10⁸</i>
1	6-jun-19	1,40	1,32	1,43
2	8-jun-19	0,11	0,01	0,06
3	10-jun-19	0,11	0,25	17,74
4	12-jun-19	1,77	11,78	21,14
5	14-jun-19	15,64	20,18	28,14
6	16-jun-19	15,34	19,52	28,64
7	19-jun-19	24,34	22,72	133,20
8	21-jun-19	27,16	163,80	119,20
TOTAL		85,87	239,57	349,55

Fuente: La Autora

Anexo 10. Invitación a la Socialización.



UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR SEDE IBARRA
ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES

Le extienden la más cordial Invitación a la socialización del trabajo de investigación:
"Trichoderma asperellum en el enriquecimiento proteico de residuos lignocelulósicos"
cuyo autor es la señora Aracely Estefanía Pozo Enriquez, de la carrera de Ing. Ciencias Ambientales y Ecodesarrollo.

Fecha: 8 de agosto del 2019
Lugar: Laboratorio de Biotecnología de la PUCESI
Hora: 10H00

RESUMEN

En la investigación se aprovechó tres residuos agroindustriales que a la vez son materiales lignocelulósicos que están compuestos por lignina, hemicelulosa y celulosa; estos materiales son Tamo de frejol, cascarilla de café y bagazo de caña. Estos mismo se los utilizo para el enriquecimiento proteico por Fermentación en estado sólido por medio del hongo filamentoso *Trichoderma asperellum*. En donde se colocó 100g de este material con una misma dosis de concentración de hongo para cada tratamiento durante 21 días y a los 21 se evaluó la proteína microbiana generada por el hongo.

Anexo 12. Encuestas.



PROCESO DE SOCIALIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN

El siguiente cuestionario nos permitirá implementar mejoras constantes en los procesos de socialización de trabajos de investigación por favor háganos llegar sus comentarios y sugerencias:

FECHA	08/05/2019
EXPOSITOR	Aldely Estefanía Ibaño Enriquez
LUGAR	DENTRO PUCESI
	FUERA PUCESI

NOTA IMPORTANTE: Por favor conteste las preguntas según la siguiente escala:

5. MUY ALTO / 4. ALTO / 3. MEDIO / 2. BAJO / 1. NULO

DETALLE DE VALORACIÓN	1	2	3	4	5
ORGANIZACIÓN DEL EVENTO DE SOCIALIZACIÓN					
1. ¿Considera usted que la sala donde se desarrolló este evento brindó las comodidades necesarias?					✓
2. ¿Considera usted que el material audiovisual utilizado en la presentación fue adecuado?					✓
EJECUCIÓN DEL EVENTO POR PARTE DEL EXPOSITOR					
3. ¿Considera usted que el expositor mostró dominio del tema?					✓
4. ¿Estima usted que el manejo del auditorio por parte del expositor fue adecuado?					✓
5. ¿Considera usted que el expositor demostró facilidad de expresión?					✓
MEDICIÓN DE IMPACTO DE LA INVESTIGACIÓN					
6. ¿Considera usted que el tema investigado posee relevancia para algún actor y/o sector de la sociedad?					✓
7. ¿Considera usted que esta investigación posee perspectivas para estudios complementarios posteriores?					✓
8. ¿Considera usted que el tema investigado genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización, empresa pública o privada, comunidad o institución?					✓
9. ¿En función de los objetivos planteados expuestos en la investigación, considera usted que éstos se cumplieron?					✓
REALICE UN COMENTARIO O SUGERENCIA PARA LOS ORGANIZADORES DE ESTE EVENTO					
Reportar los resultados obtenidos para el público					
MENCIONE USTED OTRAS PROBLEMÁTICAS QUE A SU PARECER PODRÍAN SER INVESTIGADAS Y QUE POSEAN IMPORTANCIA PARA ALGÚN ACTOR Y/O SECTOR DE NUESTRA COLECTIVIDAD					
Dar continuidad con investigaciones del tema.					
INSTITUCIÓN U ORGANIZACIÓN A LA QUE PERTENECE EL ENCUESTADO					

