Desarrollo de un proceso de fermentación en estado sólido (SSF) para la obtención de proteínas durante la valorización de residuos orgánicos en biorreactores a escala laboratorio

Prieto Lozano Giovanny Andres

Torres Rodriguez Yeferson

Universidad Cooperativa de Colombia

Facultad de ingeniería

Bogotá D.C

2020

Desarrollo de un proceso de fermentación en estado sólido (SSF) para la obtención de proteínas durante la valorización de residuos orgánicos en biorreactores a escala laboratorio

Prieto Lozano Giovanny Andres

Torres Rodriguez Yeferson

Informe de auxiliares de investigación

Santis Navarro Angélica María

Asesora

Universidad Cooperativa de Colombia

Facultad de ingeniería

Bogotá D.C

2020



Contenido

Planteamiento Del Problema 6
Justificación 10
Objetivos 11
Objetivo General 11
Objetivos Específicos 11
Hipótesis 11
Delimitación Del Proyecto 11
Marco Referencial 12
Marco Teórico 12
Marco Conceptual 18
Estado Del Arte 24
Marco Legal 30
Diseño Metodológico 32
Tipo De Investigación 32
Metodología 32
Método De Investigación 33
Técnicas Para La Recolección De La Información 35
Recursos Y Presupuesto 35
Recurso Físico 35
Recurso Humano E Institucional 36
Recursos Financiero Y Presupuesto 36
Cronograma 37
Resultados 38
Referencias Bibliográficas 50

Índice De Tablas

Tabla 1. Clasificación de los desechos generados según tipología. 7

Tabla 2. Recursos físicos. 36

Tabla 3. Cronograma de ejecución del proyecto. 37

Tabla 4. Caracterización de compost, lodo, madera y residuos orgánicos. 40

Tabla 5. Caracterización de las mezclas. 41

Tabla 6. Calibrado con el método de Bradford. 45

Tabla 7. Concentración de proteína. 47

Tabla De Figuras

Figura 1. Registro de temperaturas en los biorreactores. 43

Figura 2. Registro de pH en los biorreactores 44

Figura 3. Calibrado método Bradford 46

Figura 4. Concentración de proteína. 47

Planteamiento Del Problema

La generación de residuos es uno de los temas que ha generado mayor impacto con el paso de los años, y continúa siendo un problema de la vida cotidiana que demanda la atención del hombre. Puesto que, es una consecuencia directa de la explotación de todos los territorios donde se ha logrado la puesta en marcha de alguna fase de un proceso productivo, o de un sinfín de actividades tales como la extracción de materias primas o insumos, ensamblaje, embalaje de productos entre otros, que han permitido a la civilización alcanzar el desarrollo que se ostenta en la actualidad. Hace dos años, el Banco Mundial publicó que por lo menos un tercio de los más de dos mil millones de toneladas de desechos sólidos municipales que el mundo genera anualmente, no se gestionan con un enfoque ambiental. Igualmente, se estimó que la producción de residuos por individuo es aproximadamente de 0,74 kilogramos al día teniendo una variación entre 0,11 y 4,54.

A partir de estos resultados se proyecta que el mundo genere para el año 2030 un total de 2,59 mil millones de toneladas y para el año 2050 una cantidad de 3,4 mil millones de toneladas de residuos. Asimismo, este pronóstico se determinó con base en datos recopilados de anteriores años hasta la fecha, teniendo en cuenta el comportamiento de las variables del desarrollo económico y el crecimiento demográfico (Kaza et al., 2018). Uno de los factores que ha generado este aumento exponencial en los residuos es la producción de bienes de un único uso que son desechados y no tienen posibilidad de reutilización. Porcentualmente, se tiene que, en toneladas/ año, Asia oriental desechan el 23,3%, Europa y Asia central el 19,5%, Asia del sur el 16,6%, Norteamérica el 14,4%, América Latina y el Caribe el 11,5%, África Subsahariana el 8,6% y finalmente Oriente Medio y África del norte el 6,4%.

La mayor fuente generadora de residuos proviene de la comida. Los países de ingresos medios y bajos son catalogados como los mayores causantes de estos desperdicios. La generación de residuos es uno de los temas que más impacto ha generado con el paso de los años, y aún hace parte de las situaciones de la vida cotidiana a las que se les debe prestar un alto nivel de atención ya entendiendo que es una consecuencia directa de la explotación de todos los territorios donde el ser humano ha logrado la puesta en marcha de alguna fase del proceso productivo, ya sea la extracción de materias primas o insumos, ensamblaje, embalaje de productos entre otro sin fin de actividades que han permitido a la civilización alcanzar el desarrollo que se ostenta en la actualidad.

Ahora bien, si se analiza la situación de América latina se puede obtener la siguiente información: Aquellos países que más basura generan son México con 1,16 Kg/día por persona, en segundo lugar, se encuentra Chile con 1,15, posteriormente, Argentina con 1,14, después Rep. Dominicana con 1.08 y en la quinta posición está Brasil con 1,04 Kg/día por persona. Colombia se ubica en la posición número diecinueve con una cantidad de 0,76 Kg/día por persona (Kaza et al., 2018).

La producción de residuos sólidos generados por el hombre según información del banco mundial y de la superintendencia de servicios públicos domiciliarios (SUPERSERVICIOS), se clasifica considerando los diferentes tipos de desechos generados. En la tabla 1 se aprecia el porcentaje de acuerdo con la tipología de residuos.

Tabla 1

Clasificación de los desechos generados según tipología

Tipo de residuo	Relleno sanitario Doña Juana 21 de diciembre de 2016	Banco Mundial, informe año 2018
Materia orgánica	49,30%	44,00%
Papel y cartón	11,00%	17,00%
Plástico	12,40%	12,00%
Vidrio	5,00%	5,00%
Metal	3,50%	4,00%
Caucho y cuero	0,80%	2,00%
Madera	7,20%	2,00%
Otros **Cerámica** **Hueso** **Minerales** **Textil**	10,80%	14,00%
Total	**100,00%**	**100,00%**

Fuente: (Superservicios, Superintendencia de servicios públicos domiciliarios, 2017) y (Kaza et al., 2018).

Según la información entregada por la superintendencia de servicios públicos domiciliarios en el año 2016, en los 32 departamentos que conforman el territorio colombiano se generan un total de 11.303.309 toneladas de residuos sólidos por año. Se resalta la existencia de picos de generación, que se dan en los meses de diciembre y abril, que están relacionados con las celebraciones que ocurren a lo largo del territorio nacional. Esta producción de residuos tiene su foco en las ciudades capitales, tales como: Bogotá (23,6%), Cali (8%), Medellín (7,3%) y

Barranquilla (2,1%) que concentran el 41% de los kilogramos totales producidos en todo el país (Área de Sostenibilidad, INERCO Consultoría Colombia, 2018).

Cundinamarca presenta la mayor cantidad de producción de RS (Residuos Sólidos) en Colombia. Se registra que la generación de RSO (Residuos Sólidos Orgánicos) por habitante es de 0,7 kilogramos por día. Los residuos producidos son enviados a vertederos o quemadores en zonas periféricas de las ciudades o municipios dando como resultados inconvenientes para el medio ambiente y problemas de salud (Castañeda et al., 2017). Las afectaciones a la salud se concentran en enfermedades respiratorias agudas, seguidas del parasitismo intestinal, las diarreas, el dengue y la malaria que son generadas por los microrganismos que habitan dentro de las basuras y se proliferan por la cantidad de material orgánico existente en los vertederos (Escalona, 2014).

La información expuesta anteriormente permite visualizar los problemas del actual manejo que se le da a los desechos, y la necesidad de establecer un método para la valorización de residuos como herramienta para lograr una utilidad de estos, ya sea como materia prima o para la generación de energía.

Adicionalmente, los procesos de valorización de RSO permitirían disminuir el impacto de estos en las personas y en el medio ambiente. Partiendo de lo anterior, se plantea la siguiente pregunta: ¿Cómo valorizar residuos sólidos orgánicos para obtener productos de utilidad y que disminuyan su impacto sobre el medio ambiente?

Justificación

Las repercusiones por el aumento y la no adecuada disposición y tratamiento de los residuos sólidos orgánicos, implica el establecimiento de medidas y estrategias para su valorización, esto con el fin de disminuir su impacto en el medio ambiente y de cambiar la concepción acerca de productos con un ciclo de vida único. Es importante resaltar que, debido a sus propiedades los RSO tienen el potencial de contribuir dentro de tecnologías que son diseñadas para mejorar la calidad del medio ambiente. De igual manera, al desarrollar procesos de valorización se busca favorecer con estrategias de economía circular que hacen énfasis en el ciclo de la vida de los productos (donde se brinda nuevamente funcionalidad a todos aquellos productos antes de ser desechados completamente). Al desarrollar los procesos de valorización de los RSO, se pretende contribuir ya sea de manera directa, como en el caso de la obtención de fertilizantes, o de manera indirecta en la creación de materias primas para su implementación en otros procesos como es el caso de la aceleración de las reacciones en el tratamiento de aguas residuales. Adicionalmente, se reducen los volúmenes de residuos que ingresan a los vertederos o son trasladados a incineradores al aire libre que generan enfermedades respiratorias para las personas que habitan esas zonas y altas emisiones de gases de efecto invernadero, de este beneficio surgen otras mejoras para la calidad del ambiente disminuyendo la contaminación del agua y suelo por la filtración de lixiviados de las basuras, mejora de la calidad del aire y recuperación de la capa de ozono.

Objetivos

Objetivo General

Desarrollar un proceso de fermentación en estado sólido para la obtención de proteínas durante la valorización de residuos orgánicos en reactores a escala laboratorio.,

Objetivos Específicos

1. Identificar los residuos sólidos orgánicos susceptibles de valorización para la obtención de proteínas.

2. Determinar las características de los sustratos para la definición de la mezcla de fermentación.

3. Efectuar la fermentación siguiendo los parámetros operacionales para la obtención de las proteínas.

Hipótesis

Los residuos orgánicos resultan ser vitales como sustrato en los procesos de fermentación aeróbica dado que su valorización permite la producción de proteínas donde la cantidad se determina a partir del adecuado control y parametrización del proceso.

