

# UNEMI

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

REPÚBLICA DEL ECUADOR

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

INFORME DE INVESTIGACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

**MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**

TEMA:

**INCREMENTO DEL CONTENIDO DE PROTEÍNAS EN LA CÁSCARA DE  
BANANO MEDIANTE FERMENTACIÓN FÚNGICA EN FASE SÓLIDA.**

Autor:

**Ing. KLEBER ENRIQUE VILLA MACHUCA**

Tutor:

**Dr. Simón Pérez-Martínez**

*Milagro, 2024*

## Derechos de autor

**Sr. Dr.**

**Fabricio Guevara Viejó**

Rector de la Universidad Estatal de Milagro

Presente.

Yo, **Kleber Enrique Villa Machuca** en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de este informe de investigación, mediante el presente documento, libre y voluntariamente cedo los derechos de Autor de este proyecto de desarrollo, que fue realizada como requisito previo para la obtención de mi Grado, de Magister en Biotecnología, como aporte a la Línea de Investigación **Desarrollo productivo** de conformidad con el Art. 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, concedo a favor de la Universidad Estatal de Milagro una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos. Conservo a mi favor todos los derechos de autor sobre la obra, establecidos en la normativa citada.

Así mismo, autorizo a la Universidad Estatal de Milagro para que realice la digitalización y publicación de este Informe de Investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

El autor declara que la obra objeto de la presente autorización es original en su formade expresión y no infringe el derecho de autor de terceros, asumiendo la responsabilidad por cualquier reclamación que pudiera presentarse por esta causa y liberando a la Universidad de toda responsabilidad.

Milagro, 7 mayo 2024



**Kleber Enrique Villa Machuca**

**0705895787**

## Aprobación del Tutor del Trabajo de Titulación

Yo, **Simón Pérez-Martínez**, en mi calidad de tutor del trabajo de titulación, elaborado por **Kleber Enrique Villa Machuca**, cuyo tema es **INCREMENTO DEL CONTENIDO DE PROTEÍNAS EN LA CÁSCARA DE BANANO MEDIANTE FERMENTACIÓN FÚNGICA EN FASE SÓLIDA**, que aporta a la Línea de Investigación **Desarrollo productivo**, previo a la obtención del Grado Magister en Biotecnología, Trabajo de titulación que consiste en una propuesta innovadora que contiene, como mínimo, una investigación exploratoria y diagnóstica, base conceptual, conclusiones y fuentes de consulta, considero que el mismo reúne los requisitos y méritos necesarios para ser sometido a la evaluación por parte del tribunal calificador que se designe, por lo que lo **APRUEBO**, a fin de que el trabajo sea habilitado para continuar con el proceso de titulación de la alternativa de Informede Investigación de la Universidad Estatal de Milagro.

Milagro, **9 febrero 2024**



**Dr. Simón Pérez-Martínez**  
**Cl.: 0998997233**

**VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**  
**DIRECCIÓN DE POSGRADO**  
**CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA**

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**, presentado por **ING. VILLA MACHUCA KLEBER ENRIQUE**, otorga al presente proyecto de investigación denominado "INCREMENTO DEL CONTENIDO DE PROTEÍNAS EN LA CÁSCARA DE BANANO MEDIANTE FERMENTACIÓN FÚNGICA EN FASE SÓLIDA.", las siguientes calificaciones:

TRABAJO ESCRITO	58.83
SUSTENTACIÓN	36.50
PROMEDIO	95.33
EQUIVALENTE	Muy Bueno



LUIS EDUARDO CAGUA  
MONTANO

Mgs CAGUA MONTAÑO LUIS EDUARDO  
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



ALEX EDWIN GUILLEN  
BONILLA

Ing. GUILLEN BONILLA ALEX EDWIN  
VOCAL



CESAR STALIN GAVIN  
MOYANO

Mgs GAVIN MOYANO CESAR STALIN  
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

## DEDICATORIA

Tema de investigación dedicado a Dios por darme salud, fuerza y sabiduría para poder realizar el presente tema, rodearme de personas que brillan con luz propia.

A mi esposa Salome y mi princesa Marisu que con amor alegran mis días, pronto seremos una familia más grande con la bendición de Dios.

A Kiara y Mariasol mis bellas e inteligentes hermanas.

Mi padre y suegros que siguen enseñándome con el ejemplo. ¡Vamos por más!

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecimiento al programa de Becas Fortalécete Ecuador 2022 PUSAK por la ayuda brindada y poder realizar la presente maestría. Mis más sinceros agradecimientos al Dr. Simón Pérez por guiarme de forma correcta en la resolución del tema de investigación y los consejos brindados.

## Resumen

### INCREMENTO DEL CONTENIDO DE PROTEÍNAS EN LA CÁSCARA DE BANANO MEDIANTE FERMENTACIÓN FÚNGICA EN FASE SÓLIDA

En la intención de reducir el impacto ambiental negativo generado por el volumen de cáscara de banano (CB) en la fabricación de puré, se empleó la fermentación fúngica en fase sólida (FFS) para incrementar el contenido proteico del producto final. Esta idea se enmarca en la economía circular en Ecuador. En un ambiente fabril y séptico se realizaron al menos 14 FFS independientes, a partir de las cuales se aisló una cepa de *Penicillium* sp. capaz de colonizar masivamente las pilas de fermentación en condiciones altamente selectivas (pH 3 y CB como única fuente de carbono). Al inocular la cepa en una concentración de  $1 \times 10^8$  o, alternativamente, el 10% de una fermentación anterior, se logró una colonización de las pilas de 1kg con abundante micelio con cobertura homogénea sobre las pilas. En la práctica, esto permitió reducir la posibilidad de contaminación con otras especies de hongos o bacterias en un sistema de fermentación en fase sólida sin necesidad de esterilización. Según los datos obtenidos, el sistema de producción del banano (orgánico o convencional), tiene poca influencia en la dinámica de crecimiento *in vitro* de la cepa. El contenido de proteínas después de la FFS se logró triplicar (de 0.5 a 1.5 mg proteínas g producto<sup>-1</sup>). Sin embargo, los niveles proteicos son bajos en comparación con el potencial teórico si toda la biomasa vegetal se convirtiera en biomasa fúngica, según la estimación I cultivar otras tres especies fúngica (*A. oryzae*, *A. niger* y *S. cerevisiae*).

**Palabras claves:** fermentación fúngica en fase sólida, cáscara de banano, *Penicillium*

## Abstract

### INCREASE OF PROTEIN CONTENT IN BANANA PEEL THROUGH FUNGAL FERMENTATION IN SOLID STATE

To reduce the negative environmental impact generated by the volume of banana peel (CB) in the manufacture of puree, solid phase fungal fermentation (FFS) was used to increase the protein content of the final product. This idea is part of the circular economy in Ecuador. In a factory and septic environment, at least 14 independent FFS were carried out, from which a strain of *Penicillium sp.* was isolated. capable of massively colonizing fermentation piles under highly selective conditions (pH 3 and CB as the only carbon source). By inoculating the strain at a concentration of  $1 \times 10^8$  or, alternatively, 10% of a previous fermentation, colonization of the 1kg piles was achieved with abundant mycelium with homogeneous coverage on the piles. In practice, this allowed us to reduce the possibility of contamination with other species of fungi or bacteria in a solid phase fermentation system without the need for sterilization. According to the data obtained, the banana production system (organic or conventional) has little influence on the in vitro growth dynamics of the strain. The protein content after FFS was tripled (from 0.5 to 1.5 mg protein g product<sup>-1</sup>). However, protein levels are low compared to the theoretical potential if all plant biomass were converted to fungal biomass, as estimated by cultivating three other fungal species (*A. oryzae*, *A. niger* and *S. cerevisiae*).

**Key words:** solid state fungal fermentation, banana peel, *Penicillium*

## Índice / Sumario

<i>Introducción</i> .....	1
<b>CAPÍTULO I: EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	2
1.1 Planteamiento, delimitación y formulación del problema .....	2
1.2 Objetivos de investigación .....	3
1.3 Justificación, alcance y limitaciones.....	5
<b>CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO REFERENCIAL</b> .....	8
2.1 Contenido teórico que fundamenta la investigación .....	8
Bioeconomía circular.....	8
Desafíos del monocultivo de camarón .....	11
2.2 Antecedentes de la investigación .....	13
Los hongos como agentes de conversión de la biomasa.....	14
Fermentación fúngica en fase sólida y proteína unicelular como alimento para humanos y animales .....	17
Usos de <i>Penicillium spp.</i> en fermentaciones en fase sólida .....	21
<b>CAPÍTULO III METODOLOGÍA</b> .....	23
3.1 Aislamiento e identificación de cepas nativas en biomasa. ....	23
3.2 Caracterización de la velocidad de crecimiento. ....	24
3.3 Estandarización del troceado de la biomasa para la fermentación en fase sólida .....	25
3.4 Determinación del contenido de proteínas en fermentación de 1 kg de biomasa.....	25
<b>CAPÍTULO IV: ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS</b> .....	27
4.1 Cepas nativas en biomasa .....	27
4.2 Velocidad de crecimiento de la cepa aislada.....	28
4.3 Fermentación de 1 kilogramo de cáscaras .....	30
4.4 Contenido de proteínas. ....	32
<b>CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	36
5.1 Conclusiones.....	36
5.2 Recomendaciones.....	37
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	38
<b>ANEXOS</b> .....	46

## Introducción

Este trabajo de investigación está motivado por la necesidad de reducir el impacto ambiental negativo que generan los residuos (cáscara de banano) de una industria productora de puré, así como por la intención de convertir los residuos en un producto de alto valor agregado, como sería su aprovechamiento como suplemento alimentario para la acuicultura. Todo dentro de un contexto sociopolítico y económico orientado a una economía circular en Ecuador<sup>1</sup>.

La investigación se realizó desde la propia industria, incluyendo espacios y personal, con el apoyo de investigadores externos. En este contexto, era necesario el aprendizaje en microbiología técnica, estrategias de investigación y, sobre todo, en la robustez del proceso de investigación a desarrollar. En la industria, dada su naturaleza lucrativa, la investigación debe “ir al seguro” por lo que se mantuvieron las variables al mínimo, pero que generarán la confianza suficiente para avanzar con la meta de lograr un producto rentable.

El documento está estructurado en base a tres objetivos que pretendían. Primero, aislar y purificar una cepa fúngica nativa que pudiera colonizar la cáscara de banano en fermentación en fase sólida. Segundo, se quisieron definir varias condiciones para la fermentación donde la cepa seleccionada pudiera predominar en condiciones altamente selectivas sobre la microbiota predominante en las instalaciones de la fábrica (especialmente los hongos). Finalmente, se determinó el contenido de proteínas posterior a la fermentación en las condiciones definidas en el 2do objetivo.

La Metodología, los Resultados y las Conclusiones son coherentes en su presentación con los tres Objetivos específicos mencionados antes. Los aprendizajes logrados y el trabajo experimental realizado permitieron hacer las Recomendaciones, más en el sentido manifestar lo que falta por conocer para escalar a una fermentación en fase sólida (FFS) a 1 TM.

---

<sup>1</sup> Ecuador camina firme en la ruta de la economía circular <https://www.produccion.gob.ec/ecuador-camina-firme-en-la-ruta-de-la-economia-circular/>

## CAPÍTULO I: EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

### 1.1 Planteamiento, delimitación y formulación del problema

La biomasa de banano y plátano a menudo no se aprovechan en todo su potencial (Fiallos-Cárdenas et al., 2022; Hikal et al., 2022), especialmente en la industria alimentaria como la fabricación de compota dada la naturaleza propia de la industria. Esta investigación se motiva por la acumulación de cáscaras de banano como desecho de la fabricación de puré de banano en un orden de 9 TM h<sup>-1</sup> (ver anexo 1) y pretende aprovechar el contenido nutricional de la cáscara, especialmente en su fase de madurez, como sustrato para el crecimiento de hongos (Prayekti et al., 2023).

La acumulación de biomasa en la industria alimentaria se convierte tanto en un problema ambiental como en un potencial biorrecurso. Se han propuesto varios aprovechamientos como bioabsorbente de contaminantes en forma de polvo de la cáscara (Farias et al., 2023). El polvo de cáscara de plátano para la sorción eficiente de contaminantes de azul de metileno, atrazina y glifosato fue demostrado previamente con alto potencial de descontaminación de aguas (Farias et al., 2023). La pirólisis para la producción de biocarbón (*biochar*) a partir de cáscara (Sial et al., 2019) permitió observar efectos beneficiosos sobre las emisiones de GEI y las propiedades bioquímicas del suelo al reducir el CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> y N<sub>2</sub>O acumulados, en comparación a la enmienda del suelo con los residuos de cáscaras (Sial et al., 2019). Ambas aplicaciones están en fase experimental. La producción de enzimas como la celulasa es otra aplicación conocida, especialmente con *Aspergillus* spp. (Ferreira et al., 2016).

#### Delimitación

Esta investigación abordará aspectos básicos iniciales para la valorización de la biomasa residual mediante la fermentación. La idea es generar un nuevo bioproducto con alto valor agregado, en concreto, proteínas de alto valor nutricional para especies acuícolas como el camarón blanco (*Litopenaus vannamei*). A escala industrial, la fermentación sumergida es la estrategia preferida debido a las ventajas como una mejor homogeneidad y mejor control de las variables del proceso (Ferreira et al.,

2016)., sin embargo tiene largos tiempos de fermentación con baja producción en comparación a cuando se utiliza fermentación en fase sólida (FFS). La FFS con hongos tiene múltiples ventajas (Zwinkels et al., 2023) que puede producir una cantidad considerable de biomasa fúngica, mejorar la calidad de las proteínas de los vegetales, especialmente mediante la digestibilidad según la composición de aminoácidos esenciales.