Anexo 13. Lista de Asistencia

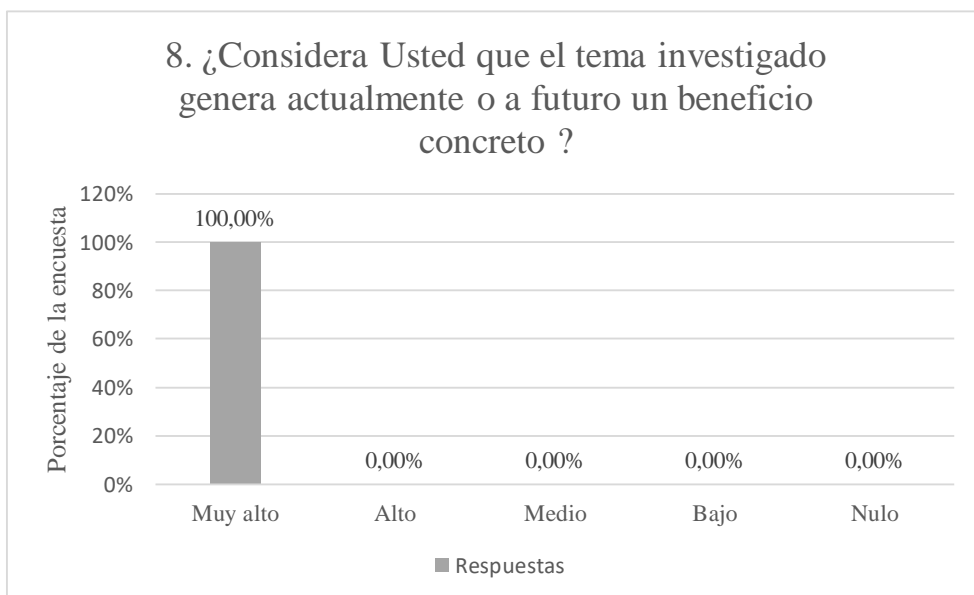
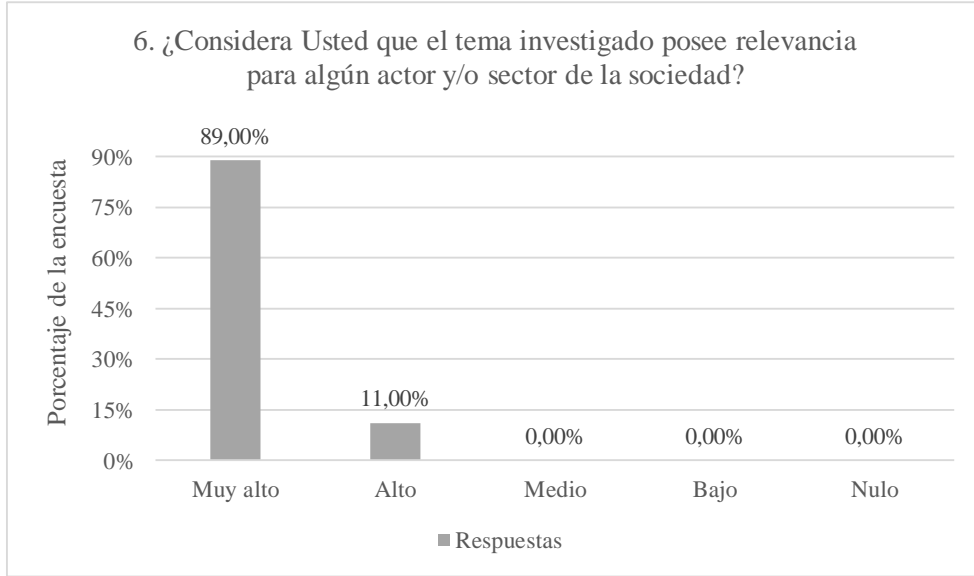