Delimitación Del Proyecto

El proyecto se llevará a cabo en la Universidad Cooperativa de Colombia seccional Bogotá ubicado en la dirección Avenida Caracas # 37 – 63 específicamente en el laboratorio de Biotecnología del bloque 15-505. Se desarrollará un proceso de fermentación en estado sólido

para obtener proteína con un tiempo pronosticado de máximo un año, es decir, a finales del segundo semestre del año 2019 se espera tener el proyecto terminado.

Marco Referencial

Marco Teórico

La valorización es un aspecto importante en la investigación ya que, ayuda a la implementación de la economía circular, además, contribuye positivamente en el entorno disminuyendo los impactos ambientales y generando nuevas alternativas para la creación e innovación de empresas dedicadas a los procesos de reutilización de desechos obteniendo como producto materias primas e incluso la implementación de estos en las industrias con el fin de hacerlas auto sostenibles y amigables con el entorno. Esto se logra al utilizar los diversos tipos de residuos generados, tales como, no peligrosos, domésticos, industriales, institucionales, mercados, agroindustriales, no orgánicos, orgánicos, entre otros. En el caso de la investigación se hace énfasis en los residuos orgánicos de naturaleza vegetal, por sus factores benéficos para el proceso de fermentación donde se puede resaltar que tienen un alto porcentaje de nitrógeno además de una relación C/N alta (García & Gómez, 2016), la alta concentración de nutrientes facilita la obtención de pectina, fibra, molasas, D-limineno, etanol, limonoides, flavonoides y proteínas.

Además, se estima a nivel mundial una producción de residuos vegetales aproximadamente de 20 millones de toneladas compuestas por cáscaras, semillas y pulpas. En Colombia la ciudad que más genera residuos es Bogotá, su centro de abasto es Corabastos S.A. en donde genera una cantidad promedio de 2.100 toneladas de residuos mensuales, sobrantes del

comercio entre mayoristas y minoristas de los cuales el 50% corresponde a verduras, seguido de las frutas con un 14% y el 36% corresponde a otro tipo de residuos que no hacen parte del alcance de esta investigación (Peñaranda et al., 2017).

Los residuos orgánicos que tienen una mejor proyección para ser usados como sustratos en el proceso de SSF, incluyen los productos agrícolas y residuos forestales en los que se encuentra bagazo de caña o yuca, salvado de arroz, avena o soja, pulpas de fruta y cáscaras de diversos orígenes que están compuestas por celulosa, hemicelulosa, lignina, almidón, pectina y otras fibras, (Soccol et al., 2017). Igualmente, para poder ejecutar un adecuado proceso se debe evaluar los tipos de cepas a emplear que contribuyan positivamente en el proceso, para la investigación se empleara cultivos mixtos que provienen de los lodos activos de las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTARS) (Grande, 2016).

Antes de iniciar con el método SSF se debe realizar pretratamientos generalmente a los sustratos para tener un mejor rendimiento y potencial en la obtención de enzimas, estos son métodos como pretratamientos físicos, mecánicos, térmicos, ultrasonidos, químicos, biológicos y combinados. El método de pretratamiento físico se emplea cuando en los procesos se tiene problemas como la baja degradación de los sustratos, bajo rendimiento y la inestabilidad de los pasos o procesos de fermentación, por medio de tratamiento de molienda y homogenización a alta presión, que puede incrementar el rango de la hidrólisis e incrementar la biodegradación. En segundo lugar, se encuentran los pretratamientos mecánicos, donde su principal objetivo es reducir las dimensiones de los sustratos mejorando la ruptura de sus paredes celulares, las operaciones para realizar esta división son la reducción de tamaño, separación por tamaño, densidad, por campo electromagnético y compactación, donde los resultados ayudan a mejorar la velocidad y eficiencia de la hidrólisis (Martínez & García, 2016).

También, se tiene el método de pretratamiento térmico, como su nombre lo indica se emplea el calentamiento de los sustratos a una temperatura determinada según el tipo, en el caso de enzimas como la celulasa se puede evidenciar la utilización aproximadamente de 60 °C en las experimentaciones realizadas, obteniendo como resultado mayor eficiencia de solubilidad. Otro proceso es el pretratamiento por ultrasonido permitiendo reacciones físico-químico que pueden modificar significativamente la estructura de los materiales presentes, los sonidos propagados en formas de ondas con diferentes longitudes e intensidades, donde se evidencia la utilización de bajas frecuencias aproximadamente de 20 y 40 KHz con una intensidad de 50-80 W y hasta más de 20000 W, donde un pretratamiento de 15 min de zonificación incrementa la demanda química de oxígeno inicial (COD) desde 50 mg/L hasta valores de 2500 mg/L, obteniendo incrementos en la solubilidad y biodegradación (Martínez & García, 2016).

Otro método es el pretratamiento por químicos "incluye álcalis (hidrólisis alcalina y peróxido alcalino), procesos organosolvados, oxidación húmeda (tratamientos con agua, aire u oxígeno a temperaturas sobre los 120ºC por períodos de 30 minutos), oxonólisis (tratamientos con ozono), pre tratamientos de hidrólisis ácida (ácido sulfúrico es el más aplicado)" , donde se evidencian diferentes agentes alcalinos como: NaOH, KOH, Mg, y Ca donde se muestra el proceso adicionando dosis de NaOH a los sustratos en temperatura ambiente (25ºC) con tiempo de retención de 24 horas, después, debe ser filtrada en malla de nylon mesh de 20 micrones, todo esto se emplea para tener resultados mejores con respecto al rendimiento de la enzima (Martínez & García, 2016).

También, el objetivo de realizar un pretratamiento biológico a los sustratos contribuye a la degradación enzimática por medio de las bacterias o microorganismo, de esta última categoría podemos destacar la carmelita, blanco y suaves putrefactos (Martínez & García, 2016), lo cual,

se obtiene mejoras en la hidrólisis enzimática, asimismo, el recuperamiento de azúcar se ve beneficiado. Estos pretratamientos se aplican para obtener un producto más efectivo y exitoso después de la SSF, por lo que se aplican diferentes técnicas de las mencionadas para mejorar la biodigestibilidad y aumentar el desarrollo de enzimas.

La fermentación en estado sólido (SSF) tiene como principal objetivo la valorización de residuos orgánicos, este proceso se ejecuta debido a sus bajos costos, sencillez, menor energía, mayor rendimiento de producción, productos más puros y en concentraciones más altas con facilidades para su extracción, además, este proceso se realiza con un estricto control en la humedad que beneficie el crecimiento y reproducción de microrganismos, así mismo, se estipula que es importante utilizar microorganismos adecuados (Grande, 2016).

En cuanto a los parámetros para la adecuada ejecución del método SSF se debe tener en cuenta "el tamaño de partícula, la porosidad del sustrato, la composición química, los ingredientes del medio de cultivo, la disponibilidad, la estabilidad, la esterilización del medio, la agitación, la aireación, la humedad, el intercambio de calor, el mezclado y el costo de producción" (Grande, 2016), todo estos parámetros serán de gran ayuda para la creación del biorreactor donde se llevará a cabo la fermentación en estado sólido, además, en este proceso se implementará un sistema aeróbico ya que el "oxígeno es de vital importancia para la respiración y el crecimiento de los microorganismos, al mismo tiempo, el dióxido de carbono es eliminado por el aire restante que no es consumido por la biomasa (bacterias, hongos, células vegetales, etc.)" (Cheng, 2004), por tanto, la disolución del oxígeno del aire es un parámetro que controla la velocidad donde se tiene la mayor eficiencia si se eleva la presión de los fermentadores a varias atmósferas.

Es adecuado controlar también la productividad ya que al aumentarla implica agregar más concentración de nutrientes y biomasa, es decir, son variables directamente proporcionales, por consiguiente, la demanda de aire aumenta y esto genera problemas debido a que a mayor tasa de consumo de oxígeno mayor será la producción de dióxido de carbono lo cual puede generar retrasos en el crecimiento de la biomasa o incluso en casos extremos la muerte de los microrganismos por envenenamiento en el proceso SSF. Un método de control es medir el nivel de la concentración de dióxido de carbono en el escape del fermentador. En el caso de la investigación, en el biorreactor se puede establecer límites controlables a la hora de aumentar la producción o la concentración de cepas microbianas, así mismo, se debe tener en cuenta que existen diversos métodos para la concentración de biomasas, disminuir la presión en los recipientes, implementar oxígeno puro, aumentar la productividad, entre otros (Cheng, 2004).

Ahora bien, para obtener resultados positivos se deben implementar los biorreactores, su objetivo principal es evaluar, modificar y controlar los parámetros mencionados anteriormente por medio de sus instrumentos integrados generando un entorno interno ideal para la SSF, además, tiene como beneficios mejorar la eficiencia, aumentar la productividad y disminuir los costos ya que es un método económico. Las principales funciones son la duración larga de los procesos en el tanque evitando la aparición de agentes contaminantes, también, el consumo de energía es el mínimo posible, es factible el control de nutrientes, el pH, la transferencia de calor interna entre entorno y matriz, mantiene la distribución uniformidad en el cultivo y se podría decir que se comporta como un cultivo puro (Patron & Rodriguez, 2014).

También, se debe tener en cuenta a la hora de emplear o diseñar un biorreactor las condiciones físicas del sustrato y el tipo de producto que se quiere obtener después de la SSF, por ejemplo, si se tiene un sustrato sólido con baja humedad entonces se pueden tener tres

productos con diferentes procesos, el primero sin agitación obteniendo resultados como el Tempeh (alimento tipo pastel), en segundo lugar está un proceso con agitación ocasional donde se evidencia resultados como la salsa de soya y en el tercer lugar está con agitación constante produciendo la aflatoxina (Grande, 2016).

La SSF se puede desarrollar en dos tipos de sistemas, por un lado, en reactor estático y por otra parte con agitación ocasional o constante. Esta última se compone de cuatro subsistemas basados en la necesidad de agitación (con agitación y con aireación forzada, con agitación y sin aireación, sin agitación con aireación y sin agitación ni aireación) para obtener enzimas, aflatoxina y ocratoxina (Grande, 2016). También, existen diversos tipos de biorreactores entre los más comunes e implementados para la SSF están el biorreactor de columna, columna estéril, bandeja, tambor y lecho fijo.