En base a lo antes expuesto, la fermentación fúngica en fase sólida será la que inicialmente usaremos para abordar el problema definido anteriormente. Adicionalmente, dado que esta investigación se realiza desde la industria, y no desde una institución de investigación, los trabajos experimentales permitirán adquirir habilidades en la microbiología industrial a escala de 1 kg de biomasa.

## **Formulación**

¿Qué especie fúngica es la más abundante en un sistema de fermentación séptico de cáscara de banano y, al mismo tiempo, es capaz de incrementar el contenido proteico de la biomasa?

### **1.2 Objetivos de investigación**

#### **General:**

Incrementar el contenido de proteínas en cáscara de banano mediante fermentación en fase sólida empleando *Penicillium* sp..

#### **Específicos:**

1. Identificar un aislado fúngico exitoso en el crecimiento en condiciones fuertementación selectivas.
2. Definir unas condiciones de fermentación en fase sólida robustas sin necesidad de mantener condiciones asépticas o esterilización que permitan una colonización homogénea de la biomasa de cáscara de banano.
3. Determinar la dinámica del contenido de proteínas en los productos de la fermentación en fase sólida con *Penicillium* sp.

## Cuadro de operacionalización de las variables

El nivel de profundidad de esta investigación en cuanto al conocimiento que se pretende obtener del sistema de fermentación (objeto de estudio) es primordialmente descriptivo ya que las condiciones de fermentación (variable 2) usadas para este estudio son bastante peculiares (sepsis, condiciones altamente selectivas, etc.) por lo que se pretendió adquirir un conocimiento mínimo del sistema de fermentación. Las variables 1 y 2 determinarán lógicamente el comportamiento de la cantidad de proteínas (variable 3) resultado de la fermentación. En este contexto, y dado que no se pretende buscar causalidades entre las variables de interés, se considera que el uso de una hipótesis no tan útil en este caso, y que los objetivos de investigación definidos permitieron focalizar tanto los experimentos como la interpretación de los resultados obtenidos.

Objetivos	Variable	Dimensión	Indicador	Subindicadores
1	Aislado fúngico exitoso	Ecológica	Abundancia de la morfología única en las pilas de fermentación	-Dinámicas de crecimiento de la cepa seleccionada en diferentes medios
		Taxonómica	Pureza de espécimen fúngico aislado a partir de medios de enriquecimiento específicos	-Crecimiento fúngico en dilución seriada -Observaciones microscópicas de cultivo puro
2	Condiciones de fermentación robustas		-Diámetro de las colonias en placas Petri -Uniformidad de la biomasa micelial en la colonización de las pilas de fermentación	-Dinámicas de crecimiento micelial <i>in vitro</i> -Factores de fermentación ajustados a las condiciones de fermentación en fase sólida disponibles
3	Dinámica del contenido de proteínas		mg proteínas gramos fermento <sup>-1</sup>	

### 1.3 Justificación, alcance y limitaciones

#### Justificación

Esta investigación tiene un origen *bottom-up*, ya que las ideas y las soluciones han surgido de necesidades muy específicas, por lo que son contextualizadas a las condiciones y recursos disponibles en el entorno inmediato de la empresa (Henry & Hodson de Jaramillo, 2021). Además, vale destacar que no hay un apoyo explícito de las instituciones gubernamentales o académicas.

La justificación se puede centrar en tres aspectos: i) la contribución a la bioeconomía circular, ii) el aprovechamiento de residuos de la industria alimentaria y iii), contribuirá a la diversificación de fuentes de proteínas en el sector acuícola del Ecuador. La propuesta de investigación aborda la problemática del aprovechamiento de desechos en la industria alimentaria, concretamente la fabricación de puré de plátano y otros productos. Al incrementar el contenido de proteínas en la cáscara de plátano a través de la fermentación en fase sólida con *Penicillium sp.*, se convierte un subproducto en un recurso valioso para la producción de alimento animal en la acuicultura, cerrando así el ciclo de materiales y maximizando el uso sostenible de recursos. En los que se logra transformar estos residuos en una fuente alternativa y sostenible de proteínas, se reduce la contaminación ambiental y se promueve la economía circular (Fig. 1) entre dos sectores clave de la agroindustria nacional (acuicultura y bananero).

Otra connotación para destacar es la diversificación de fuentes de proteínas. La escasez de fuentes de proteínas sostenibles y crecientes es un desafío en la acuicultura nacional. Al desarrollar un método para el contenido de proteínas en la cáscara de plátano, se ofrecería una nueva alternativa alimenticia para el cultivo de camarón (u otras especies), disminuyendo la dependencia de la harina de pescado, cuya producción está relacionada con la sobreexplotación de recursos marinos. Este proceso se alinea con los principios de la bioeconomía circular, al promover el aprovechamiento de residuos, la producción sostenible y la reducción del impacto ambiental. La valorización de la cáscara de plátano mediante la fermentación puede generar nuevas oportunidades de negocio para la empresa, ya que sería una nueva línea de producción, así como aliviar la dependencia de las importaciones de insumos para la producción de camarón.

Por último, y no menos importante, esta investigación tiene el potencial de desarrollar

nuevas tecnologías, especialmente si se logra la producción de bioproductos de alto valor agregado con alto precio en el mercado a partir de residuos agroindustriales.

### **Alcance**

La presente investigación la consideramos exploratoria, en el sentido de que se usan muchos tratamientos y pocas réplicas. Se ha utilizado este enfoque para obtener información general sobre el proceso de fermentación fúngica en fase sólida en el contexto de la fábrica. Se apeló a su flexibilidad en el uso de diversas técnicas de recolección y lo análisis de datos. Especialmente en lo referente a las fermentaciones en condiciones sépticas.

En términos generales, esta estrategia metodológica se justifica por la necesidad de explorar un amplio rango de variables, si consideramos que se inicia desde cero un nuevo proceso en una industria que no centra su conocimiento en la microbiología técnica. Por la misma razón, habían limitaciones de tiempo y recursos disponibles para obtener suficientes unidades de observación y satisfacer un diseño estadístico formal.

Debe quedar claro, que este proyecto solo pretende observar y documentar los principios básicos de la FFS en un entorno relevante. Es lo que correspondería al TRL 1, según la clasificación de 9 grados de la NASA<sup>2</sup> (TRL por sus siglas en inglés, Technology Readiness Level) para evaluar la madurez de una tecnología. Este modelo define 9 etapas que van desde la investigación básica hasta la aplicación comercial de la tecnología.

Al mismo tiempo, será una investigación experimental ya que comprende la identificación y evaluación de un aislado de *Penicillium sp.* con capacidad para crecer eficientemente en condiciones de fermentación en fase sólida utilizando cáscara de plátano como única fuente de carbono. Se realizarán experimentos para determinar las condiciones óptimas de fermentación que permitan una colonización homogénea de la biomasa sin requerir condiciones asépticas o esterilización. El estudio del contenido de proteínas en los productos de la fermentación proporcionará información crucial sobre la viabilidad y el potencial de aplicación de este método, pero solo contextualizado en la

---

<sup>2</sup> HORIZONTE 2020 – PROGRAMA DE TRABAJO 2014-2015 Niveles de preparación tecnológica (TRL) [https://ec.europa.eu/research/participants/data/ref/h2020/wp/2014\\_2015/annexes/h2020-wp1415-annex-g-trl\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/research/participants/data/ref/h2020/wp/2014_2015/annexes/h2020-wp1415-annex-g-trl_en.pdf)

industria concreta, por lo que no se pretenden generalizaciones para la optimización de la producción de proteínas (ver limitaciones).

### **Limitaciones**

El presente estudio evaluó la FFS de *Penicillium* sp. en cáscara de banano maduro a escala de 1 kg, procurando unas condiciones de fermentación altamente selectivas para un hongo con un pH inicial de 3 y la cáscara de banano como única fuente de carbono. Estas simples condiciones nos permiten asumir un sistema robusto, una vez que se logra el crecimiento monoséptico en la fermentación.

Sin embargo, la conversión de los glúcidos y, por tanto, el rendimiento de biomasa fúngica podría haber sido mayores si el pH, la relación C/N, los suplementos de vitaminas y minerales, o la aireación se hubieran adaptado durante el curso del cultivo del hongo. Los resultados de los análisis de los datos se muestran sin un análisis estadístico inferencial, esto se debió a la naturaleza exploratoria de la investigación. Algunos experimentos se repitieron con las mismas condiciones, en otras oportunidades se variaron las condiciones a fin de avanzar en obtener una respuesta, pero sacrificando un diseño experimental informativo. Los resultados contenidos en esta tesis han permitido desarrollar fermentaciones de 10 kg (fuera del alcance de esta tesis) con resultados mejorados, a pesar de las limitaciones señaladas. Por tanto, los resultados y conclusiones derivados de este estudio pueden no ser representativos a nivel nacional o de otras condiciones experimentales.

## CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

### 2.1 Contenido teórico que fundamenta la investigación

#### Bioeconomía circular

El objetivo de la economía circular es preservar el valor de los materiales y productos durante el mayor tiempo posible, evitando enviar de regreso a la naturaleza la mayor cantidad de desechos que sea posible y logrando que estos se reintegren al sistema productivo para su reutilización (de Miguel et al., 2021). De esta forma, se reduce la generación de residuos al mínimo y se cierra su ciclo de vida, de modo tal que los residuos no sean vistos como desechos sino como recursos.

El modelo de economía circular propuesto por la Fundación Ellen MacArthur se concibe como círculos que varían según los tipos de beneficios a partir de las acciones (Fig. 1). Los mayores beneficios radican en las R (reutilización, reparación, redistribución y remanufactura), más que en las actividades de reciclaje y recuperación de energía. Esto se debe a las pérdidas durante la recolección y el procesamiento, y a la degradación de la calidad de los materiales durante su reciclaje (de Miguel et al., 2021). El modelo sugiere que lo ideal es maximizar el número de veces que se pueden usar los materiales. El alargamiento del ciclo de vida evita el consumo de material, energía y mano de obra necesarios para crear un nuevo producto.

La bioeconomía promueve la producción y utilización intensiva del conocimiento sobre los recursos (animales, plantas, microorganismos y biomasa derivados incluyendo desechos orgánicos), procesos y principios biológicos, para el suministro sostenible de bienes y servicios en todos los sectores económicos (Henry & Hodson de Jaramillo, 2021). Una bioeconomía sostenible y ecoeficiente es el segmento renovable de la economía circular (Fig. 1 mariposa) que permite aprovechar la biomasa primaria y los productos, hasta incluso los desechos para convertirlos en recursos valiosos, reducir la contaminación y contribuir a la

restauración de ecosistemas.

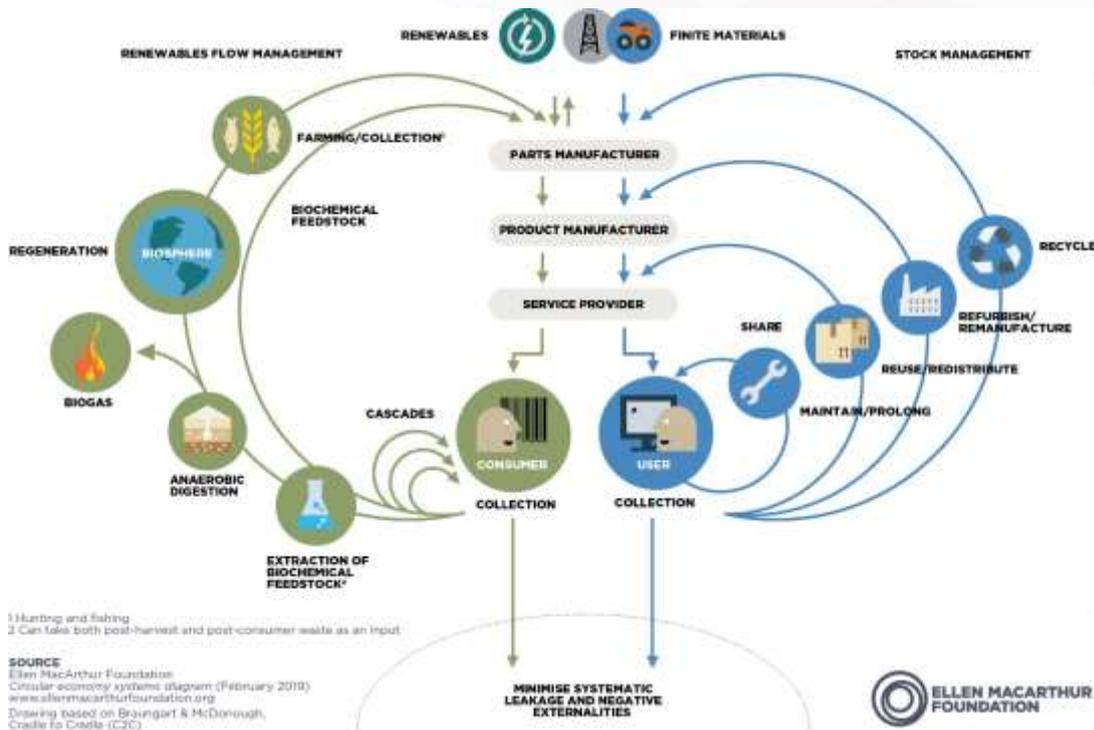


Figura 1. Diagrama de la mariposa para visualizar la economía circular en términos de los ciclos biológico y técnico.