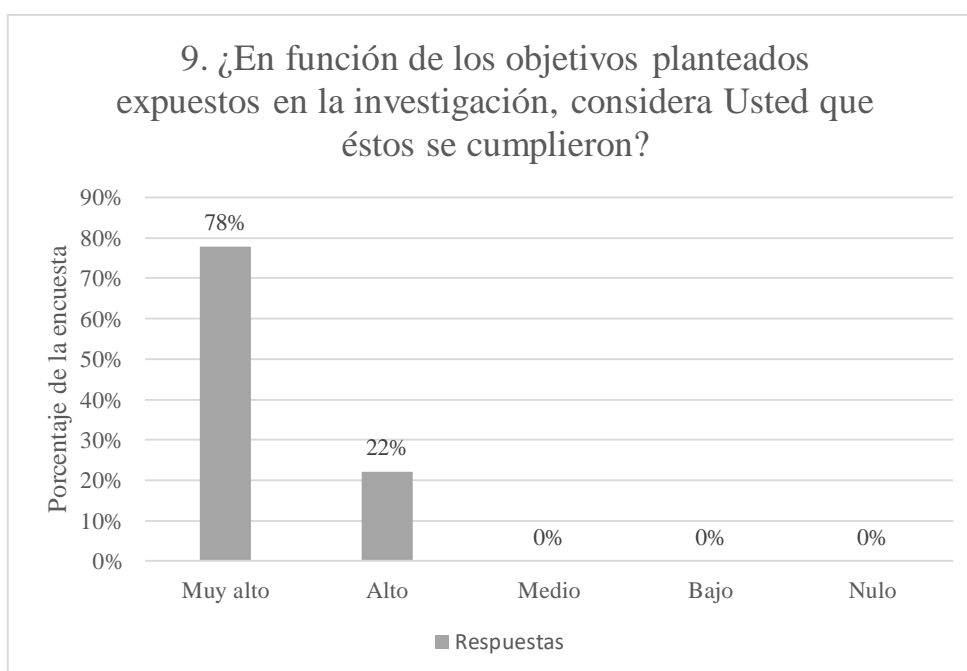
LISTA DE ASISTENCIA A SOCIALIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN

NOMBRE DEL EXPOSITORES: Aracely Pozo, Esther Chalán
CARRERA: Ciencias Ambientales y Ecodesarrollo
FECHA: 08/08/2019

NOMBRE ASISTENTE	NÚMERO DE CÉDULA	INSTITUCION A LA QUE REPRESENTA	FIRMA
Santiago Mafía	1002658399	PUCESI	<i>[Firma]</i>
Rubén del Pozo	175754449-1	PUCESI	<i>[Firma]</i>
César Zuleta	1001037546	PUCESI	<i>[Firma]</i>
Moraima Méndez	100174332-1	PUCE-SI	<i>[Firma]</i>
Edwin Del Pozo	100756566	ECAA-PUCEI	<i>[Firma]</i>
Diego Mejía	100797296-7	ECAA	<i>[Firma]</i>
Marily Espinosa	1102526082	ECAA	<i>[Firma]</i>
Edmundo Recalde	1001774494	ECAA	<i>[Firma]</i>
Daño Sanguano Coronel	800320907-7	ECAA - PUCESI	<i>[Firma]</i>

Anexo 14. Análisis de la tabulación de los resultados obtenidos en las encuestas.





Anexo 15. Datos base del experimento.

Tabla 24

Datos base del experimento/ Análisis Físico-Químico de la materia prima.

Parámetro	Unidades	Tamo de frejol (TF)	Cascarilla de café (CC)	Bagazo de Caña (BC)
pH	Unidades de pH	6,80	5,09	6,50
Humedad	%	8,83	9,49	9,62
Energía	cal.g ⁻¹	3920,72	4340,57	4034,37
Cenizas	%	0,03	0,38	2,93
Materia seca	%	91,17	90,51	90,38
Fibra cruda	%	64,93	95,96	61,72
Lignina	%	34,51	51,36	34,05
Proteína	%	4,35	1,95	0,92