Posteriormente, al realizar este procedimiento correctamente se obtienen residuos como producto crudo de la fermentación que son utilizados como fuente para la obtención de enzimas, donde estas tienen la función principal de servir como catalizadores biológicos o también conocidos como biocatalizadores haciendo que las reacciones químicas sean más rápidas. Además, estas enzimas se clasifican según la función del tipo de reacción que catalizan en seis clases: oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas, para la investigación se profundiza en la clase tres (hidrolasas) ya que estas se emplean para procesos donde interviene la molécula de agua, es decir, la ruptura hidrolítica (Plou, 2016).

Finalmente, se utilizan métodos como la cuantificación de proteínas, como su nombre lo indica, que radica en la cuantificación exacta de proteínas ya que es esencial para los experimentos, existen diversos modelos entre los más conocidos están el ensayo Bradford o azul brillante de Coomassie de 470 nm y el modelo de Lowry 750 nm (Mary, 2012).

Marco Conceptual

Valorización: En Colombia según el Decreto 4741 de 2005 establecido por el Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial (MAVDT), define la valorización como "el proceso de recuperar el valor remanente o el poder calorífico de los materiales que componen los residuos o desechos peligrosos, por medio de la recuperación, el reciclado o la regeneración" (Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial, 2005, 30 de diciembre), un concepto más claro generado por la empresa Resiter dedicada a la gestión de residuos donde establece que la valorización consiste en " todo procedimiento que permita el aprovechamiento de los recursos contenidos en los residuos sin poner en peligro la salud humana y sin utilizar métodos que puedan causar perjuicio al medio ambiente. De esta manera los residuos adquieren un valor, al poderse aprovechar como materia prima o para generar energía" (Resiter, 2019).

Residuos orgánicos: Se puede establecer como los residuos derivados de la comida son biodegradables, es decir, los residuos se pueden descomponer por la influencia de diversos agentes biológicos y otros factores, por lo tanto, al transcurrir un determinado tiempo se convierte en un tipo de materia orgánica (Jaramillo & Zapata, 2008), al igual que los tipos de residuos generales estos tienen diversas clasificaciones entre las más importantes están: según su fuente de generación y su naturaleza y/o características físicas.

Sustrato: "Debido a que muchos microorganismos metabolizan diferentes polímeros naturales con el fin de obtener la energía necesaria para su existencia", entonces, para su buen desarrollo se requiere un compuesto que tenga características ideales para la mantención y desarrollo óptimo, por tanto, se emplea generalmente por economía los residuos orgánicos para que las bacterias crezcan en la superficie de las fibras o partículas del sustrato poroso y el

micelio de los hongos penetre las partículas para nutrirse y reproducirse, sin embargo, estos deben ser analizados si cumplen con los requerimientos de proteína, carbohidratos, cenizas, macro y micro elementos y humedad (Grande, 2016).

Cepas microbianas: Son un conjunto de microorganismos (bacterias, hongos, y protozoos) que generalmente tienen iguales características biológicas, estos son generadas de los residuos vegetales, desechos urbanos, procesos agroindustriales, procesos como las plantas de tratamiento de aguas residuales, entre otros. También, estas cepas se emplean como complemento para "la degradación de materiales lignocelulósicos por su capacidad de sintetizar enzimas extracelulares hidrolíticas y oxidativas en altas cantidades" (Grijalva, 2013).

Fermentación en estado sólido (SSF): Sus siglas provienen del inglés Solid State Fermentation, es un proceso de fermentación en el cual se busca producir enzimas, por el crecimiento de microrganismos provenientes en la mayoría de los casos de sustratos agroindustriales que se consideran los mejores para este proceso, por lo general se usan productos como salvado de trigo, salvado de arroz, residuos de yuca, aceite de palma, desechos de plátano, desechos de té, pastel de aceite de coco, médula de coco, mazorcas de maíz entre otros, el flujo de agua durante este proceso es mínimo o nulo dependiendo de las condiciones que se necesiten para el sustrato (Pandey, et al., 2017).

"Es caracterizada por un proceso de fermentación sobre un soporte solido el cual tiene un bajo contenido de humedad y ocurre en estado no aséptico y natural, la SSF produce una alta concentración de producto con un relativamente bajo requerimiento energético, además, esta puede ser llevada a cabo sobre una variedad de residuos agrícolas tales como paja de trigo, cascarillas de arroz, tusa de maíz, entre otros" (Robinson, et al., 2002).

Temperatura: Este es un parámetro importante para el método SSF ya que influye directamente en la velocidad de crecimiento de los microorganismos, por tanto, es de vital importancia definir un rango de temperatura ideal donde el crecimiento es óptimo, ya que fuera de este rango el crecimiento puede demorarse o incluso no ejecutarse, además, es ideal introducir un sistema de aireación ya que la transferencia de calor aumenta las condiciones térmicas que pueden afectar a las cepas y el desarrollo del proceso (Ballardo, 2016).

Aireación: Este es uno de los factores relevantes ya que tiene diversas funciones como son la supervivencia de los microorganismos, la eliminación del dióxido de carbono y calor de la fermentación, así mismo, "distribuye los vapores de aguas de los metabolitos gaseosos y volátiles producidos, que evitan la producción de enzimas" (Ballardo, 2016), también, es importante saber que algunos microorganismos requieren una aireación constante, al no obtenerla se pueden evidenciar resultados como "retardo en la descomposición, la aparición de sulfuro de hidrógeno y la producción de malos olores. Por otro lado, el exceso de ventilación podría provocar el enfriamiento de la masa y una alta desecación" (Ballardo, 2016).

Humedad: esta variable influye significativamente en el desarrollo microbiano, esta se calcula respecto a la cantidad de líquido presente en la matriz formada por los microorganismos y la cepa donde se evidencia que un rango optimo es de 40 a 60%, además, se establece que un alto nivel de "humedad da como resultado una baja porosidad del sustrato que a su vez impide la penetración y circulación de aire en la matriz, mientras que un bajo contenido de humedad conduce a una mala difusión de los nutrientes que obstaculizarán el crecimiento microbiano" (Ballardo, 2016).

Tamaño de partícula: Este hace referencia al tamaño de la matriz sólida, donde está establecido que la velocidad de reacción es proporcional a la superficie expuesta al ataque

microbiano. Ahora bien, es necesario controlar el tamaño de las partículas porque al ser más pequeño genera mayor superficie de contacto aumentando la velocidad del proceso, pero a su vez se corre el riesgo que el espacio que queda entre las partículas sea menor, lo que causaría un incremento en la fuerza de fricción, generando un impacto negativo con respecto al oxígeno y al CO2 causando daños a las cepas microbiana (Ballardo, 2016).

PH: En los procesos SSF se autorregula, pero es difícil supervisar y controlarlo, debido a la naturaleza de los materiales fermentados por ser sólidos en ausencia de agua libre, por tanto, es importante tener un seguimiento constante del pH del proceso y que esté dentro de los parámetros en los cuales los microorganismos puedan sobrevivir, además, para evitar la contaminación de tipo bacteriana, donde los valores óptimos estipulados por Haug, están entre 5 y 8 (Ballardo, 2016).

Agitación: La adecuada agitación "garantiza la homogeneidad con respecto a partículas y la humedad. Adicionalmente, promueve la transferencia de calor y materia, y la distribución uniforme de los nutrientes añadidos gradualmente durante el curso de la fermentación" (Ballardo, 2016), sin embargo, se debe tener precaución con los daños como reducción de la porosidad de los sustratos y la afectación directa de los resultados sobre los productos finales y su tiempo de duración proyectado.

Biorreactor en columna: Es un equipo generalmente hecho en vidrio, con unas dimensiones aproximadamente de 4 cm de diámetro con 20 cm de altura, este se llena previamente con un medio previamente inoculado y puesto en un termorregulador de agua, además, este es fácil de controlar ya que tiene integrado un sistema de aireación, así mismo, es fácil para la obtención de CO2 resultado de la respiración del microorganismos y sus reacciones metabólicas, entre las ventajas esta la facilidad de montaje, monitoreo, económico, control de la

humedad y temperatura, sin embargo, se dificulta la toma de muestras ya que por su tamaño se debe sacrificar una de ellas completas para analizar los parámetros deseados (Patron, & Rodriguez, 2014).

Biorreactor de columna estéril: Es un biorreactor similar al anterior, sin embargo, las proporciones y su sistema son más avanzados, su diseño es recreada a escala del biorreactor en columna desarrollado en el año 2000, este reactor trabaja con un volumen de 1 litro, además, cuenta con un sistema integrado para controlar la variables de humedad (si es necesario se puede modificar al introducir agua al sistema), aireación y temperatura, entre sus ventajas se encuentra que es un biorreactor que se puede extraer muestras con facilidad sin correr riesgos que se contamine el resto de la fermentación esto se logra ya que en la parte superior cuenta con un sistema de flama, entre sus desventajas esta la formación de gradientes de concentración de O2 y nutrientes (Patron & Rodriguez, 2014).

Biorreactor de bandeja: Utiliza una tecnología simple, esta biorreactor no requiere proceso de aireación ya que debido a su diseño tipo bandeja permite el flujo de aire en el sustrato, además, permite controlar manualmente la humedad y la temperatura, así mismo, este equipo debe emplear pequeñas cantidades de sustrato por bandeja para evitar un sobrecalentamiento, está diseñado por las bandejas donde se coloca el sustrato de plástico o aluminio generalmente, las ventajas que resaltan son sus bajos costos, la fácil de analizar los parámetros, sin embargo, es muy poco utilizado para procesos industriales debido a las grandes dimensiones que ocupa el biorreactor y la dificultad de adaptación a gran escala (Grande, 2016).

Biorreactor de tambor: Consiste en un equipo que mantiene la agitación basado en la rotación el vaso completo o utiliza otros dispositivos como remos y deflectores, así mismo, permite la aireación lo cual evita un excesivo calor que pueda afectar la fermentación en el

proceso de inoculación, debido a la rotación asegura que los microorganismos obtengan los nutrientes uniformemente, sin embargo, si se utiliza una cepa formada por hongos puede ser afectado por la rotación pero en términos generales es un proceso más eficiente que el biorreactor de bandejas (Grande, 2016).