El plátano es una fruta comestible perteneciente al género *Musa* (*Musaceae*), cultivada en regiones tropicales y subtropicales. Las cáscaras de plátano se utilizan como alimento complementario para el ganado en sus zonas de cultivo. El cultivo del plátano (*Musa spp.*) es exclusivamente tropical (Price, 1995) y se consume cocido (plátano) en parte importante de los países tropicales de Asia, África y Latinoamérica y, además, como fruta a nivel mundial (banana). Los destinos principales para la exportación de banano son Norteamérica y Eurasia. El plátano de postre tiene una distribución mundial. La producción de banano a nivel mundial está dominada por el subgrupo de bananos Cavendish. Sus enormes subproductos (pseudotallo, raquis y hojas) son una excelente fuente de materias primas de alto valor para otras industrias mediante el reciclaje de desechos agrícolas (Hikal et al., 2022).

El término biomasa se refiere a todo material orgánico biodegradable derivado de plantas, animales, o microorganismos, que tiene potencial de uso como fuente de

energía renovable y/o bioproductos. En nuestro caso la cáscara de banano resultado del proceso de producción de puré, la cual se pretende transformar en biomasa fúngica como suplemento alimentario o sustituto de la harina de pescado. La cáscara de banano es la cubierta exterior del fruto del plátano. Uno de los procesos de conversión de la biomasa es la fermentación, sin embargo, en términos generales, en Ecuador su utilización se concibe con mayor potencial para la obtención de energía (Peláez Samaniego et al., 2015), y no para generar productos o aplicaciones en la alimentación animal. Sin embargo, existen reportes de uso como alimento para animales, aunque, existen algunas preocupaciones sobre el efecto del tanino en las cáscaras en los animales que lo consumen (Emaga et al., 2007). Las cáscaras de plátano también se utilizan como ingrediente para cocinar, purificar el agua, fabricar muchos productos bioquímicos y producir desechos inorgánicos (Babatunde, 1992).

Se sabe que las cáscaras de banano contienen una cantidad sustancial de proteínas, lípidos, carbohidratos, fibra y una serie de minerales esenciales como potasio, sodio, calcio, hierro y manganeso (Emaga et al., 2007). Ya se ha informado que las cáscaras de banano podrían procesarse como medio micológico para el crecimiento (Akinyele & Agbro, 2007; Amara & El-Baky, 2023), enriqueciendo el contenido de proteínas y ácidos grasos de la mezcla sólida. El contenido de proteína de la cáscara de plátano aumentó hasta un 34 % mediante fermentación en estado sólido (FES) por *Aspergillus niger*, *A. flavus* y *Penicillium sp.* (Akinyele & Agbro, 2007). La mejora del valor nutricional de los residuos de banano mediante la fermentación microbiana es un paso importante para crear materia prima de alta calidad nutricional a partir de materiales de baja calidad, incluso comparable a la harina de soya, que es un ingrediente común en la mayoría de los alimentos para animales (Padam et al., 2012).

En las industrias procesadoras de alimentos, luego de la utilización de la pulpa de la fruta, se genera una gran cantidad de desechos en forma de hojas, pseudotallos, tallos y cáscaras. Entre estos, la cáscara de plátano constituye la mayor parte de la fruta (300 - 40% del peso) de una fruta fresca (Pathak et al., 2016). Esta enorme cantidad de residuos generados ha dado lugar al nuevo problema de la gestión de los residuos sólidos y su eliminación segura. Los vertederos han sido el método

más común para la eliminación estos desechos, pero en algunos casos se prefiere la quema al aire libre. Estos métodos de eliminación de la cáscara de banano causan graves problemas ambientales (Pathak et al., 2016). Desde una perspectiva medioambiental, es importante reutilizar cáscara de banano y explorarlo como materia prima potencial para producir una variedad de productos con valor agregado. Esto ayudaría a reducir la carga sobre la ecología y contribuiría a la economía mundial.

Un estudio de la composición química de seis variedades de cáscaras de frutos de banano y plátano [plátano de postre (Musa AAA), plátano (Musa AAB), plátano de cocción (Musa ABB) e híbrido (Musa AAAB)] en tres estados de madurez mostró que las variedades no afectaron los constituyentes químicos de manera consistente de la cáscara (Emaga et al., 2007). El contenido de proteína en la cáscara del plátano y del plátano fue, según el trabajo anterior, del 8 al 11%, el potasio el elemento mineral más importante, y se explicó el aumento de azúcares solubles por la degradación del almidón bajo la acción de enzimas endógenas del fruto.

### **Desafíos del monocultivo de camarón**

Ecuador se encuentra entre los principales productores de camarón de cultivo (Boyd et al., 2021). En 2018, este país produjo 510.000 toneladas métricas (t) de camarón patiblanco (*Litopenaeus vannamei*). Los otros líderes en producción de camarón de cultivo fueron China (1.760.000 t), Indonesia (708.680 t), India (620.000 t), Vietnam (475.000 t) y Tailandia (347.258 t). Ecuador, India, Indonesia, Tailandia y Vietnam son las principales fuentes de camarón de cultivo en el mercado internacional. La preocupación de que el uso excesivo de recursos y la degradación ambiental causada por la producción de alimentos estén poniendo en peligro la sostenibilidad del sistema alimentario mundial se extiende a la producción acuícola y al cultivo de camarón en particular. Se conoce que los impactos ambientales negativos de la acuicultura estaban asociados tanto con los impactos directos causados por la producción como con los impactos indirectos asociados con la adquisición de los recursos utilizados en la producción (p.ej. la fuente de proteínas) (Boyd et al., 2021).

La industria camaronera de Ecuador es ampliamente reconocida por su capacidad

para entregar al mercado internacional camarón blanco del Pacífico (*L. vannamei*) de alta calidad, cultivado en sistemas de producción sostenibles de baja densidad, a través de cadenas de suministro cortas (van der Pijl & Venneman, 2019). Al mismo tiempo, existe la preocupación de que el uso excesivo de recursos y la degradación ambiental causada por la producción de alimentos estén poniendo en peligro la sostenibilidad del sistema alimentario mundial se extiende a la producción acuícola y al cultivo de camarón en particular (Boyd et al., 2021). Según estos autores, los impactos ambientales negativos de la acuicultura estaban asociados tanto con los impactos directos causados por la producción misma, como por los impactos indirectos asociados con la adquisición de los recursos utilizados en la producción (como la harina de pescado).

La dieta del camarón suele tener un alto nivel de harina de pescado para satisfacer las necesidades de proteínas y aminoácidos. Sin embargo, los limitados recursos de harina de pescado no pueden sustentar la creciente industria de alimentos acuáticos y, por lo tanto, existe una tendencia inevitable a reducir el uso de harina de pescado y aumentar el uso de otras proteínas animales y vegetales en los alimentos para camarones (Yao et al., 2020). Las granjas camaroneras de Ecuador aplican alimento granulado para camarones que contenía entre 28,0 y 38,5 % de proteína cruda (Boyd et al., 2021). La concentración promedio de proteína utilizada en los estanques fue de  $33,3 \pm 0,48\%$  y varió poco entre provincias. Con este antecedente, los autores estimaron la cantidad de pescado utilizado en nacionalmente. Las tasas de inclusión de harina y aceite de pescado en los alimentos para camarones no son divulgadas por razones de propiedad intelectual por las fábricas de alimentos. Se sugiere una tasa de inclusión de harina de pescado en la alimentación del camarón ecuatoriano de alrededor del 6,62%. Los piensos para camarones en general probablemente contienen un promedio de 5% de harina de pescado procedente de la pesquería, porque muchos grandes productores de piensos utilizan harina de pescado elaborada con recortes del procesamiento del pescado. Como complemento se usa el aceite de pescado, el cual según Tacon y Metain (2008), citado por (Boyd et al., 2021), el alimento para camarones ecuatorianos contenía un promedio de 3% de aceite de pescado en 2006. Suponiendo que el alimento para camarones ecuatorianos tenga un promedio de 5,6% de harina de pescado y 2,5% de aceite de pescado proveniente de la pesquería de reducción, se acumularía un mayor uso de pescado silvestre que

solo para la harina de pescado. En resumen, el uso promedio de pescado silvestre en el alimento se calculó en 0,498 t/t de alimento de camarón.

En los últimos años, se han realizado esfuerzos sustanciales para reemplazar la harina de pescado por fuentes de proteínas vegetales en los alimentos para camarones (Soares et al., 2021), así como para otras especies de interés acuícola. Un sustituto proteico esencial es la harina de soja, ampliamente disponible y rentable, con un alto contenido de proteínas, buena digestibilidad y perfil de aminoácidos bien equilibrado, aunque también tiene un bajo nivel de metionina. En términos de nutrientes, el contenido de proteína cruda representa entre el 25% y el 50% del alimento para camarones y también es una de las constituciones más caras (Cummins et al., 2017). Sin embargo, la producción de harina de pescado ha estado estancada durante las últimas décadas y las capturas utilizadas para la producción de han disminuido debido al fenómeno de El Niño (Li et al., 2022), entre otros factores. En este contexto, el desarrollo de fuentes alternativas de proteínas se ha convertido en un tema urgente de abordar.

El uso promedio en Ecuador de pescado silvestre para harina y aceite de pescado incluidos en los alimentos fue de  $0,65 \pm 0,02$  t/t de camarón (Boyd et al., 2021). Las granjas aplican en promedio  $33,3 \pm 0,48\%$  (28,0 - 38,5 %) de proteína cruda en alimento granulado para camarones, con poca variación entre provincias a nivel nacional. (Yao et al., 2020) reportaron que la harina de pescado (18%) podría sustituirse entre 1/6 (17%) y 1/3 (33%) con harina de soja y harina fermentada, respectivamente. Esto evidencia que el recurso harina de pescado no es imprescindible y que puede ser sustituido, abriendo posibilidades para otras fuentes proteicas, como la fúngicas.

## **2.2 Antecedentes de la investigación**

Desde hace años, el interés de los científicos por los desechos agrícolas ha aumentado y los “desechos agrícolas” se han vuelto atractivos para explorarlos y aprovecharlos en un contexto de bioeconomía circular. El banano es un producto agrícola cuyos subproductos tienen varios usos convencionales y como residuos. Al mismo tiempo, (Padam et al., 2012; Yusuf et al., 2020) destacan los

subproductos (pseudotallos, frutos, hojas) como posibles recursos renovables en la promoción de la tecnología “verde” (producción de biocarbón con cáscara de banano), con un alto potencial alimentario y nutracéutico tanto para humanos como para animales. Se ha identificado que los subproductos del plátano son un sustrato económico potencial para la producción de enzimas celulolíticas, exoglucanasas, lacasa, levansucrasas, etc. A partir de varias especies de hongos en sistemas de FFS (Padam et al., 2012).

Durante su vida útil, una planta de banano produce un racimo de fruta, lo que produce alrededor de 200 millones de toneladas de desechos agrícolas en todo el mundo. Los desechos de plátano varían en composición, pero invariablemente contienen celulosa, hemicelulosas, lignina, almidón, azúcares, proteínas y minerales. El procesamiento comercial del plátano para la obtención de diversos productos produce grandes cantidades de cáscaras. La cáscara del plátano representa aproximadamente el 40% del peso total de la fruta y puede presentar un enorme problema medioambiental. La cáscara, al ser rica en hemicelulosas y polisacáridos de pectina, podría usarse para producir una variedad de subproductos, por ejemplo, polvo rico en fibra, que se puede agregar a diferentes productos de panadería y pasta (Evans et al., 2020). La pectina, como ingrediente de valor agregado, se ha extraído de la cáscara del plátano mediante diferentes métodos. Emaga et al. (2008), citados en el trabajo anterior, informaron que la cáscara de plátano de postre tenía mayor ácido galacturónico y un mayor grado de metilación que el subgrupo de plátano. La cáscara de plátano, debido a sus carbohidratos ricos en energía, es un buen sustrato para la producción de proteínas unicelulares para alimentos y piensos. Otro uso potencial de la cáscara de plátano incluye la producción de biogás en un digestor anaeróbico.

### **Los hongos como agentes de conversión de la biomasa**

Los hongos son conocidos descomponedores de desechos orgánicos y capaces de hidrolizar compuestos orgánicos complejos como fuente importante de energía (Dinishi Jayasinghe y Parkinson 2008). A consecuencia de esta capacidad se han informado de varios usos potenciales (medio de cultivos para hongos, biosorbentes, antioxidante, antimicrobiano, como fibra natural, etc.). (Prayekti et al., 2023) mostraron que los medios de cultivo microbiano en base a cáscara de banano

permitían crecimiento de varios hongos como *Candida albicans* (en 3% p/v), mientras que *Aspergillus fumigatus* creció de manera óptima en la variante del 2% (p/v) y *A. flavus* fue mejor en la variante del 1% (p/v). La capacidad del biosorbente de polvo de cáscara de plátano mostró ser eficiente para la sorción de contaminantes como el azul de metileno, atrazina y glifosato (Farias et al., 2023). El biosorbente mostró una eliminación del 66% de azul de metileno en 60 min, y eliminó el 91% y el 97% de los pesticidas de atrazina y glifosato después de 120 min. Las cáscaras de plátano han atraído la atención de los investigadores debido a sus componentes químicos bioactivos con actividades antioxidantes y antimicrobianas que pueden usarse como buenas fuentes de antioxidantes naturales y con fines farmacéuticos en el tratamiento de diversas enfermedades (Hikal et al., 2022). Por lo tanto, según los mismos autores, se puede utilizar subproductos del banano en diversas aplicaciones alimentarias y no alimentarias y fuentes de compuestos bioactivos naturales por parte de la industria alimentaria, farmacéutica y otras industrias.