Biorreactor de lecho fijo: Su forma es tipo columna generalmente de materiales como vidrio o plástico, este se divide en dos, su parte superior se encuentra el sustrato separado por una lámina de vidrio que tiene un orificio el cual conecta la parte inferior para la aireación forzada que es relativamente húmeda de acuerdo a las necesidades del sustrato, en las pruebas de laboratorio se emplean biorreactores de 30 cm donde la temperatura se controla con baños de agua, en estos tipo de equipo se ha obtenido productos como ácidos orgánicos, metabolitos secundarios y enzimas, sus desventajas es la dificultad de extraer muestras, así mismo, la transferencia de calor y el crecimiento no uniforme del inóculo (Grande, 2016).

Enzima: Estas son conocidas como catalizadores biológicos o biocatalizadores, generan un impacto en las reacciones químicas, pues incrementan su velocidad. Las enzimas están definidas como proteínas y estas se conforman por el grupo amino (NH2) - carboxilo (COOH), también, su información genética se almacena en una secuencia lineal escrita en un código de cuatro letras: adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T), esto se emplea para determinar la cantidad de aminoácidos que las conforman generalmente las muy pequeñas tiene una cantidad de 60 y las enormes de 2500 (Plou, 2016).

Ensayo Bradford: Emplea una formación de complejo entre el colorante azul brillante de Comassie y las proteínas, sus límites de detección son de 20-2000 ug/ml presentando ventajas de compatibilidad con agentes reductores y obteniendo resultados rápidos, pero, es incompatible con detergentes. El método se basa en la observación del colorante Coomassie, azul brillante G-

250, existen dos tonalidades, rojo y azul, la primera cambia a color azul al unirse con la proteína. Esta unión proteína colorante es muy sensible a la medición de la proteína, lo que se busca es generar un cambio en la absorción máxima del tinte de 365 a 595 nm que permita su medición (Bradford, 1976).

Estado Del Arte

A continuación, se hará énfasis en todas las investigaciones encontradas relacionadas con el proyecto que tiene como fin el desarrollo de un proceso de fermentación en estado sólido (SSF) para la obtención de proteínas durante la valorización de residuos orgánicos en biorreactores a escala laboratorio. Se iniciará con la caracterización de los residuos teniendo en cuenta sus aplicaciones relevantes, posteriormente, se evidenciarán los procesos y los respectivos parámetros que se sometieron en las SSF con diversos sustratos que hacen similitud al enfoque de la investigación.

En el país, la disposición de los residuos depende netamente de los servicios de aseo, y esto implica e en algún momento van a colapsar. La industria de los alimentos es la que más desechos genera, sin embargo, también es de la cual se pueden aprovechar dichos residuos en mayor cantidad. Existen distintas formas de hacerlo, dentro de este grupo se puede destacar la valorización biológica y química, que consiste en una tecnología que se encarga de realizar un tratamiento a los residuos orgánicos, con el fin de generar gases, líquidos o sólidos en donde su objetivo final es la comercialización. Existen otros procesos como el compostaje y la lombricultura. (Yepes et al., 2008). Otra transformación de la que es posible hablar es el biosecado, que consiste en una remoción de la humedad presente en los residuos ya que se hace uso del incremento del calor que se desprende del proceso generado por la actividad de los

microorganismos y además de la constate oxigenación que se le realiza al proceso. Para residuos orgánicos esta técnica es muy interesante (Robles et al., 2013).

Por otra parte, existen ciertos tipos de aplicaciones en donde se puede observar la integración de diferentes procesos, un ejemplo claro es la obtención de combustible ecológico a partir de la fermentación alcohólica de cáscara de naranja y piña, donde como primer paso se determina la cantidad de azúcar que contienen estos residuos, posteriormente, se redujo el tamaño de la muestra y a su vez se aplicaron tratamientos de remoción de lignina con hidróxido de sodio y sulfato de calcio, después, para la obtención del jarabe se somete a una prueba de hidrólisis con las siguiente compuestos y parámetros como el ácido sulfúrico al 5% con una temperatura de 125ºC y 15 psi. Luego, se implementa el método de fermentación con Saccaharomyes cerevisiae en un reactor de tipo agitador, este proceso tardo un tiempo de siete horas para poder obtener el etanol, este fue evaluado por cromatografía de gases lo cual arrojo un resultado de 8,4 mg/g siendo la cáscara de naranja más efectiva que la cáscara de piña con una diferencia de 7,4 mg /g (Tejeda et al., 2010).

Investigaciones revelaron que la implementación de algunos desechos alimenticios, han logrado impactar de forma positiva las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) para la remoción del cromo, donde se evidencia que se emplearon varios tipos de residuos y los resultados obtenidos fueron positivos pues gracias a dichos residuos se evidencia un máximo porcentaje de remoción del 66,8% para un pH de 3 y una relación de 6 g/L en una muestra que contenía 100 ppm de cromo (Garcés & Coavas, 2012).

La fermentación en estado sólido es un proceso ecológico que ocurre cuando hay poca agua o no hay nada de ella, en donde se hace uso de sustratos naturales con el fin de que sea la fuente de energía. Ocurre en una fase sólida discreta en donde las partículas húmedas son el sitio

propicio para el crecimiento de microorganismos desde la superficie, hasta el interior y entre ellas. Además, existe una fase gaseosa entre las partículas (Ballardo, 2016). La fermentación en estado sólido (SSF) ha sido exitosa para llegar a producir enzimas y metabólicos secundarios que están directamente relacionados con el crecimiento microbiano y que, a su vez, se producen a escala industrial para ser empleados en la agricultura y ayudar para tratar enfermedades. Se debe tener en cuenta que muchos de estos metabólicos también se producen en fermentaciones liquidas sumergibles (SmF) pero según investigaciones, se ha demostrado que tal método de producción revela ser menos efectivo que la fermentación en estado sólido, pues cuando se desea hacer una producción a niveles grandes, los costos y la demanda energética se aumentan de forma considerable. Las ventajas de la SSF es que genera productos más estables, el costo energético es bajo y la separación de productos se ve beneficiada por fermentadores de menor tamaño (downstream) (Robinson et al., 2002)

Igualmente, se puede identificar procesos de evaluación con respecto a la integración entre residuos orgánicos y cepas nativas, donde se busca evidenciar cual es la mejor relación para la obtención de proteínas, en una investigación desarrollada por Gutiérrez, L, Pérez, J, & Albero, M, se puede observar la experimentación de tres residuos orgánicos (lajas de madera, hojas de bambú y hojarasca de mango) como sustratos con tres cepas nativas (Trichoderma reesei, Cladosporium herbarum y Aspergillus Níger), lo que se realiza en la experimentación es determinar la producción de β-exoglucanasa, β-endoglucanasa y β-glucosidasa en cada uno de los sustratos combinados con las diferentes cepas, los resultados obtenidos fueron el nivel más alto de β-exoglucanasa lo obtuvo la cepa Cladosporium herbarum con un resultado de 0,0554 Ul/mL, con respecto al resultado más alto de producción de β-endoglucanasa fue la cepa Aspergillus Níger con un resultado de 0.02463UI/mL y finalmente en cuanto a mejor actividad

de β -glucosidasa fue la cepa Trichoderma reesei con un resultado de 0.000138UI/mL, siendo esta última cepa la mejor actividad celulítica (2012).

Teniendo en cuenta la información anterior, y habiendo hecho la valorización y la Fermentación en Estado Sólido, es momento de pasar a la determinación de las proteínas que se definen como biopolímeros formados por el grupo Amino – Carboxilo, estos son muy diversos en cuanto a sus estructuras y funciones. En los alimentos, se hacen presentes en una combinación entre los carbohidratos o lípidos conformando de ese modo el contenido total de proteínas. (Navarro, 2017). Existen técnicas básicas para determinar la cantidad de proteína concreta en muestras biológicas. Los métodos que pueden usarse se basan en: 1) las proteínas que pueden generar una absorción de luz UV 2) La creación de productos químicos, o 3) la versatilidad con la que las proteínas pueden unirse a colorantes (Fernandez & Galván, SF).

El uso del método Bradford es uno de los mejores debido a su unión entre las proteínas y el colorante, Comassie Blue G-250 (también Serva Blue). Existen dos formas, naranja o azul en una solución iónica. Se forma un complejo. La proteína forma un complejo con la parte azul del colorante y este posee un coeficiente mayor al del colorante libre. Las ventajas de este método para la cuantificación de proteínas consisten en que posee una alta sensibilidad (1-15 µg) y existen pocos interferentes que afectan su determinación, entre ellos se encuentran los detergentes (Fernandez & Galván, SF).

Finalmente, en la tesis elaborada por Gualberto Gerardo León Revelo realizada en la universidad de Camagüey de Cuba, se evidencia la incursión en el mismo tema donde es posible observar que las proteínas actualmente tienen una gran demanda en los diferentes procesos industriales tales como: “los procesos de extracción de jugos, la industria del papel, la industria textil, la industria de detergentes enzimáticos y sobre todo en la producción de biocombustible y

de cerveza" (León, 2017), sin embargo, por sus elevados costos de producción se buscar procesos alternativos como es la fermentación sólida que es un proceso muy eficiente y de bajo costo.

Así mismo, muestra los cosustratos más empleados debido a su capacidad de adaptabilidad, crecimiento en un entorno sólido y la amplia gama de enzimas extracelulares producidas por los hongos filamentosos tales como Aspergillus niger, Trichoderma viride y Trichoderma reesei, sin embargo, en la tesis desarrollada por Gualberto Geraldo León Revelo se establece que a partir de una profunda indagación se pudo observar que a la hora de definir los parámetros y las variables que influyen en el desarrollo óptimo de la fermentación sólida en los biorreactores se deben tener en cuenta aspectos nutricionales, ambientales, desarrollo de modelos cinéticos entre otros, con el fin de pronosticar el comportamiento interno de la fermentación dentro del biorreactor (2017).

Por tanto, inicia la investigación definiendo los tipos hongos que son más pertinentes debido a sus características antes mencionadas, posteriormente, establece que es necesario escoger un apropiado sustrato base ya que este dará el soporte y nutrientes necesarios para el crecimiento del cultivo de microorganismos, además, se debe evaluar que este tipo de sustrato cumpla con el balance adecuado de magnesio, fosforo, potasio, azufre y calcio como componentes complementarios para el sustento de los microorganismos.