Las fibras de la planta del banano son comparables en resistencia física y contenido de celulosa a las fibras obtenidas de otros subproductos fibrosos y se han caracterizado ampliamente a partir del tallo de su fruta, pseudotallo y hojas (Padam et al., 2012). Los autores destacan algunos estudios que enfatizan el potencial de las fibras de plátano como materia prima para la fabricación de tableros compuestos, para reforzar compuestos epoxi debido a que las fibras de plátano aumentaron sustancialmente la resistencia a la tracción del material epoxi virgen en un 40 %.

Entre los diversos grupos de microorganismos utilizados en la FFS, los hongos filamentosos son los más explotados debido a su capacidad para crecer en sustratos sólidos completos y a la producción de una amplia gama de valiosas enzimas extracelulares (Boberga et al. 2008). En una fermentación espontánea de la biomasa de cáscara de banano, el inóculo se origina por la carga microbiana presente en el ambiente o porque viene como endófito o en el filoplano. Posterior a la cosecha (poscosecha) uno de los factores bióticos que pueden ser fuente de hongos son también los propiamente patógenos. Los hongos patógenos son los microorganismos característicos que causan diversas enfermedades en el banano tanto durante la etapa de cultivo como de poscosecha. Entre ellos se han reportado *Fusarium spp.*, *Colletotrichum musae*, *Lasiodiplodia theobromae* que forman un complejo fúngico y

causan la pudrición de la corona (Kalia, 2020). La principal fuente de infección para ambos hongos es a través de las flores y las partes de las flores y las brácteas del último racimo, respectivamente. Las conidias se transfieren a través de la lluvia, de insectos o ascosporas esparcidas por el aire como agente de transmisión. Estos conidios germinan y forman apresorios inactivos hasta la llegada de la maduración del plátano.

No solo hongos, las bacterias están presente de manera natural en frutos de banano y el plátano, y pueden infectarse tanto con patógenos de deterioro como con microflora patógena humana debido a condiciones de almacenamiento defectuosas o prácticas antihigiénicas seguidas durante las fases de producción, procesamiento, envasado y almacenamiento. La identificación de las bacterias entéricas mediante tiras API-20E reveló la presencia de *Shigella sonnie* en la superficie del fruto junto con *Escherichia coli* (Abdullah et al., 2017). Los principales hongos causantes de deterioro identificados en el trabajo anterior fueron *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *C. musae*, *F. oxysporum*, *Mucor spp*, *L. theobromea* y *Rhizopus stolonifer*.

Aunque cada uno de los muchos procesos que incluyen fermentaciones es único y específico, se pueden encontrar algunos aspectos comunes para establecer las condiciones iniciales para un posible nuevo sistema de plataforma: costos de cultivo, fuente de carbono, condiciones estériles y volumen del fermentador. Una desventaja de la mayoría de los procesos de producción microbiana es la necesidad de técnicas estériles. A escala industrial, una esterilidad insuficiente puede convertirse en un obstáculo insuperable. Este fue el caso de la producción de etanol con *Zymomonas mobilis* de Pfeifer y Langen en Alemania, donde las bacterias del ácido láctico causaron problemas (Barig et al., 2011). Aunque la productividad, el rendimiento y la resistencia contra altas concentraciones de etanol de esta bacteria son mejores, la robustez del proceso de *Saccharomyces cerevisiae* fue una ventaja para dificultar su reemplazo hasta el día de hoy.

En un intento por desarrollar un sistema fúngico robusto que permita el crecimiento monoséptico con un mínimo de técnica estéril en barriles de plástico, se evitó la contaminación con bacterias (Barig et al., 2011). Las condiciones de crecimiento selectivo se lograron mediante un medio de sales minerales que contiene aceite de

colza en lugar de glucosa como única fuente de carbono y energía, según informaron los autores. Además, se ajustó el pH a 3. Una selección de hongos adecuados para ese sistema reveló que *Phialemonium curvatum* fue superior en comparación con otros cuatro aislados de hongos porque se encontraron altos títulos de esporas hidrófilas en la producción sumergida. En segundo lugar, la formación de biopelículas en segmentos de plástico o lechos móviles hizo que la recolección de biomasa fuera cómoda. En las condiciones probadas por (Barig et al., 2011) los cultivos con volúmenes de 100 o 350 L no mostraron contaminaciones por bacterias.

### **Fermentación fúngica en fase sólida y proteína unicelular como alimento para humanos y animales**

La cantidad y la pureza de cualquier residuo agrícola desempeñan un papel importante en su utilización. El nivel de impurezas en los residuos producidos en la granja, unidad de procesamiento o centro de recolección municipal varían en términos de cantidad y pureza. Los desechos agrícolas están disponibles en grandes cantidades en la zona de cultivo y están relativamente libres de impurezas. Los residuos del procesamiento de alimentos también están disponibles en grandes cantidades en la unidad de procesamiento y están libres de otras impurezas (Singh-Sogi, 2020). El efecto de alimentar con biomasa (puntas o tallos de plátano como componente forrajero de una dieta a base de melaza mostró que la eficiencia de utilización aumentó con un suplemento de proteína en la dieta. Esta dieta resultó adecuada para la alimentación de corderos, según Subramanian et al. (1988) citados por impurezas (Singh-Sogi, 2020). Singh-Sogi (2020) informó del crecimiento de la biomasa microbiana mediante la degradación del sustrato de desechos del banano a las 24, 36 y 48 horas de incubación. Por otro lado, el contenido de micronutrientes (Fe y Zn) de la cáscara era mayor en comparación con la pulpa, lo que la hacía más adecuada como ingrediente en la alimentación del ganado vacuno y de las aves de corral.

Para satisfacer la creciente demanda de proteínas sostenibles, se deben explorar nuevas fuentes con un menor impacto en el medio ambiente. Las fuentes alternativas de proteínas que actualmente son objeto de interés son las plantas, los hongos y los insectos. Estas fuentes de proteínas son conocidas por su impacto

considerablemente menor en el medio ambiente (Mogensen et al., 2020). En este contexto, la producción de fuentes de proteínas no animales de alta calidad para mantener o aumentar la seguridad alimentaria de manera sostenible es un requerimiento de la sociedad. La calidad de la proteína de la dieta es una medida que describe la eficiencia mediante la cual una fuente de proteína contribuye a satisfacer los requerimientos dietéticos relacionados con las proteínas. El objetivo principal de la ingesta de proteínas es satisfacer los requerimientos de aminoácidos para el mantenimiento, el crecimiento y otras funciones fisiológicas (Boye et al., 2012). La ingesta de proteínas de alta calidad es más eficaz para satisfacer estos requisitos, debido al alto grado de digestibilidad y a la composición de aminoácidos cercana a los requisitos.

La fermentación fúngica en estado sólido (FFS) tiene el potencial de mejorar en mayor medida la calidad de las proteínas de los alimentos vegetales, especialmente en lo referente a la lisina. Esta mayor mejora en la calidad de las proteínas se lograría mediante una mejora en la composición de aminoácidos, en combinación con una digestibilidad mejorada de las proteínas (Zwinkels et al., 2023). Varios estudios han dado una idea del potencial del FFS.

La proteína es sólo uno entre otros macronutrientes esenciales importantes en los productos alimenticios en acuicultura. Se han probado fuentes proteicas alternativas como plantas, insectos y bacterias (Li et al., 2022). La fermentación con hongos, otra fuente con alto potencial, no solo mejora el perfil de macronutrientes, como las proteínas, sino también el de micronutrientes, incluida la fibra dietética, los aminoácidos esenciales, las vitaminas y los minerales (Rousta et al., 2021). La digestibilidad de las proteínas de hongos es comparable a la de la carne de vacuno y la de la soya (Amara & El-Baky, 2023), además de tener un efecto significativo sobre el apetito, especialmente la saciedad. Sin embargo, incluso en pequeñas cantidades de inhibidores de proteasas en las dietas comerciales (balanceados) pueden influenciar negativamente la digestibilidad de las proteínas y la actividad proteolítica intestinal en especies acuícolas (Romarheim et al., 2008).

La FFS de harina de soja con *A. oryzae* redujo el factor antinutricional tripsina (Teng et al., 2012). Por otro lado, la FFS de bagazo de cerveza con *Neurospora intermedia*

o *Rhizopus oryzae* dio como resultado una mayor abundancia relativa de aminoácidos indispensables (Gmoser et al., 2020). Estos ejemplos muestran el potencial de la FFS como complementaria de la composición de aminoácidos de la biomasa fúngica con los alimentos vegetales, en particular los cereales. La composición de aminoácidos de la biomasa fúngica es baja en aminoácidos azufrados (como la cisteína y la metionina), mientras que los cereales suelen ser bajos en lisina (Kalman, 2014). Por lo tanto, una combinación de proteínas vegetales y fúngicas puede, en teoría, dar como resultado una composición de aminoácidos superior. Las investigaciones anteriores sobre la relación entre la fermentación y la calidad de las proteínas se centraron principalmente en la fermentación bacteriana. Este tipo de fermentación mejora la digestibilidad de las proteínas (Teng et al., 2012). Sin embargo, las fermentaciones bacterianas no producen suficiente biomasa y proteínas para alterar la composición de aminoácidos de los alimentos. En general, las fermentaciones fúngicas producen cantidades considerables de biomasa fúngica (Zwinkels et al., 2023). Esto implica que también en FFS se pueden producir cantidades considerables de proteína fúngica, lo que potencialmente conduce no sólo a una mejor digestibilidad de la proteína, sino también a alteraciones en la composición de aminoácidos.

La FFS con *A. oryzae* *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* incrementaron en 30–33% el contenido de los aminoácidos como la lisina (entre otros) en cebada y arroz (Zwinkels et al., 2023). Por otro lado, en el mismo trabajo se señala que, en general, el suministro de lisina es un factor crítico para determinar si las fuentes de proteínas de origen vegetal pueden aplicarse para alimentar al mundo de manera sostenible. Dado que la lisina es el aminoácido limitante tanto en el arroz como en la cebada, este aumento tiene un gran impacto beneficioso sobre la calidad de las proteínas en estos alimentos. Esto demuestra que esta técnica de procesamiento mínima, es decir, la fermentación fúngica en estado sólido puede mejorar sustancialmente la calidad de las proteínas y, por lo tanto, puede contribuir a una nutrición vegetal de mayor calidad de los alimentos básicos, la cebada y el arroz.

El término proteína unicelular (SCP por sus siglas en inglés) se refiere a cualquier proteína de fuentes microbianas en forma de biomasa o proteína extraída. Los SCP se producen con la intención de utilizarlos como sustitutos de alimentos ricos en proteínas (ya sean de origen vegetal o animal) para humanos y animales. Se utilizan

varios microorganismos y sustratos para producir SCP. Durante siglos, los microorganismos se han utilizado para la producción de alimentos para humanos y suplementos de alimentos para animales, pero el concepto SCP es moderno (Amara & El-Baky, 2023). En general, los microorganismos son únicos por su capacidad para mejorar el bajo contenido de proteínas de los alimentos fermentados (Bourdichon et al., 2012). Se utilizan varios microorganismos para la producción de proteínas unicelulares; bacterias (p. ej., *Rhodobacter capsulatus*), levaduras (p. ej., *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Candida utilis*, *Torulopsis glabrata* y *Geotrichum candidum*), algas (p. ej., *Spirulina* spp. (suplemento dietético) y *Chlorella* spp.) y hongos filamentosos (como *Aspergillus oryzae*, *Fusarium venenatum*, *Trichoderma* spp. y *Rhizopus* spp.) (Ritala et al., 2017). Los hongos filamentosos son fáciles de cosechar del medio de fermentación SCP y los hongos, incluidas las levaduras, también pueden proporcionar vitaminas del grupo B (Amara & El-Baky, 2023). Sin embargo, los hongos tienen sus limitaciones. Sus tasas de crecimiento y contenido de proteínas son más bajos en relación con otros microorganismos, con un contenido moderado de ácido nucleico que es demasiado alto para el consumo humano y sus necesidades, y se requieren pasos de procesamiento costosos adicionales para disminuirlo, y no son del todo aceptados por los consumidores (Ritala et al., 2017).

Hoy en día, existe un número importante de empresas que producen proteínas microbianas utilizadas en aplicaciones alimentarias. El número de patentes en la producción de proteínas microbianas refleja la demanda. Hüttner et al. (2020), citado por (Amara & El-Baky, 2023), informaron que de 324 patentes identificadas relacionadas con productos alimenticios, el 38% eran propiedad de las diez principales organizaciones. Los actores clave han sido DuPont (47 patentes), DSM (16 patentes), AB Enzymes (13 patentes), Novozymes (11 patentes) y Toray Industries (10 patentes). Un producto fúngico de SCP comercial es PEKILO (micoproteína de *Paecilomyces variotii*), que se utiliza como alimento para aves (Koivurinta et al., 1979), e incluso peces (Amara & El-Baky, 2023). Se desarrolló por primera vez en la década de 1960 para valorizar los flujos secundarios de la industria de la pulpa y el papel.

## Usos de *Penicillium spp.* en fermentaciones en fase sólida

El género *Penicillium* ha sido frecuente asociado al banano en varios estudios, en la producción de enzimas, como patógeno poscosecha, como biosorbente, etc. . *P. frequestans* se utiliza para la producción de  $\alpha$ -amilasa a partir de cáscaras de banano (Padam et al., 2012), *Penicillium spp.* relacionado con la duración de la vida útil del banano en postcosecha (Kalia, 2020). Varios estudios informaron que las especies de *Penicillium* pueden ser un candidato eficaz para remediar la contaminación por metales pesados y otros contaminantes industriales. *P. chrysogenum* fue encontrado como un candidato prometedor para la biorremediación *in situ* de suelos contaminados con Cd al disminuir sus disponibilidad en el suelo y aumentó el rendimiento de las plantas de *Brassica chinensis* (Srinivasan et al., 2020). Otros estudios citados por los mismos autores demostraron que *P. simplicissimum* eliminó eficazmente el cadmio, el zinc y el plomo de una solución acuosa, que *P. canescent* eliminó eficientemente la contaminación de iones cadmio, plomo, mercurio y arsénico de una solución acuosa mediante un proceso de biosorción. Por tanto, fue evidente el papel prometedor del *Penicillium* en la conversión de suelos contaminados con metales en suelos aptos para la agricultura de forma respetuosa con el medio ambiente.

Las cáscaras de plátano maduro (RPP) y de plátano inmaduro (UPP) se sometieron a FFS utilizando cultivos puros de tres aislados de hongos, a saber, *Aspergillus niger*, *A. flavus* y *Penicillium sp.* (Akinyele & Agbro, 2007). Después de siete días de fermentación *A. niger*, *A. flavus* y *Penicillium sp.* aumentaron el contenido de proteína cruda tanto de UPP (34, 30,3, 2,3 %, respectivamente) como de RPP ( 9,5, 4,5, 4,0%, respectivamente). Aunque la UPP fermentó con *Penicillium sp.* mostró el menor aumento porcentual en el contenido de proteína cruda después de siete días de fermentación, registró el mayor aumento porcentual (39,8%) cuando se permitió que la fermentación continuara durante 21 días. Otros resultados obtenidos por los autores en este trabajo indicaron que excepto en el RPP fermentado con *A. niger*, el contenido de azúcar mostró un aumento después de siete días de fermentación y el RPP fermentado con *A. flavus* registró el mayor aumento porcentual de 142,6%. Hubo una reducción correspondiente en el contenido de celulosa tanto de UPP como de

RPP, y la fermentación con RPP y *A. niger* mostró la reducción porcentual más alta del 300 %. La información disponible reveló que el valor nutricional de las cáscaras de plátano se incrementa mediante la fermentación utilizando *A. niger*, *A. flavus* y *Penicillium sp.*

Por otro lado, *Penicillium spp.* también produce micotoxinas que son metabolitos secundarios tóxicos producidos por hongos y vincula directamente la necesidad de identificar los microorganismos presentes en una fermentación. Las micotoxinas, metabolitos secundarios de los mohos almacenados, han recibido cada vez más atención debido a su indiscutible papel en la salud pública. Los *Penicillium* son hongos muy diversos y cosmopolitas, dentro de este género se reconocen alrededor de 350 especies. Se encuentran en todo el mundo y desempeñan un papel importante como descomponedores de materiales orgánicos, provocan pudriciones destructivas en la industria alimentaria donde se produce una amplia gama de micotoxinas; se consideran fábricas de enzimas e irritantes comunes del aire interior (Perrone & Susca, 2017). Pueden aparecer diversas micotoxinas en alimentos y piensos contaminados por especies de *Penicillium*, las más importantes son la ocratoxina A y la patulina y, en menor medida, el ácido ciclopiazónico. Se han identificado alrededor de 32 micotoxinas en *Penicillium spp.* aislado de alimentos y piensos (Otero et al., 2020).

Las infecciones fúngicas de los frutos del plátano, al ser de amplia ocurrencia en el mundo, podrían causar graves problemas de salud en los seres humanos cuando los frutos infectados se ingieren durante un período prolongado de tiempo. *P. citrinum* fue reportado como productor de la micotoxina citrinina en 5/9 aislados obtenidos de banano de fruta en mercados en India (Sarkar et al., 2011). Dado que se informa que este género era micotoxigénico, fue necesario examinar la contaminación por micotoxinas ya que la posibilidad de elaboración de micotoxinas durante su infestación y puede representar un peligro para la salud. Otros autores citados en el trabajo hacen referencia de la incidencia de especies de *Penicillium* y sus toxinas en productos de manzana y verduras deshidratadas. Las micotoxinas pueden ser especie específicas, pero otras son producidas por varias especies como la ocratoxina A y la patulina (Perrone & Susca, 2017).

## CAPÍTULO III METODOLOGÍA

### 3.1 Aislamiento e identificación de cepas nativas en biomasa.

Se obtuvo una cepa de *Penicillium sp.* de la fermentación espontánea de biomasa con cáscara de banano en condiciones aerobias. Las cáscaras usadas en la fermentación son de banano de procesos orgánicos y convencionales. El banano orgánico proviene de proveedores que están certificados con las normativas nacionales (Resolución DAJ-2013EC-0201.0099, regulación No 889/2008), la Regulación Europea 834/2007, y con la Regulación del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (7 CFR Part 205). Los proveedores de banano convencional cumplen con la normativa GLOBAL GAP.

Las cáscaras fueron recolectadas después de 5 días en cámaras de maduración hasta grado 6 de la escala USADA (Robinson, 2001.), pelado manualmente para su procesamiento industrial como puré. Para la fermentación de cáscaras de banano se usó el método propuesto (Barig et al., 2011) medio de sales minerales 1,5 g KNO<sub>3</sub>, 0,5 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,5 mg FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,5 mg ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,02 mg CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0,2 mg MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 1,5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub> por litro (pH3). Mezclándose con 1 kilogramo de cáscara de banano, todas las fermentaciones de prueba se hicieron en combinación (1:1) con el medio de sales minerales (MSM) ajustando pH 3.0 con ácido clorhídrico (grado reactivo). La fermentación termino a los 5 días cuando se observó hifas aéreas en la superficie de la biomasa de color blanco.

Para el aislamiento se tomaron 10 gramos de la biomasa fermentada y se realizó una dilución seriada. La muestra se disolvió en 90 mililitros de agua de peptona bufferada marca MERCK (GranuCult™ Buffered Peptone Water acc. ISO 6579, ISO 21528, ISO 22964, FDABAM and EP composición Peptone (includes Enzymatic Digest of Casein) 10 g/l; NaCl 5 g/l; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12 H<sub>2</sub>O 9 g/l; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1.5 g/l). Se inoculó 1 ml de muestra en aproximadamente 25 ml de medio de cultivo medio Agar Sabouraud Dextrosa con Cloranfenicol (ASD) marca NEOGEN (Enzymatic Digest of Casein 5.0 g/L; Enzymatic Digest of Animal Tissue 5.0 g/L; Dextrose 40.0 g/L; Chloramphenicol 0.05 g/L; Agar 15.0 g/L; Final pH: 5.6 ± 0.2 at 25°C). Paralelamente se inoculo en

medio mínimo de sales (MSM) propuesto por (Barig et al., 2011). El medio agar MSM fue modificado de la siguiente manera para que la cascara de banano sea la única fuente de carbono. Se pesó 100 gramos de medio MSM + cáscara de banano (se drenó y se obtuvo 100 gramos a partir de la mezcla de 100 gramos de cáscara cortada y triturada con mortero mezclado con 100 mililitros de MSM ajustado a pH 3.0 con ácido clorhídrico por 30 minutos en reposo) se mezcló con 900 mililitros de agua desionizada y se añadió 60 gramos de agar – agar. Se inocularon con 1 mililitro en diluciones seriadas:  $10^{-1}$ ;  $10^{-2}$ ;  $10^{-4}$ ;  $10^{-5}$ ;  $10^{-6}$ ;  $10^{-7}$ , y las muestras se incubaron a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ , y se observaron diariamente hasta los 5 días.

Los hongos se describieron macroscópicamente y microscópicamente con técnicas básicas. A partir de placas con MSM en dilución  $10^{-5}$  y 5 d de incubación. La caracterización de las colonias y de los conidios de *Penicillium* sp. se realizó en base al color, textura y densidad del micelio, así como las estructuras de los conidióforos y conidios (Visagie et al., 2014). Se observaron las estructuras microscópicas a partir de preparaciones NaCl estéril 0.9% (p/v) y se tiñeron con azul de lactofenol para ser observados en un microscopio de campo claro objeto 400x.

### **3.2 Caracterización de la velocidad de crecimiento.**

Se evaluó y caracterizó el crecimiento micelial in vitro de *Penicillium* sp, Se inoculó en medio de cultivo ASD y medio agar MSM composición descrita en 3.1. Los medios de cultivos fueron autoclavados (15 min/  $121^{\circ}\text{C}$ ) y mantenidos en baño maría a  $60^{\circ}\text{C}$  hasta el vertido de aproximadamente 25 mililitros de medios de cultivos estériles en cajas de Petri de 90 x 15 mm. En cada caja de Petri se inoculó con una ajuga de inoculación en el centro de la placa colocando de forma invertida la caja para prevenir la contaminación por la propagación del hongo en la superficie de la placa. Todo el procedimiento se realizó en cámara de flujo laminar. Las cajas inoculadas se incubaron a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  en una incubadora Memmert. Se previeron tres tratamientos para inocular la cepa: medio ASD (P+ASD), medio MSM con banano orgánico (P+MSM+O) y con banano convencional (P+MSM+C) con cinco repeticiones.

Para medir el crecimiento micelial se trazó 2 ejes cartesianos sobre la tapa y reverso

de la caja de Petri, se midió el crecimiento del micelio cada día durante 14 días tomando como inicio el centro de la caja de Petri. Para estimar la tasa de crecimiento (Kt), se calculó con la función de crecimiento lineal  $y=k_t x + c$  (donde y es la distancia, x es el tiempo y c el factor constante) y se expresó en milímetros por día ( $\text{mm d}^{-1}$ ) (Zervakis et al., 2001). Los resultados de los diámetros promedio por día ( $\text{mm d}^{-1}$ ) que se midió en cada caja de Petri, se registró en una matriz de datos las diferencias entre las medias de los tratamientos fueron identificadas usando estadística descriptiva, con 95% de confianza ( $p < 0.05$ ).

### **3.3 Estandarización del troceado de la biomasa para la fermentación en fase sólida.**

Se ensayaron 4 formas de preparación de la biomasa: Prueba 1 se realizó con cáscaras de banano convencional sin cortar. Prueba 2 se realizó con cáscaras de banano convencional cortadas con equipo cortador con aspas metálicas. Prueba 3 se realizó con cáscaras de banano convencional cortadas con cuchillo manualmente en pequeñas partes de  $2\text{cm}^2$ . Prueba 4 se realizó con cáscaras de banano convencional cortadas con cuchillo manualmente en pequeñas partes de  $1\text{cm}^2$  aproximadamente y trituradas manualmente. Para las pruebas 5, 6, 7 y 8 se siguieron iguales pasos en orden descrito de la prueba 1 hasta 4, con la variante que se usaron cáscaras de banano orgánico. Todas las pruebas se realizaron apilando las cáscaras una encima de otra con 1 centímetro máximo de espesor.

### **3.4 Determinación del contenido de proteínas en fermentación de 1 kg de biomasa.**

Para la fermentación espontánea se pesó 1 kilogramo de cáscaras con grado de maduración 6, las cáscaras de banano fueron cortadas de forma manual y colocadas una encima de otra con una altura de 1 centímetro de espesor, se mezclaron con 1 litro de medio MSM, se ajustó a pH 3.0 con ácido clorhídrico, dejando en contacto por 30 minutos hasta que se estabilice el pH de la cáscara y MSM, la mezcla se drenó y se inició la fermentación con la parte sólida, no se realizó remoción de la pila durante el tiempo de fermentación. El pH 3.0 de la cáscara brinda condiciones favorables para

el crecimiento de hongos y el espesor de la pila favorece la aireación evitando la formación de malos olores por la acción de bacterias. Se monitoreo de forma diaria las condiciones de fermentación tomando el pH, pesando 3 gramos mezclando con 3 mililitros de agua ionizada medido con pHmetro Digital (Mettler Toledo modelo Seven Easy S20K). La temperatura ambiental y humedad relativa fue medida con termohigrómetro marca Datalogger modelo RC-4HC. La biomasa fue colocada en un cuarto bajo techo con ventilación natural mediante ventanas, colocada encima de plástico de forma horizontal.

Como criterio de valoración de la conversión de biomasa de banano en biomasa fúngica se utilizó el contenido de proteínas en extractos acuosos. Los extractos se obtuvieron de dos fuentes en experimentos separados: a partir del producto de fermentación en fase sólida con *Penicillium* sp. (descrito previamente), así como de micelio fresco de tres especies fúngicas. El primero de los ensayos se desarrollaron en las instalaciones de una fábrica en Ecuador, y el contenido de proteína en laboratorios del departamento de Microbiología Técnica de la Universidad Técnica de Brandenburg. La cuantificación se estimó mediante el método de Bradford a partir de 200 mg del producto/ micelio. Se realizaron extracciones con hexano (no polar) para eliminar los lípidos de las muestras y, posteriormente, una acuosa (polar) para extraer las proteínas. Se determinó la absorbancia a 595 nm una vez que hubo la reacción con Azul de Coomassie G-250 y el resultado se expresó en mg de proteínas/ g de biomasa (primer ensayo) o en base a g de micelio (segundo ensayo)(Chaparro et al., 2009). De cada producto fermentado en cada momento de muestro se realizaron dos extracciones independientes, las cuales se consideraron dos repeticiones.