Además, establece que gran cantidad de autores que han incursionados en los procesos olvidan el procedimiento de aireación, lo cual genera un gran problema ya que los microorganismos requieren de oxígeno para su supervivencia y generalmente como se desarrolla el proceso a escala de laboratorio no es tan influyente en los resultados, además, se menciona que al inyectar oxígeno a los biorreactores se regula el calor y a su vez, permite el intercambio de

oxígeno con CO2, también, se estipula que para un rendimiento óptimo se requiere un 30% en el sistema (León, 2017).

Así mismo, se debe tener en cuenta los requerimientos ambientales tales como pH, temperatura, humedad y la forma de inoculación, por ejemplo, en la producción de enzimas es adecuado un pH entre un rango 4,5 y 5 con el cual se obtuvo la mejor generación de enzimas (Das & Col., 2013; León, 2017), esto se debe a que, para presentar la producción de proteínas extracelulares, se requiere un aumento considerable en el pH, caso contrario cuanto hay bajo contenido del mismo, pues se inhibe el crecimiento de los hongos. Adicionalmente, se debe tener en consideración que la temperatura es directamente proporcional a la velocidad de reacción, por tanto, se establece que el óptimo rango de temperatura esta entre 20 y 50ºC, ahora bien, con respecto a la humedad debe estar entre un 40% y 80%.

En cuanto a mejorar los resultados y el rendimiento del proceso de fermentación se establece pretratamientos como son: pretratamiento químico acido, el cual se consigue con la exposición de proteínas, alcanzando una alta eficiencia para la digestión de las enzimas (León, 2017). También, se resaltan las ventajas que tiene manejar la fermentación solida ya que procede a simular un entorno más natural para los microorganismos, los bajos costos de los sustratos, tiene una filtración de oxígeno más sencilla, es medioambientalmente amigable, presenta bajo consumo de energía y generación de aguas residuales bajas (Pandey, 2003; León, 2017).

Además, es posible emplear algunos métodos para llevar seguimiento al crecimiento de la biomasa presente en los hongos como son la caracterización, implementación de ecuaciones para modelos empíricos y no parametrizados como es la ecuación de Monod, también, se puede emplear modelos para establecer la producción de las enzimas es recomendado la ecuación de Luedeking y Piret la cual se analiza la evolución de la producción de enzimas al transcurso del

tiempo y las variables que influyen en el proceso, es uno de los modelos más empleados en la investigación de producción de enzimas (León, 2017).

Marco Legal

Decreto No. 351 del 19 de febrero de 2014. "Por el cual se reglamenta integralidad de los residuos en la atención en salud y otras actividades"

Artículo 1. Objeto. "El presente Decreto tiene por objeto reglamentar ambiental y sanitariamente la gestión integral de los residuos generados en la atención en salud y otras actividades."

Artículo 2. Ámbito de aplicación. "Las disposiciones establecidas mediante el presente decreto aplican a las personas naturales o jurídicas, públicas o privadas que generen, identifiquen, separen, empaquen, recolecten, transporten, almacenen, aprovechen, traten o dispongan finalmente los residuos generados en desarrollo de las actividades relacionadas con:" "4. Bioterios y laboratorios de biotecnología."

Artículo 3. Principios. "El manejo de los residuos regulados por este decreto se rige, entre otros, por los principios de bioseguridad, gestión integral, precaución, prevención y comunicación del riesgo." Política nacional para la gestión integral de residuos sólidos, 21 de noviembre de 2016. Elaborado por el Consejo Nacional de Política Económica y Social (CONPES) con el objetivo general de "Implementar la gestión integral de residuos sólidos como política nacional de interés social, económico, ambiental y sanitario, para contribuir al fomento de la economía circular, desarrollo sostenible, adaptación y mitigación al cambio climático." (Ministerio de salud y protección social, 2014, 19 de febrero).

Resolución 1045 del 26 de septiembre de 2003. "Por la cual se adopta la metodología para la elaboración de los Planes de Gestión Integral de Residuos Sólidos, PGIRS, y se toman otras determinaciones." (Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial, 2003, 26 de septiembre).

Normas Técnicas Colombianas Sobre Residuos Sólidos

GTC 86 del 22 de octubre de 2003. "Guía para la implementación de la gestión integral de residuos -GIR- "Objetivo: "Esta guía presenta directrices para realizar una gestión integral de residuos, considerando las siguientes etapas de manejo: generación (minimización), separación en la fuente, presentación diferenciada, almacenamiento, aprovechamiento, transporte, tratamiento y disposición de los residuos; todas estas actividades enmarcadas dentro de un ciclo de mejoramiento continuo. Esta guía, por ser de carácter general, está orientada para ser aplicada por generadores de residuos de tipo doméstico, industrial, comercial, institucional o de servicios." (ICONTEC, 2003, 22 de octubre)

GTC 53-7 del 26 de abril de 2006. "Guía para el aprovechamiento de residuos sólidos orgánicos no peligrosos. "Objetivo: "La presente guía suministra información sobre métodos de aprovechamiento de los residuos orgánicos no peligrosos. El criterio empleado para la selección de los métodos descritos en esta guía se basa principalmente en el alto nivel de utilización que tienen a nivel nacional e internacional. Esta guía pretende aportar herramientas para el aprovechamiento dentro de un programa de gestión integral de los residuos orgánicos (véase la GTC 86)." (ICONTEC, 2006, 26 de abril)

Diseño Metodológico

Tipo De Investigación

El tipo de investigación que se realiza es cuantitativo ya que se requiere el análisis de los parámetros operacionales que serán esenciales para que se desarrolle el proceso de fermentación. Las variables tienen valor numérico como es la temperatura, aireación, agitación, humedad, tamaño de partículas, velocidad de consumo de oxígeno, caracterización del sustrato entre otras. Además, el estudio es de tipo exploratorio.

Metodología

1. Revisar los diferentes referentes bibliográficos sobre el desarrollo de los procesos de SSF en los residuos agrícolas.
2. Identificar los residuos orgánicos agrícolas susceptibles de ser tratados con procesos de fermentación en estado sólido
3. Recolectar los residuos orgánicos empleados en el proceso de SSF como sustrato y los diferentes elementos que interactúan como cosustrato y formación de matrices
4. Realizar los análisis fisicoquímicos tales como: contenido de humedad y materia seca, materia orgánica, pH, nitrógeno Kjeldahl.
5. Pretratamiento de los residuos orgánicos para la implementación del proceso de fermentación aeróbica.
6. Desarrollar el proceso de fermentación en estado sólido con base en los residuos escogidos establecidos

Método De Investigación

Para llevar a cabo el desarrollo de la propuesta se realizarán las siguientes actividades:

1. Revisión en las diferentes bases de datos acerca de procesos SSF con residuos agrícolas a nivel nacional e internacional.
2. Diagnóstico de los diferentes residuos que sean susceptibles de generar proteína por procesos de fermentación aerobia, y que se ubiquen en la zona de Cundinamarca con el fin de que su cantidad sea considerable y permita la continuidad del trabajo investigativo

Con las actividades anteriores, se lograr llevar a cabo el **objetivo 1** "Identificar los residuos sólidos orgánicos susceptibles de valorización para la obtención de proteínas."

Para desarrollar el **objetivo 2** "Determinar las características de los sustratos para la definición de la mezcla de fermentación", se desarrollan las siguientes actividades:

1. Realización de análisis fisicoquímicos tales como: contenido de humedad, sólidos totales, materia orgánica, sólidos volátiles, carbono y nitrógeno Kjeldahl, esto se logra debido a los procesos que se ejecutan donde a partir de las matrices de fermentación, se extrae muestras en crisoles previamente pesados en una balanza analítica, donde, posteriormente se introduce la mezcla del sustrato y cosustrato por triplicado, nuevamente se pesan, luego son introducidos en el horno de convección con una duración de 24 horas a una temperatura de 105 grados Celsius. Después, nuevamente se pesan los crisoles con las mezclas, esto con el objetivo de establecer el porcentaje de humedad y sólidos totales, luego, se introduce en la mufla por un tiempo de una hora con treinta minutos aproximadamente a una temperatura de 500 grados Celsius. Posteriormente, se dejan en

reposo y se pesan nuevamente las muestras, con estos resultados se obtiene la proporción de material orgánico, sólidos volátiles y carbono.

Una vez obtenidos los valores de la caracterización fisicoquímica de los residuos a utilizar, se procede al acondicionamiento de la matriz a fermentar evitando alterar las características tanto químicas como biológicas. Para ellos es fundamental la aplicación de un pretratamiento, el más común consiste en la adición de agua para aumentar la humedad de la mezcla que debe estar entre 50% a 60%, o si es el caso, la aplicación de un material que proporcione estructura donde absorba el exceso de humedad para mezclas con contenidos de humedad por encima del óptimo.

Asimismo, se hace necesario que los tamaños de partícula de los sustratos en la matriz se encuentren en tamaños entre 10-15 mm. Una vez realizado el pre-acondicionamiento se inicia con la integración del sustrato y el cosustrato donde la proporción empleada para cada biorreactor es 1:1, luego, la matriz se lleva al reactor para iniciar la fermentación y así poder controlar los diferentes parámetros operacionales, cabe mencionar, que el proceso se lleva acabo con cuatro mezclas diferentes para poder ejecutar comparaciones y analizar el rendimiento con respecto a la producción de proteína, esto consigue realizar el **objetivo 3** “Efectuar la fermentación siguiendo los parámetros operacionales para la obtención de las proteínas”.

Luego, se inicia con el registro y análisis de los parámetros operacionales como es la temperatura, humedad y pH, con el fin de llevar el respectivo control e ir realizando modificaciones de acuerdo al comportamiento donde el enfoque principal es alcanzar una temperatura interna de cada biorreactor entre 50 y 55 grados Celsius, donde, es vital extraer la muestra y finalizar el proceso. Cabe mencionar que, se debe realizar modificaciones constantes con respecto a la inyección de aire para que los microorganismos puedan realizar su proceso de

alimentación y degradación adecuado, Asimismo, para mantener el ambiente interno en armonía, es importante estar moviendo la matriz para evitar que se generen procesos anaeróbicos en la fermentación, Finalmente, se procede a extraer muestras de cada biorreactor para ejecutar el método de Bradford con el fin de analizar la cantidad de proteína obtenida en cada montaje y establecer el rendimiento de los residuos orgánicos utilizados y a su vez el proceso de fermentación aeróbica.