## CAPÍTULO IV: ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

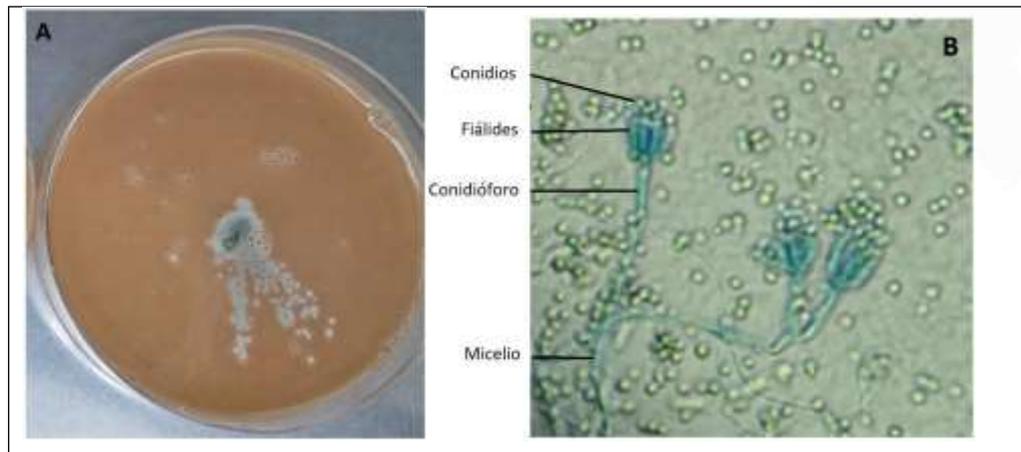
### 4.1 Cepas nativas en biomasa

Los experimentos se realizaron en instalaciones de una industria productora de pureé de banano a la par del proceso de producción, por lo que se diseñaron experimentos simples, pero robustos. Dada la naturaleza exploratoria en la fase inicial del desarrollo de un producto, se probaron muchos tratamientos con pocas réplicas, por ejemplo, para seleccionar la cepa nativa que mejor creció en las pilas de fermentación. El pH del sustrato es un agente selectivo muy potente (Andersen et al., 2009), pocos hongos logran crecer a pH 3, tal como el que predominó en la fase inicial de la fermentación en fase sólida (FFS).

Se procesaron en esta fase inicial ocho pilas de FFS a los efectos de ganar conocimiento de las condiciones experimentales de fermentación (experimentos preliminares). Se ensayaron bananas orgánicas y convencionales, distintos volúmenes de medio para ajustar el pH inicial, distintas fuentes de ácido (HCl y cítrico). Los aislamientos se realizaron en paralelo con el medio rico en carbono ASD y con MSM, el cual tenía como única fuente de carbono la cáscara de banano. Para todo el estudio se utilizó el MSM ya que eran las condiciones selectivas que predominarían en el proceso, y el cual garantizaría que la cepa más exitosa era la mejor adaptada a las condiciones deseadas (Wilson et al., 2020).

De cada pila se tomó una muestra de 10 gramos compuesta, aislando ocho placas por duplicado. En el proceso de aislamiento en ASD se obtuvieron dos tipos de colonias, sin embargo, una fue más abundante. El proceso de purificación de esta cepa arrojó una morfología similar a *Penicillium spp.* Las características macroscópicas de la colonia purificada (Fig. 2A) y las características microscópicas (Fig. 1B) observadas coinciden con las descritas para el género *Penicillium* (Visagie et al., 2014). Las estructuras microscópicas coinciden con las descritas para por (Srinivasan et al., 2020) con una tipo de ramificación del conidióforo biverticiliado al ramificarse las métula a los conidios directamente del conidióforo. Se ha reportado que *Penicillium sp.* logra crecer en cáscaras de banano una vez inoculado en el

sustrato esterilizado mediante autoclave (Akinyele & Agbro, 2007), aunque no se ha reportado, hasta nuestro mejor conocimiento, que una sola especie logre crecer fermentación libre, sin autoclavado y donde las bacterias no sean un impedimento tal como hemos descrito aquí.



**Figura 2.** Morfología de *Penicillium sp.* cultivada en medio MSM de siete días de incubación. Obsérvese la colonia de color verde azulado (A). Estructuras microscópicas propias del género, especialmente la métula (B, 400x).

Las colonias de *Penicillium spp.* en medio MSM, en el segundo día de incubación presentaron un color blanco, al quinto día de incubación adquirió un color blanco en los bordes y un color verde oscuro en el centro de la colonia (Fig. 2A), textura plana aterciopelada. El crecimiento de las colonias fue lento posiblemente debido a las condiciones selectivas usadas, no presentó gotas de exudado. Morfología de las colonias similares a las observadas han sido publicadas (Govindappa et al., 2016), así como el pequeño tamaño en diferentes condiciones de crecimiento como medio de cultivo, temperatura y pH (Pangging et al., 2019; Visagie et al., 2014).

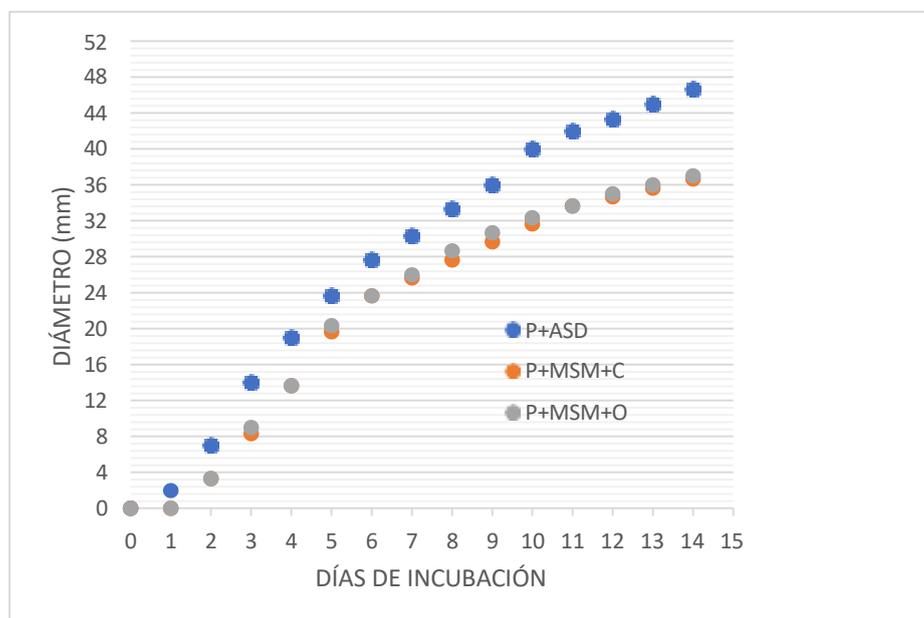
#### 4.2 Velocidad de crecimiento de la cepa aislada

Una vez que se logró determinar la especie fúngica que lograba colonizar exclusivamente la biomasa, y de determinar el género del espécimen puro, se determinó la velocidad de crecimiento en el medio estándar de nuestra investigación. En términos generales el crecimiento de las colonias fue lento en el medio MSM, independientemente si estaba o no suplementado con banano orgánico o convencional. En estos medios, las colonias no lograron alcanzar el borde la placa ni siquiera a los 14 d (Fig. 3, Graf. 1).



**Figura 3.** Colonias de *Penicillium sp.* en medio MSM suplementado con banana orgánico a los dos (A) y siete (B) días de incubación.

El crecimiento máximo se logró en el medio ASD (Gráfico 1). Las velocidades de crecimiento fueron de 2.38 mm d<sup>-1</sup> en el tratamiento P+MSM+O y de 2.31 mm d<sup>-1</sup> en el P+MSM+C (datos no mostrados). La misma gráfica muestra un similar crecimiento de *Penicillium sp.* inoculado en medio MSM con biomasa de fincas orgánicas y convencionales, evidenciando poca influencia del sistema de cultivo de la banana procesada por FFS con la cepa obtenida.



**Gráfico 1.** Dinámica de crecimiento de *Penicillium sp.* en diferentes medios de cultivo [ASD (P+ASD), MSM suplementado con cáscaras de banana convencional (P+MSM+C) y orgánico (P+MSM+O)] a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  y  $n=5$ .

Los hongos tienen la capacidad de producir una variedad de enzimas que les permite crecer en diferentes sustratos. La fuente de carbono disponible en el medio ASD (40 g de glucosa) parece ser aprovechada más rápidamente por *Penicillium sp.* que la disponible en el medio MSM suplementado con cáscara de banano. La composición de la cáscara de banano después de 7 d de maduración tiene entre 0.32-0.38 grados Brix (Brat et al., 2016), una diferencia notable con respecto al medio ASD con un Brix aproximado de 40 (aprox. 1 Brix=1g/ L). Aunque se ha destacado que la maduración de los frutos implica un aumento del contenido de azúcares solubles a expensas de la degradación del almidón bajo enzimas endógenas (Emaga et al., 2007). Según estos autores, degradar un sustrato complejo como la cáscara necesita de las actividades de varias enzimas que trabajan juntas como la amilasa, la glicosidasa, la fosforilasa, la sacarosa sintasa y la invertasa, especialmente pueden actuar en la degradación del almidón y en la formación y acumulación de azúcares solubles.

Se necesita activar los genes necesarios para degradar enzimáticamente los polisacáridos de la cáscara en azúcares fácilmente asimilables. La cáscara se compone, entre otros compuestos, de celulosa (13.2 %), hemicelulosa (14.8 %) y lignina (14.0 %) en base a peso seco (Velásquez-Arredondo et al., 2010). Otros investigadores (Akinyele & Agbro, 2007) han reportado la capacidad de *Penicillium sp.* de producir de celulasa, amilasa, hemicelulasa, catalasa, pectinasa y xilanasas, aunque en mucha menor medida que *Aspergillus niger* y *A. flavus* ya que estos mostraron un crecimiento más vigoroso en siete días.

#### **4.3 Fermentación de 1 kilogramo de cáscaras**

En ensayos preliminares se determinó la metodología del troceado de las cáscaras usadas en la FFS (estandarización). En las pruebas que usaron cáscaras de banano convencional y orgánica enteras (la 1 y la 5) se observó poco crecimiento de hongo en la superficie de la pila al cuarto día, aumentado la densidad al octavo día. El crecimiento fue evidente solo en la parte externa de la cáscara. En las pruebas 2 y 4 los cortes realizados no fueron homogéneos, posiblemente debido a que el equipo fue adaptado para la prueba. El crecimiento tampoco fue homogéneo, observándose

colonización en parches, aunque también el micelio fue mayor el 8vo día respecto al 4to. En la prueba 3 y 6 se cortaron las cáscaras de banano con cuchillo de forma manual (aprox. 2 cm<sup>2</sup>), en este caso se observó crecimiento de hongo en la superficie externa e interna de las cáscaras al 3er de fermentación siendo mayor el crecimiento al 6to día. En las pruebas 7 y 8 se cortaron las cáscaras cuchillo (aprox.1 cm<sup>2</sup>), observándose hongo en la superficie al 3er día, y con mayor densidad tanto en la parte interna y externa de las cáscaras 5to día. Esta se consideró la mejor opción para el acondicionamiento de las cáscaras usadas en las FFS espontaneas.

Las pilas de fermentación definitivas se realizaron por el que mejor resultado dió en el acápite anterior. Al trocear las pilas las mismas fueron humedecidas con medio MSM (Fig. 4A) al inicio de FFS, y el exceso fue colectado y regresado a la pila al siguiente día. La aparición de micelio blanco fue observada a los 3 días (Fig. 4B) y a los 5 días se observó casi en toda la pila. Al final de la fermentación (14 d) las pilas estaban secas, pero con crecimiento micelial observable a simple vista (Fig. 3C).



**Figura 4.** Nivel de humedad de las pilas de fermentación de prueba 4 a los 1 d (A), 3 d (B) y 14 d (C). Nótese el crecimiento micelial en la superficie de las pilas (B y C).

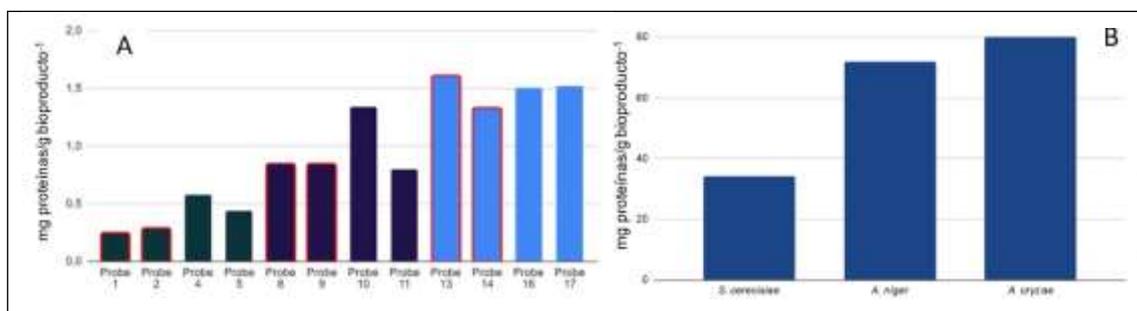
Se realizaron 8 fermentaciones en paralelo a los efectos de observar la influencia del sistema de cultivo (orgánico/ convencional) en el crecimiento micelial en las pilas. En todos los casos se observó micelio de color blanco en la superficie (Fig. 4C), indicativo de que no había otra especie predominando en cada bandeja. Por otro lado, no fueron evidentes olores propios de fermentación anaeróbica durante el tiempo de fermentación. Durante la fermentación las pilas se deshidrataron, por lo cual se tomó el peso desde el inicio hasta los 14 días de fermentación con una frecuencia diaria obteniéndose un porcentaje promedio de humedad del 85±2% base húmeda.

Los requerimientos nutricionales de *Penicillium* spp. en general se dividen en macronutrientes (nitrógeno, potasio, fósforo, magnesio y azufre), y micronutrientes (hierro, zinc y, además, cobre, manganeso y molibdeno) para un crecimiento óptimo (Blechert et al., 2023; Nicholas, 1952). Varios de estos elementos están disponibles en la composición elemental de la cáscara de banano como fósforo, potasio, magnesio de los macronutrientes, así como de los micro (hierro, zinc, cobre, manganeso) (Hikal et al., 2022).