Técnicas Para La Recolección De La Información

Durante el trabajo de investigación, las técnicas que se emplearán serán:

1. **La observación:** se utilizará esta técnica para soportar la estructura de la investigación tanto a nivel experimental como conceptual.
2. **Experimentos:** con la técnica se identificarán las relaciones que se establecen entre los diferentes sustratos para la obtención del compuesto de alto valor añadido.
3. **Meta –análisis:** la técnica nos permitirá contrastar los diferentes resultados obtenidos en la fermentación.

Recursos Y Presupuesto

Recurso Físico

Los recursos que se utilizarán en el proyecto corresponderán a: reactores de fermentación a escala de laboratorio con un volumen operacional de un litro y su respectiva instrumentación; reactivos de laboratorio para las diferentes caracterizaciones, equipo de cómputo para el registro y seguimiento de la fermentación.

Recurso Humano E Institucional

Corresponde a los auxiliares de investigación que trabajan en la experimentación bajo tutoría del investigador líder.

Recursos Financiero Y Presupuesto

La financiación en su totalidad del proyecto será por parte de la universidad Cooperativa de Colombia sede Bogotá, dado que corresponde a un proyecto de financiación interna. La tabla 2 refleja el valor de los equipos y otros elementos que se requieren para la elaboración la investigación SSF.

Tabla 2

Recursos físicos

Equipo	Valor
Batería de reactores	$ 4.800.000
Termocuplas	$ 8.000.000
Equipo de cómputo	$2.000.000
Caudalímetro	$4.000.000
Sensor de oxígeno	$600.000
Total	$19.400.000

Fuente: autores

Cronograma

La tabla 3 evidencia las diferentes actividades que se realizan en el transcurso de un año donde se identifica la cantidad de tiempo que se proyecta para ejecutar cada una y cumplir los objetivos establecidos.

Tabla 3

Cronograma de ejecución del proyecto

N°	Actividad	MESES											
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
1	Revisión bibliográfica en las diferentes bases de datos acerca de procesos SSF con residuos agrícolas.	**x**	**x**	**x**	**x**	**x**	**x**						
2	Diagnóstico de los diferentes residuos que sean susceptibles de generar proteína por procesos de fermentación aerobia, y que se ubiquen en la zona de Cundinamarca con el fin de que su cantidad sea considerable y			**x**	**x**	**x**	**x**						

	permita la continuidad del trabajo investigativo.										
3	Realización de análisis fisicoquímicos tales como: contenido de humedad y materia seca, materia orgánica, pH, nitrógeno Kjeldahl.	**x**	**x**	**x**							
4	Pretratamiento de los residuos.			**x**	**x**						
5	Realizar la fermentación.			**x**	**x**	**x**	**x**				
6	Escritura del informe de investigación.						**x**	**x**	**x**		

Fuente: autores

Resultados

Luego de hacer una revisión de los residuos orgánicos generados en Colombia se establece que el principal aportante es el departamento de Cundinamarca, esto se debe a su gran cantidad de producciones agrícolas y a su vez al consumo masivo de alimentos orgánicos lo cual lo hace un punto de enfoque principal para trabajar en la valorización de los mismos. Además, se establece que por cada habitante se produce aproximadamente 0,7 kg/día, si se proyecta con la cantidad de población del departamento la cual es alrededor de 2.506.995 habitantes (DANE, 2019), se podría determinar que en el día se generan más o menos 1.754.896 kg/día, es decir, que en un año se produciría un valor de 640,57 millones de kilogramos de residuos orgánicos.

Posteriormente, se identifica que los residuos orgánicos que mayor impacto tienen en el entorno son las cáscaras, semillas y pulpas, en especial las de naranja por su alta proporción encontrada en los residuos a nivel nacional (Peñaranda et al., 2017). Adicional a esto, se puede identificar que, en la zona rural del departamento de Cundinamarca, la plantación de naranja se incrementa gracias a que las condiciones climáticas son las adecuadas y hay gran fertilidad en sus tierras. Asimismo, su alta demanda y sus cosechas constantes durante las diferentes épocas del año permiten que estos factores se sumen para generar más este producto lo que directamente genera un aumento de residuos orgánicos. La cáscara de naranja es un sustrato adecuado para la fermentación aeróbica ya que en su composición fisicoquímica se establece un 6% de proteína, (Arroyo, 2002), lo cual, la hace ideal para el enfoque de la investigación.

También, se tuvo presente como residuo orgánico las cáscaras de plátano, debido a que, este producto es uno de los más consumidos y emblemáticos en el país debido a la diversidad de preparaciones en la gastronomía y su rico contenido en potasio. Por otra parte, se debe tener en cuenta la gran cantidad de terrenos donde se visualiza una abundancia de plataneras que son usadas para cubrir la demanda del país. Adicionalmente, la cáscara de plátano es empleada en diversos procesos de valorización por su alto contenido de proteína, (Anchundia et al, 2016), lo que nos permite asumir que es ideal utilizar estos dos residuos como sustrato en la fermentación.

Ahora bien, con respecto al cosustrato empleado para llevar a cabo el proceso de fermentación de los residuos orgánicos mencionados, se elige el compost y el lodo deshidratado, ya que son receptores de alto contenido de microorganismos lo cual es ideal como inóculo, además, es de fácil acceso y a un costo muy económico. También, estos dos cosustratos permiten realizar las respectivas comparaciones de cuál es el más eficiente en las condiciones en las que se ejecuta el montaje teniendo en cuenta los diferentes parámetros y condiciones dentro y fuera del

biorreactor. Una ventaja de lo dicho anteriormente es que se puede identificar cuál de los cosustratos es más adecuado para maximizar la cantidad de proteína con respecto a los resultados arrojados en el método Bradford.

Luego, se inicia con la caracterización de cada uno de los sustratos y cosustratos con el fin de determinar las proporciones de humedad, sólidos totales, materia orgánica, sólidos volátiles y carbono. Estos resultados se observan en la tabla 4, donde se aclara que también se hizo necesario realizarla caracterización a la madera, puesto que se empleará para dar estructura a la matriz de la mezcla dentro del biorreactor, permitiendo el flujo de aire y evitando que la fermentación se convierta en un proceso anaeróbico. La tabla 4 evidencia los resultados obtenidos de la caracterización tanto de los sustratos como los cosustratos, adicional se evidencia la desviación obtenida.

Tabla 4

Caracterización de compost, lodo, madera y residuos orgánicos

CARACTERIZACIÓN DE RESIDUOS SÓLIDOS ORGÁNICOS, COMPOST, LODO Y MADERA										
	% Humedad	**Desv. Estándar**	**% sólidos totales**	**Desv. Estándar**	**% materia orgánica**	**Desv. Estándar**	**% sólidos volátiles**	**Desv. Estándar**	**% carbono**	**Desv. Estándar**
Compost	19,9053	0,2389	80,0947	0,2389	71,5932	6,0498	57,3330	4,6715	41,5274	3,5092
Naranja	83,1266	1,4051	16,8734	1,4051	95,8499	0,2229	16,1729	1,3446	55,5974	0,1293

Lodo	62,4850	11,3508	37,5150	11,3508	28,2540	5,7852	10,1622	1,4200	16,3887	3,3557
Madera	7,8273	0,1453	92,1727	0,1453	98,8986	0,1972	91,1574	0,1377	57,3658	0,1144
Plátano	86,0419	0,7402	13,9581	0,7402	85,8848	1,1039	11,9917	0,7551	49,8172	0,6403

Fuente: autores

Después, en la tabla 5 se evidencian los resultados obtenidos de la caracterización de los cuatros biorreactores montados con las diferentes mezclas, donde en primera instancia tenemos la combinación residuos de cáscara de plátano como sustrato y compost que funciona como cosustrato (P+C).Posteriormente, se evidencia la mezcla de cáscaras de naranja con compost (N+C), luego, se refleja la combinación plátano y lodo (P+L), finalmente, se registra los resultados de la mezcla de residuos de cáscara de naranja y lodo como cosustrato (N+L). Es necesario tener presente, que la proporción se maneja 1:1 en todos los biorreactores. Los resultados con respecto a la caracterización, los encontrarán a continuación:

La tabla 5 evidencia los resultados de la caracterización de las mezclas realizadas con sus respectivas proporciones y desviaciones.

Tabla 5

Caracterización de las mezclas

CARACTERIZACIÓN DE LAS MEZCLAS

	% Humedad	Desv. Estándar	% sólidos totales	Desv. Estándar	% materia orgánica	Desv. Estándar	% sólidos volátiles	Desv. Estándar	% carbono	Desv. Estándar
P + C	54,1316	7,6555	45,8684	7,6555	72,1030	1,4734	33,1289	6,1957	41,8231	0,8547
N + C	55,4694	0,5042	44,5306	0,5042	72,1845	1,9666	32,1491	1,2397	41,8704	1,1407
P + L	62,9773	1,1713	37,0227	1,1713	59,5547	3,6044	22,0698	2,0320	34,5445	2,0907
N + L	52,2943	1,3117	47,7057	1,3117	55,1389	13,834	26,2136	5,8767	31,9831	8,0248