Una vez que se fermentaron las pilas durante 10 d, el producto final fue secado a peso constante con un dispositivo construido al efecto usando un secador de pelo casero para generar el calor. Se cuidó que la temperatura no pasara de los 60 °C. Las muestras así procesadas fueron se lladas y enviadas para análisis de proteínas en Alemania.

#### 4.4 Contenido de proteínas.

En el Gráfico 2A se puede observar que el contenido de proteínas aumenta con el tiempo de fermentación desde el día 0 hasta el día 10, alcanzando un valor máximo > 1.5 mg proteínas g bioproducto<sup>-1</sup> en una de las repeticiones (probe 13 en el Gráfico 2A). El contenido de proteínas en la biomasa inicial estuvo por debajo de 0.5 mg proteínas g bioproducto<sup>-1</sup> en tres de las cuatro muestras (Graf. 2A, barras 1-5). Este resultado no es de extrañar ya que las cáscaras de banano secas contienen cerca de 1.95 % de proteína cruda (Hikal et al., 2022).



**Gráfico 2. (A)** Contenido de proteínas en biomasa fermentada en fase sólida con *Penicillium* sp.. Las barras indican el tiempo de fermentación y los sistemas de cultivo orgánico (barras con borde rojo) y el convencional: día 0, orgánico-barras 1-2, convencional-barras 4-5; día 6, org.-8-9, conv.-9-10; día 10, org.-13-14, conv.16-17. **(B)** Proteínas en el micelio de diferentes especies fúngicas (B). Proteínas medidas en extracto acuoso por el método de Bradford y expresadas en mg proteínas g bioproducto<sup>-1</sup>.

Después de 10 d de fermentación, el cual se triplicó a 1.5 como mínimo según muestran las barras azul claro (Gráf.. 2A). Este incremento en el crecimiento evidencia la capacidad de *Penicillium sp.* de convertir la biomasa vegetal en biomasa fúngica. Sin embargo, hay mucho espacio para la mejora si tomamos en cuenta el contenido de proteínas que hay presente en el micelio de varias especies de hongos entre 30-80 mg proteínas g bioproducto<sup>-1</sup> (Gráf.. 2B). La especie *A. oryzae* logró producir en medio de cultivo axénico hasta 80 mg proteínas g bioproducto<sup>-1</sup>. Debido a restricciones para exportar material biológico no se pudo realizar el análisis comparativo con la cepa de *Penicillium sp.* aislada. Vale destacar que el método Bradford permite estimados aceptables en los valores, no es tan susceptible a la interferencia de otras sustancias como el método de Lowry, y no es tan costoso como la determinación de aminoácidos (Mæhre et al., 2018). Los mismos autores señalan que al estimar proteínas en carnes de varias especies acuícolas, hubo una sobreestimación.

Por otro lado, en este experimento, al igual que en la dinámica de crecimiento (Gráf. 1), no se observó una influencia clara del sistema de cultivo del banano en el producto de la FFS. La presencia de restos de fungicidas en la biomasa a fermentar que pudiera inhibir el crecimiento y metabolismo del hongo era una preocupación desde los inicios del proyecto<sup>3</sup>. El banano convencional es sometido a unas 30 aspersiones de fungicidas aéreas anualmente, por lo que es una sospecha fundamentada. Los frutos son cubiertos con fundas protectoras lo cual evitaría la exposición de la cáscara al fungicida. En estudios realizados en Islas Canarias (España) se determinó que el insecticida clorpirifos y el fungicida imazalil fueron los más frecuentes detectados en una muestra de 106.641 y, a su vez, la combinación más frecuente, detectada en el 46,9% de las muestras (Méndez et al., 2023). La combinación se debió al control de insectos y enfermedades fúngicas que afectan a este cultivo en la fase postcosecha. Vale destacar que en el referido estudio se investigaron en total 191 sustancias activas diferentes, pero sólo 36 se encontraron en el total de muestras con residuos de pesticidas. Este estudio fue el único encontrado, a nuestro mejor saber, donde se especifica tanta cantidad de sustancias enlizadas, y se toma como referencia a falta

---

<sup>3</sup> No se pudo obtener el dato de la cantidad de aplicaciones de fungicidas de los proveedores del banano convencional utilizado en esta investigación.

de análisis detallados en Ecuador. (Méndez et al., 2023) pudieron concluir que los residuos de plaguicidas en el plátano producido y comercializado en Canarias mostraron solo 12 residuos por encima del límite máximo de residuos (LMR).

La situación ideal es lograr una fermentación donde todos los glúcidos contenido en la biomasa vegetal, se conviertan en proteínas contenida en la biomasa de *Penicillium*. Esta primera aproximación a un proceso industrial nos plantea la necesidad de optimizar las condiciones de fermentación como la cantidad de inóculo a utilizar en las pilas de fermentación, las temperaturas de las pilas, la suplementación con elementos limitantes como puede ser el nitrógeno. De la literatura se conoce que la cáscara de banano carece de este elemento o es muy escaso (Hikal et al., 2022).. Otras posibilidades serían mejorar la cepa actual de *Penicillium* sp., lo cual puede tomar cerca de cinco años para desarrollar un mutante natural<sup>4</sup>, con los inconvenientes que puede significar para la industria y los consumidores. En el mismo sentido, se puede utilizar otras especies como *A. orizae* o *A. niger*. La ventaja de *A. orizae* (Rousta et al., 2021) y *A. niger* (Schuster et al., 2002) respecto a *Penicillium* es que aquellos son considerados GRAS (del inglés *generally recognised as safe*) por la FDA.

#### 4.5 Perspectivas

La biomasa residual del banano, tanto en la parte agrícola como en la parte de procesamiento poscosecha de la cadena de valor, es un insumo emergente para aplicaciones impulsadas por la industria, sin embargo, se requieren atender una serie de desafíos antes de que los subproductos del banano puedan convertirse en un producto agrícola sostenible. La conversión de cualquier subproducto o desperdicio siempre debe transformarse en nuevas materias primas procesadas de alto valor o productos que satisfagan las demandas del mercado y generen impactos económicos sustanciales (Kalia, 2020). En el caso de este proyecto, la intención es apuntar a un producto de alto valor agregado y que, al mismo tiempo, satisfaga la necesidad de la acuicultura ecuatoriana de bajar los costos de producción en base a la disminución del costo de la proteína d las dietas de balanceados.

---

<sup>4</sup> Klau-Peter Stahmann 2024.02., comunicación personal, Dpto. Microbiología Técnica, Univ. Téc. De Brandenburgo, Alemania.

Con esta meta, la tecnología en desarrollo de este trabajo permite describir aspectos clave de un posible proceso de producción mediante FFS como el espécimen y sus capacidades de crecimiento en condiciones selectivas y de producción de proteínas. Al momento escalar los volúmenes de biomasa a procesar, es preciso disponer de una cepa adecuada y de unas condiciones que permitan la colonización razonablemente exitosa con una sola morfología fúngica, considerando que un proceso de producción con esterilización no haría competitivo un posible producto.

## CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Esta investigación pretendió explorar y describir las fases iniciales para el establecimiento de un proceso productivo de transformación de biomasa de cáscara de banano, con la peculiaridad de hacerlo desde la industria, y no desde la academia. Los resultados permiten esbozar tres conclusiones principales.

### 5.1 Conclusiones

1. Las condiciones de fermentación fueron lo suficientemente selectivas como para que se obtuviera un solo tipo de crecimiento micelial en las pilas, y que el mismo fuera aislado. La especie más exitosa creciendo a pH 3 en cáscara de banano humedecida con medio MSM fue *Penicillium spp.* (Fig. 2).
2. Este hito permite reducir la posibilidad de contaminación con otras especies de hongos o bacterias en un sistema de fermentación en fase sólida sin necesidad de esterilización. Al usar la cepa de *Penicillium sp.* en una concentración de  $1 \times 10^8$  o, alternativamente, el 10% de una fermentación anterior, se logra una colonización de las pilas de fermentación de 1kg con abundante micelio y una buena cobertura sobre las pilas (Fig. 4). Según los datos obtenidos, el sistema de cultivo del banano, orgánico o convencional, tiene poca influencia en la dinámica de crecimiento *in vitro* de la cepa de trabajo (Gráf. 1).
3. El contenido de proteínas alcanzado en el producto final de la fermentación en fase sólida usando una cepa nativa de *Penicillium sp.* logró triplicar el contenido de proteínas totales (Fig. 4A, de 0.5 a 1.5 mg proteínas g producto<sup>-1</sup>). Estos niveles provienen de la transformación de los glúcidos contenidos en las cáscaras en biomasa fúngica, considerando que no se observó crecimiento de otros especímenes ya sea de hongos o bacterias en las condiciones de fermentación impuestas. Sin embargo, los niveles proteicos son bajos en comparación con el potencial teórico si toda la biomasa vegetal se convirtiera en biomasa fúngica. Una estimación de estos valores se demostró cultivando *A. oryzae*, *A. niger* y *S. cerevisiae* (Gráf. 2B).

## 5.2 Recomendaciones

Las experiencias adquiridas durante el desarrollo de este trabajo nos permiten recomendar varios aspectos que fueron discutido previamente en el Cap. IV:

1. Un aspecto clave que no fue abordado en esta investigación fue la aceptabilidad del fermento obtenido, independientemente del contenido de proteínas logrado. Desde el punto de vista de la tecnología de los alimentos balanceados, el alimento debe ser ingerido. Experimentos preliminares con larvas de la especie comercial más importante de Ecuador *Litopenaeus vannamei*, o incluso otras especie de camarón sería una especie de “prueba de fuego” y daría fuerza a determinadas estrategias de fermentación. Determinar experimentalmente la aceptación del bioproducto obtenido por camarones. Este es un ensayo clave que daría información no solo de la aceptación sino también si se han producido micotoxinas por parte de *Penicillium sp.*.
2. Optimizar el proceso de FFS con la cepa de *Penicillium sp.*. Entre los aspectos clave en nuestras condiciones industriales está alargar el tiempo de fermentación a más de 10 d a fin de conocer la dinámica posterior, especialmente cuando ya no se incrementa el nivel de proteínas, determinar algún elemento limitante como pudiera ser el contenido de nitrógeno.
3. El género *Penicillium* puede producir micotoxinas como la ocratulina A y la patulina. En base a ello, es recomendable determinar la capacidad toxigénica de la cepa utilizada a fin de que sean más seguras desde la perspectiva de la bioseguridad. De igual forma, es clave la identificación hasta nivel de especie.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdullah, R., Qaiser, H., Farooq, A., Kaleem, A., Iqtedar, M., Aftab, M., & Naz, S. (2017). Evaluation of microbial potential and ripening behaviour of preclimacteric bananas following gamma irradiation. *Bioscience Journal*, 33(1), Article 1.  
<https://doi.org/10.14393/BJ-v33n1a2017-33585>
- Akinyele, B. J., & Agbro, O. (2007). Increasing the Nutritional Value of Plantain Wastes by the Activities of Fungi Using the Solid State Fermentation Technique. *Research Journal of Microbiology*, 2, 117-124.
- Amara, A. A., & El-Baky, N. A. (2023). Fungi as a Source of Edible Proteins and Animal Feed. *Journal of Fungi*, 9(1), 73. <https://doi.org/10.3390/jof9010073>
- Andersen, M. R., Lehmann, L., & Nielsen, J. (2009). Systemic analysis of the response of *Aspergillus niger* to ambient pH. *Genome Biology*, 10(5), R47.  
<https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-5-r47>
- Babatunde, G. M. (1992). Availability of banana and plantain products for animal feeding. En *Roots, tubers, plantains and bananas in animal feeding* (D. Machin and S. Nyvold (Eds.)). FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations.  
<https://www.fao.org/3/t0554e/T0554E17.htm>
- Barig, S., Alisch, R., Nieland, S., Wuttke, A., Gräser, Y., Huddar, M., Schnitzlein, K., & Stahmann, K.-P. (2011). Monoseptic growth of fungal lipase producers under minimized sterile conditions: Cultivation of *Phialemonium curvatum* in 350 L scale. *Engineering in Life Sciences*, 11(4), 387-394. <https://doi.org/10.1002/elsc.201000219>
- Blechert, O., Xiong, S., Chen, J., Brand, A. C., & Zhan, P. (2023). Nutritional requirements of the human pathogenic fungus, *Trichophyton rubrum*, and nutritional immunity of the human skin as barrier against colonization. *Fungal Biology Reviews*, 45, 100330.  
<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2023.100330>
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J. C., Gerds, M. L., Hammes, W. P.,

- Harnett, J., Huys, G., Laulund, S., Ouwehand, A., Powell, I. B., Prajapati, J. B., Seto, Y., Ter Schure, E., Van Boven, A., Vankerckhoven, V., Zgoda, A., Tuijelaars, S., & Hansen, E. B. (2012). Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology*, 154(3), 87-97.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.030>
- Boyd, C. E., Davis, R. P., Wilson, A. G., Marcillo, F., Brian, S., & McNevin, A. A. (2021). Resource use in whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* farming in Ecuador. *Journal of the World Aquaculture Society*, 52(4), 772-788. <https://doi.org/10.1111/jwas.12818>
- Boye, J., Wijesinha-Bettoni, R., & Burlingame, B. (2012). Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. *British Journal of Nutrition*, 108(S2), S183-S211.  
<https://doi.org/10.1017/S0007114512002309>
- Brat, P., Lechaudel, M., Segret, L., Morillon, R., Hubert, O., Gros, O., Lambert, F., Benoit, S., Bugaud, C., & Salmon, F. (2016). Post-harvest banana peel splitting as a function of relative humidity storage conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(10), 234.  
<https://doi.org/10.1007/s11738-016-2253-0>
- Chaparro, D. F., Rosas, D. C., & Varela, A. (2009). Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera (Quindío, Colombia). *Revista Iberoamericana de Micología*, 26(4), 238-243.  
<https://doi.org/10.1016/j.riam.2009.03.005>
- Cummins, V. C., Rawles, S. D., Thompson, K. R., Velasquez, A., Kobayashi, Y., Hager, J., & Webster, C. D. (2017). Evaluation of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal as partial or total replacement of marine fish meal in practical diets for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*, 473, 337-344.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.02.022>
- de Miguel, C., Martínez, K., Pereira, M., & Kohout, M. (2021). *Economía circular en América Latina y el Caribe: Oportunidad para una recuperación transformadora* (Unidad de Políticas para el Desarrollo Sostenible de la División de Desarrollo Sostenible y

Asentamientos Humanos). Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL),. <https://repositorio.cepal.org/server/api/core/bitstreams/5fceda72-3fed-4ace-bb87-5688547cf2f5/content>

Emaga, T. H., Andrianaivo, R. H., Wathelet, B., Tchango, J. T., & Paquot, M. (2007). Effects of the stage of maturation and varieties on the chemical composition of banana and plantain peels. *Food Chemistry*, 103(2), 590-600.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.006>

Evans, E. A., Ballen, F. H., & Siddiq, M. (2020). Banana Production, Global Trade, Consumption Trends, Postharvest Handling, and Processing. En M. Siddiq, M. G. Lobo, & J. Ahmed, *Handbook of Banana Production, Postharvest Science, Processing Technology, and Nutrition* (1.<sup>a</sup> ed., pp. 1-18). Wiley.