Fuente: autores

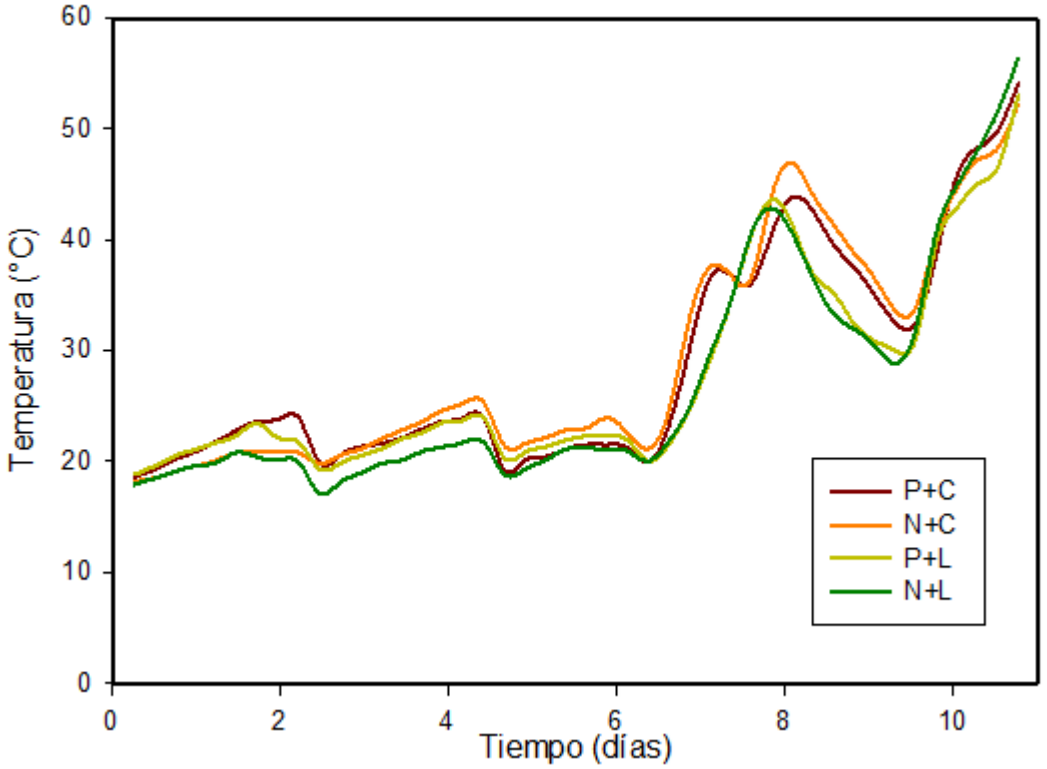
Donde, se evidencia que las mezclas óptimas antes de iniciar el montaje es la P+C y N+C, ya que están dentro de los parámetros óptimos con respecto a la humedad y el alto porcentaje de materia orgánica, que es ideal para poder proceder con el proceso de fermentación en estado sólido. Posteriormente, al iniciar el montaje de los cuatros biorreactores con las diferentes mezclas se inicia con la toma de datos con respecto a los parámetros temperaturas, pH y humedad, los resultados registrados hasta obtener la temperatura óptima, fueron:

La temperatura tiene una distribución exponencial donde los 4 reactores con sus respectivas composiciones alcanzan un valor superior a los 50 grados Celsius al cabo de 10 días. En el noveno día se evidenció una disminución de temperatura que se pudo haber dado por el aumento inesperado en el flujo de aire que se inyectaba a los reactores, este comportamiento mencionado se puede apreciar en la figura 1.

La figura 1 muestra el registro por día con respecto a la temperatura tomada en los cuatro biorreactores durante los 10 días en grados Celsius.

Figura 1

Registro de temperaturas en los biorreactores



Fuente: autores

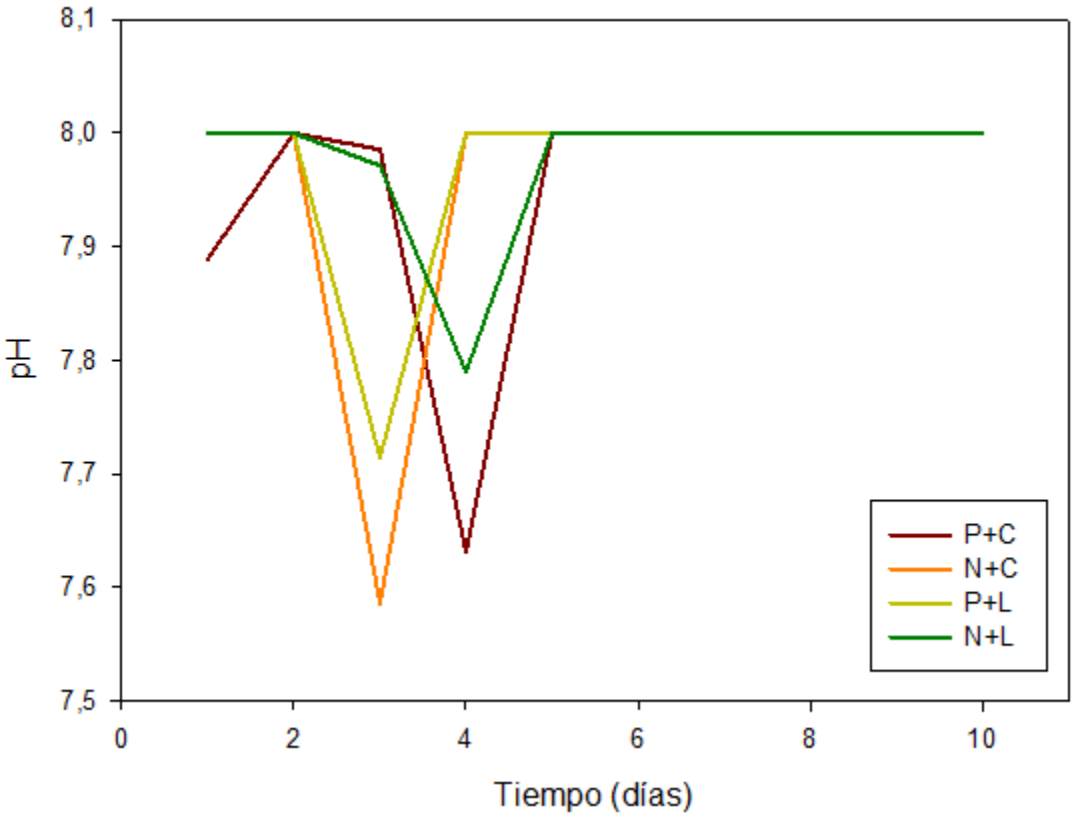
Ahora bien, con respecto al pH se mantiene a lo largo del montaje en un valor de 8 o alcalino con unas variaciones en las medidas muy pequeñas que pueden darse por errores humanos al momento de la toma de datos, debido a que el pHmetro se debía introducir manualmente en los biorreactores con la misma altura en cada uno, también, se puede dar este margen de error ya que el instrumento en algunos procesos se encontraba sucio lo cual no

permitía medir adecuadamente el pH de cada mezcla, los resultados obtenidos se evidencia en la figura 2.

La figura 2 muestra el progreso del pH de los biorreactores durante los 10 días de la fermentación.

Figura 2

Registro de pH en los biorreactores



Fuente: autores

Posteriormente, de obtener los resultados esperados se procede a realizar la extracción de las muestras para determinar la cantidad de proteína presente en las diferentes mezclas se realizó un calibrado usando el método Bradford, dónde se traza la recta patrón a partir de 9 puntos, los cuáles se hicieron por triplicado. En la tabla 6, se presenta el calibrado obtenido y en la figura 3 la recta patrón. La tabla 6 evidencia los resultados del calibrado con el método Bradford donde se puede evidencia la concentración de proteína de acuerdo con la absorbancia.

Tabla 6

Calibrado con el método de Bradford

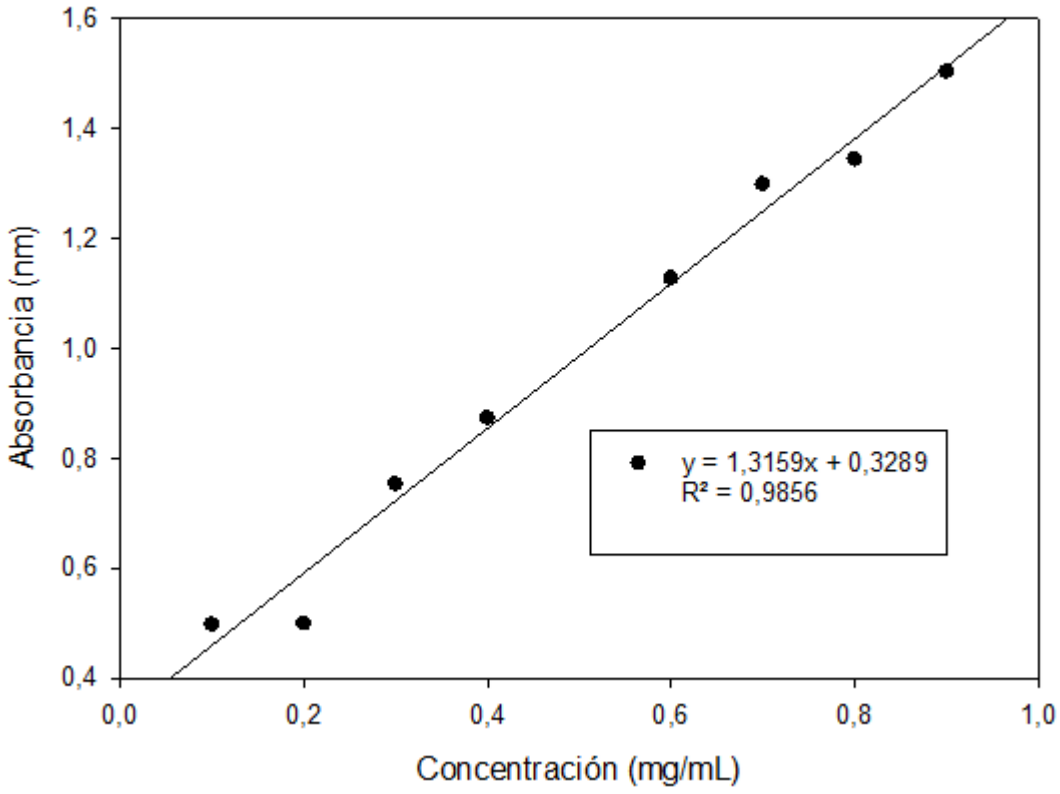
TUBOS	REACTIVOS			RESULTADOS	
	Agua(µl)	**Proteína Estándar (1 mg/ml) (µl)**	**R. Bradford (ml)**	**A595 nm**	**Proteína(mg/ml)**
1	250	0	1		
2	225	25	1	0,4976	0,1
3	200	50	1	0,4995	0,2
4	175	75	1	0,7531	0,3
5	150	100	1	0,8732	0,4
6	100	150	1	1,1277	0,6
7	75	175	1	1,2982	0,7
8	50	200	1	1,3432	0,8
9	0	250	1	1,5026	0,9

Fuente: autores

La figura 3 evidencia la recta patrón con respecto absorbancia vs la concentración de proteína.