<https://doi.org/10.1002/9781119528265>

Farias, K. C. S., Guimarães, R. C. A., Oliveira, K. R. W., Nazário, C. E. D., Ferencz, J. A. P., & Wender, H. (2023). Banana Peel Powder Biosorbent for Removal of Hazardous Organic Pollutants from Wastewater. *Toxics*, 11(8), Article 8.

<https://doi.org/10.3390/toxics11080664>

Ferreira, J. A., Mahboubi, A., Lennartsson, P. R., & Taherzadeh, M. J. (2016). Waste biorefineries using filamentous ascomycetes fungi: Present status and future prospects. *Bioresource Technology*, 215, 334-345.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.018>

Fiallos-Cárdenas, M., Pérez-Martínez, S., & Ramirez, A. D. (2022). Prospectives for the development of a circular bioeconomy around the banana value chain. *Sustainable Production and Consumption*, 30, 541-555. <https://doi.org/10.1016/j.spc.2021.12.014>

Gmoser, R., Fristedt, R., Larsson, K., Undeland, I., Taherzadeh, M. J., & Lennartsson, P. R. (2020). From stale bread and brewers spent grain to a new food source using edible filamentous fungi. *Bioengineered*, 11(1), 582-598.

<https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1768694>

Govindappa, M., Farheen, H., Chandrappa, C. P., Channabasava, Rai, R. V., &

- Raghavendra, V. B. (2016). Mycosynthesis of silver nanoparticles using extract of endophytic fungi, *Penicillium* species of *Glycosmis mauritiana*, and its antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory and tyrosinase inhibitory activity. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 7(3), 035014.  
<https://doi.org/10.1088/2043-6262/7/3/035014>
- Henry, G., & Hodson de Jaramillo, E. (2021). Bioeconomía, modelo para un desarrollo territorial sostenible e inclusivo. En *Bioeconomía, modelo para un desarrollo territorial sostenible e inclusivo* ((Misión Internacional de Sabios 2019) Di Palma Federica (ed.), Poveda Germán (ed.), Baena Garzón Sandra (ed.), Duque Beltrán Carmenza (ed.), Restrepo Restrepo Silvia (ed.), Noriega Escobar Maria del Pilar (ed.), pp. 167-190). Universidad de los Andes-Ediciones Uniandes.  
<https://agritrop.cirad.fr/597552/7/ID597552.pdf>
- Hikal, W. M., Said-Al Ahl, H. A. H., Bratovcic, A., Tkachenko, K. G., Sharifi-Rad, J., Kačániová, M., Elhourri, M., & Atanassova, M. (2022). Banana Peels: A Waste Treasure for Human Being. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2022/7616452>
- Kalia, A. (2020). *Microbiology of Fresh Bananas and Processed Banana Products* (First).
- Kalman, D. S. (2014). Amino Acid Composition of an Organic Brown Rice Protein Concentrate and Isolate Compared to Soy and Whey Concentrates and Isolates. *Foods*, 3(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/foods3030394>
- Koivurinta, J., Kurkela, R., & Koivistoinen, P. (1979). Uses of *Pekilo*, a microfungus biomass from *Paecilomyces varioti* in sausage and meat balls. *International Journal of Food Science & Technology*, 14(6), 561-570. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1979.tb00902.x>
- Li, X., Chen, Y., Zheng, C., Chi, S., Zhang, S., Tan, B., & Xie, S. (2022). Evaluation of Six Novel Protein Sources on Apparent Digestibility in Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/8225273>
- Mæhre, H., Dalheim, L., Edvinsen, G., Elvevoll, E., & Jensen, I.-J. (2018). Protein

Determination—Method Matters. *Foods*, 7(1), 5.

<https://doi.org/10.3390/foods7010005>

Méndez, J. M., Gutiérrez-Fernández, Á. J., Hardisson, A., Niebla-Canelo, D., Alejandro-Vega, S., Rubio-Armendáriz, C., & Paz-Montelongo, S. (2023). Pesticide Residues in Bananas from the Canary Islands. *Foods*, 12(3), 437.

<https://doi.org/10.3390/foods12030437>

Mogensen, L., Heusale, H., Sinkko, T., Poutanen, K., Sözer, N., Hermansen, J. E., & Knudsen, M. T. (2020). Potential to reduce GHG emissions and land use by substituting animal-based proteins by foods containing oat protein concentrate. *Journal of Cleaner Production*, 274, 122914.

<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.122914>

Nicholas, D. J. D. (1952). The use of fungi for determining trace metals in biological materials. *Analyst*, 77(920), 629-642. <https://doi.org/10.1039/AN9527700629>

Otero, C., Arredondo, C., Echeverría-Vega, A., & Gordillo-Fuenzalida, F. (2020). Penicillium spp. Mycotoxins found in food and feed and their health effects. *World Mycotoxin Journal*, 13(3), 323-343. <https://doi.org/10.3920/WMJ2019.2556>

Padam, B. S., Tin, H. S., Chye, F. Y., & Abdullah, M. I. (2012). Banana by-products: An under-utilized renewable food biomass with great potential. *Journal of Food Science and Technology*, 51(12), 3527-3545. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0861-2>

Pangging, M., Nguyen, T. T. T., & Lee, H. B. (2019). New Records of Four Species Belonging to Eurotiales from Soil and Freshwater in Korea. *Mycobiology*, 47(2), 154-164. <https://doi.org/10.1080/12298093.2018.1554777>

Pathak, P. D., Mandavgane, S. A., & Kulkarni, B. D. (2016). Valorization of banana peel: A biorefinery approach. *Reviews in Chemical Engineering*, 32(6), 651-666. <https://doi.org/10.1515/revce-2015-0063>

Peláez Samaniego, M. R., García Pérez, M., Barriga R, A., Martí Herrero, J., Montero Izquierdo, A., Mayer, F. D., & García Nuñez, J. A. (2015). Estado de uso de la biomasa para la producción de bioenergía, biocombustibles y bioproductos en

- Ecuador. En *ENERGÍAS RENOVABLES EN EL ECUADOR SITUACIÓN ACTUAL, TENDENCIAS Y PERSPECTIVAS* (Manuel Raúl Peláez Samaniego, Juan Leonardo Espinoza Abad (compiladores), pp. 29-115). Universidad de Cuenca.
- Perrone, G., & Susca, A. (2017). Penicillium Species and Their Associated Mycotoxins. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1542, 107-119.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0_5)
- Prayekti, E., Dardiri, H., Aisyah, N., & Nisya, K. (2023). Potential of cavendish banana peels as a fungal growth media. *Bali Medical Journal*, 12(3), Article 3.  
<https://doi.org/10.15562/bmj.v12i3.4374>
- Price, N. S. (1995). *The origin and development of banana and plantain cultivation: Vol. Bananas and Plantains* (Gowen, S.R.). Springer Science+Business Media Dordrecht.
- Ritala, A., Häkkinen, S. T., Toivari, M., & Wiebe, M. G. (2017). Single Cell Protein—State-of-the-Art, Industrial Landscape and Patents 2001–2016. *Frontiers in Microbiology*, 8.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02009>
- Robinson, K. E. (s. f.). *BANANA RIPENING GUIDE*.
- Romarheim, O. H., Zhang, C., Penn, M., Liu, Y. J., Tian, L. X., Skrede, A., Krogdahl, Å., & Storebakken, T. (2008). Growth and intestinal morphology in cobia (*Rachycentron canadum*) fed extruded diets with two types of soybean meal partly replacing fish meal. *Aquaculture Nutrition*, 14(2), 174-180. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00517.x>
- Rousta, N., Hellwig, C., Wainaina, S., Lukitawesa, L., Agnihotri, S., Rousta, K., & Taherzadeh, M. J. (2021). Filamentous Fungus *Aspergillus oryzae* for Food: From Submerged Cultivation to Fungal Burgers and Their Sensory Evaluation—A Pilot Study. *Foods*, 10(11), 2774. <https://doi.org/10.3390/foods10112774>
- Sarkar, S., Shilpa, P., Girisham, S., & Reddy, S. M. (2011). *Incidence of toxigenic fungi in rotting fruits of banana*.
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J. C., & Van Dijck, P. W. M. (2002). On the safety of *Aspergillus niger*—A review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(4-5),

426-435. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1032-6>

- Sial, T. A., Khan, M. N., Lan, Z., Kumbhar, F., Ying, Z., Zhang, J., Sun, D., & Li, X. (2019). Contrasting effects of banana peels waste and its biochar on greenhouse gas emissions and soil biochemical properties. *Process Safety and Environmental Protection*, 122, 366-377. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2018.10.030>
- Singh-Sogi, D. (2020). Value-Added Processing and Utilization of Banana By-Products. En M. Siddiq, J. Ahmed, & M. G. Lobo, *Handbook of Banana Production, Postharvest Science, Processing Technology, and Nutrition* (1.<sup>a</sup> ed., pp. 91-206). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119528265>
- Soares, R., Peixoto, S., Davis, R. P., & Davis, D. A. (2021). Feeding behavior and growth of *Litopenaeus vannamei* fed soybean-based diets with added feeding effectors. *Aquaculture*, 536(December 2020), 736487. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736487>
- Srinivasan, R., Prabhu, G., Prasad, M., Mishra, M., Chaudhary, M., & Srivastava, R. (2020). Penicillium. En *Beneficial Microbes in Agro-Ecology* (pp. 651-667). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00032-0>
- Teng, D., Gao, M., Yang, Y., Liu, B., Tian, Z., & Wang, J. (2012). Bio-modification of soybean meal with *Bacillus subtilis* or *Aspergillus oryzae*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1(1), 32-38. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2011.08.005>
- van der Pijl, W., & Venneman, J. (2019). *A purchase guide to the ecuadorian shrimp industry: Vol. Chapter 3 (summary)*. Stichting Seafood Trade Intelligence Portal (STIP). [www.seafood-tip.com](http://www.seafood-tip.com)
- Velásquez-Arredondo, H. I., Ruiz-Colorado, A. A., & De Oliveira junior, S. (2010). Ethanol production process from banana fruit and its lignocellulosic residues: Energy analysis. *Energy*, 35(7), 3081-3087. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2010.03.052>
- Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S.-B., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Seifert, K. A., Varga, J., Yaguchi, T., & Samson, R. A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, 78, 343-371.

<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>

Wilson, D. B., Sahm, H., Stahmann, K.-P., & Koffas, M. (2020). *Industrial Microbiology*. Wiley-VCH. <https://www.wiley-vch.de/de/fachgebiete/naturwissenschaften/chemie-11ch/technische-u-industrielle-chemie-11ch3/biotechnologie-i-d-chemie-11ch31/industrial-microbiology-978-3-527-34035-4>

Yao, W., Zhang, C., Li, X., He, M., Wang, J., & Leng, X. (2020). The replacement of fish meal with fermented soya bean meal or soya bean meal in the diet of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture Research*, 51(6), 2400-2409. <https://doi.org/10.1111/are.14583>

Yusuf, I., Flagiello, F., Ward, N. I., Arellano-García, H., Avignone-Rossa, C., & Felipe-Sotelo, M. (2020). Valorisation of banana peels by hydrothermal carbonisation: Potential use of the hydrochar and liquid by-product for water purification and energy conversion. *Bioresource Technology Reports*, 12, 100582. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100582>

Zervakis, G., Philippoussis, A., Ioannidou, S., & Diamantopoulou, P. (2001). Mycelium growth kinetics and optimal temperature conditions for the cultivation of edible mushroom species on lignocellulosic substrates. *Folia microbiologica*, 46, 231-234. <https://doi.org/10.1007/BF02818539>

Zwinkels, J., Wolkers-Rooijackers, J., & Smid, E. J. (2023). Solid-state fungal fermentation transforms low-quality plant-based foods into products with improved protein quality. *LWT*, 184, 114979. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114979>

## ANEXOS



Anexo 1. Canal de salida de la cáscara de banano de la línea de producción.

# UNEMI

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

*¡Evolución académica!*

@UNEMIEcuador