Figura 3

Calibrado método Bradford



Fuente: autores

Después se sometieron las muestras obtenidas de los reactores a las respectivas medidas de la cantidad de proteína, la medida de Absorbancia obtenida en cada mezcla se contrasta con la recta de calibrado construida, los resultados se evidencian en la Tabla 7 y la figura 4. La tabla 7 se establece la concentración de proteína que tiene las cuatro mezclas realizadas, adicional, se muestra el resultado promedio ya que se realizó el proceso por triplicado en cada mezcla.

Tabla 7

Concentración de proteína

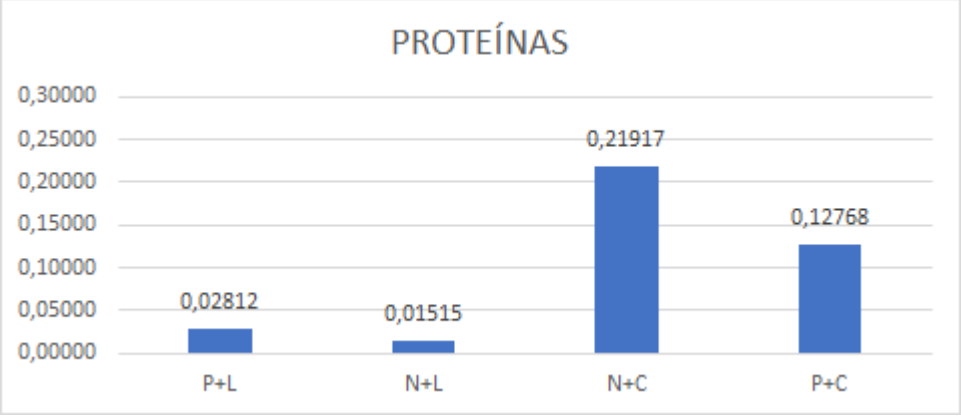
CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA (mg/mL)				
DATOS	**P+L**	**N+L**	**N+C**	**P+C**
1	0,00000	0,01163	0,21998	0,12781
2	0,04210	0,01512	0,21900	0,12827
3	0,04225	0,01869	0,21854	0,12698
PROMEDIO	**0,02812**	**0,01515**	**0,21917**	**0,12768**

Fuente: autores

Los resultados de la concentración de cada una de las 4 mezcla sometidas a la SSF se evidencian en la figura 4.

Figura 4

Concentración de proteína



Fuente: autores

Finalmente, se evidencia que la mezcla con mayor concentración de proteínas es la de residuos de cáscaras de naranja y compost con un valor de 0,22 mg/ml, seguido de los residuos de cáscara de plátano y compost con 0,13 mg/ml, el tercer lugar es la naranja y lodo con valores inferiores a 0,1 mg/ml, al igual que el plátano y lodo.

Conclusiones

- Se concluye que dentro de los RSO empleados se evidencia que las cáscaras de naranja y plátano generan un buen resultado siempre que se tenga como cosustrato el compost, en donde se identifica que la cantidad de proteínas totales es más alta que las otras mezclas realizadas.
- Los residuos sólidos vegetales son los adecuados para este tipo de fermentaciones por estar compuestos por celulosas, hemicelulosas, lignina, almidón, pectina y otras fibras, además la alta concentración de nutrientes facilita la obtención de pectina, fibra, molasas, D-limineno, etanol, limonoides, flavonoides y proteínas. También, es posible adquirirlos fácilmente, debido a que se generan en las diferentes etapas entre la producción en zonas rurales hasta llegar al consumidor final. La alta concentración de proteína en la cáscara de naranja fue un factor fundamental que se tuvo en cuenta a la hora de ser usada en el laboratorio.
- Los parámetros operaciones estudiados demuestran que la temperatura se debe mantener en un crecimiento constante, ya que una caída indicaría que los microrganismos no están realizando un proceso adecuado y que internamente en cada biorreactor alguno de los parámetros está presentando alteraciones, por su parte el pH se debe mantener próximo a 8, en un estado alcalino y una humedad de 10 son las condiciones óptimas para que los

microrganismos tengan una actividad constante y se desarrolle una fermentación adecuada.

- Además, es importante implementar un control de parámetros contantes donde se pueda observar constantemente los cambios del proceso y asimismo poder implementar acciones correctivas para evitar la afectación de la fermentación, esto se puede ejecutar a partir de termocuplas, electroválvulas, temporizadores, caudalímetros, entre otros, que facilite el control del proceso, asimismo, es adecuado implementar un software que permita la verificación total de todos los parámetros nombrados anteriormente, con un registro digital de los datos para evitar, errores humanos al momento de registrar la información.
- En un próximo trabajo se realizará la fermentación a una escala mayor con unos reactores con una capacidad de 5 litros en los cuales se aplicarán todas las observaciones ya previstas en este documento, automatizando la toma de los datos de control que permitirá tomar decisiones para que la fermentación se realice en las mejores condiciones posibles, además se usará solo el producto que mejor resultado obtuvo en la experimentación cambiando la relación entre la naranja y el compost para determinar la mejor concentración para la producción de proteínas.

Referencias Bibliográficas

Anchundia, K, Santacruz, S, & Coloma, J. (2016). Caracterización física de películas comestibles a base de cáscara de plátano (Musa Paradisiaca). Revista chilena de nutrición, 43(4), 394-399. Recuperado de: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182016000400009&lng=en&tlng=en

Área de Sostenibilidad, INERCO Consultoría Colombia. (2018). RESUMEN EJECUTIVO VALORIZACIÓN ENERGÉTICA DE RESIDUOS: PROYECTO WTE. Bogotá, D.C., 1 - 6. Recuperado de: https://bdigital.upme.gov.co/bitstream/001/1339/1/Resumen%20ejecutivo.pdf

Arroyo Obregoso, A, G. (2002). Producción de enzimas pectinasas por actinomycetos en cultivos sumergido utilizando pectina y cáscara de naranja. [Tesis de posgrado (magister), Universidad Nacional mayor de San Marcos, Lima, Perú]. Recuperado de: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/2596/Arroyo_oa.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Ballardo Matos, C, V. (2016). Valorización de residuos sólidos orgánicos como sustrato para el crecimiento de Bacillus Thuringiensis mediante fermentación en estado sólido: aplicación a la fracción orgánica de residuos municipales para la producción de compost con efecto biopesticida. [Tesis Doctorals en Xarxa]. https://www.tdx.cat/handle/10803/399721

Bradford, M, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding [Ebook] (pp. 1 -5).

Atenas. Recuperado de: http://www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/lab-bioq-gen/archivos/Bradford%201976.pdf

Castañeda Torres, S, & Rodríguez Miranda, J, P. (2017). Modelo de aprovechamiento sustentable de residuos sólidos orgánicos en Cundinamarca, Colombia. Universidad y Salud, 19(1), 116-125. Recuperado de: https://dx.doi.org/10.22267/rus.171901.75

Cheng, A, T. (2004). Método y utilización de oxígeno para eliminar el envenenamiento por dióxido de carbono en fermentación aeróbica. Espacenet Patent search. Recuperado de https://patentimages.storage.googleapis.com/3f/94/01/04d3acc40f3fc1/US6280996.pdf

Departamento Administrativo Nacional de Estadística. [DANE]. (2019). Informe comité nacional de expertos para la evaluación del censo nacional de población y vivienda de Colombia 2018. Recuperado de: https://www.dane.gov.co/index.php/estadisticas-por-tema/demografia-y-poblacion/proyecciones-de-poblacion

Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial (2005, 30 de diciembre).Decreto 4741. Diario Oficial No. 46.137 de la República de Colombia. . Recuperado de: http://www.corpocaldas.gov.co/publicaciones/1524/02-28/Decreto4741de2005.pdf

Ministerio de salud y protección social (2014, 19 de febrero). Decreto No. 351 Por el cual se reglamenta la gestión integral de los residuos generados en la atención en salud y otras actividades.. Recuperado de: https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/Decreto-0351-de-2014.pdf

Escalona Guerra, E. (2014). Daños a la salud por mala disposición de residuales sólidos y líquidos en Dili, Timor Leste. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología, 52(2), 270-

277. Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032014000200011&lng=es&tlng=es.

Fernández Reyes, E & Galván Cejudo, A. (SF). Métodos para la cuantificación de proteínas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba. Recuperado de: https://www.academia.edu/download/35797491/27_METODOS_PARA_LA_CUANTIFICACION_DE_PROTEINAS.pdf

Garcés Jaraba, L, E & Coavas Romero, S, C. (2012). Evaluación de la capacidad de adsorción en la cáscara de naranja (citrus sinensis) modificada con quitosano para la remoción de cr (vi) en aguas residuales. Editorial Universidad de Cartagena. Recuperado de: http://repositorio.unicartagena.edu.co/bitstream/handle/11227/140/tesis%20Garces-Coavas.pdf?sequence=1&isAllowed=y

García Rodríguez, A. M. & Gómez Franco, J. D. (2016) Evaluación de la producción de biogás a partir de residuos vegetales obtenidos en la central de abastos de Bogotá mediante digestión anaerobia (Trabajo de grado). Fundación Universidad de América. Recuperado de: http://hdl.handle.net/20.500.11839/667

Grande Tovar, C, D. (2016). VALORACIÓN BIOTECNOLÓGICA DE RESIDUOS AGRÍCOLAS Y AGROINDUSTRIALES (pp. 85 - 103). Bonaventuriana. Recuperado de: http://45.5.172.45/bitstream/10819/4588/1/9789588785813.pdf

Grijalva Vallejos, N. (2013). Degradación de residuos vegetales mediante inoculación con cepas microbianas. Revista Enfoque UTE. Vol. 4 No. 1. Recuperado de: http://ingenieria.ute.edu.ec/enfoqueute/index.php/revista/article/view/21/20

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). (2006, 26 de abril) Guía técnica colombiana GTC 53-7. Guía para el aprovechamiento de residuos sólidos orgánicos no peligrosos. Recuperado de: https://tienda.icontec.org/wp-content/uploads/pdfs/GTC53-7.pdf

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). (2003, 22 de octubre) Guía técnica colombiana GTC 86. Guía para la implementación de la gestión integral de residuos –GIR–. Recuperado de: https://tienda.icontec.org/wp-content/uploads/pdfs/GTC86.pdf

Gutiérrez Ramírez, L, A, Pérez Bran, J, A, & Uribe M, A. (2012). Evaluación in vitro de celulasas producidas por cepas nativas de Trichoderma reesei, Cladosporium herbarum y Aspergillus niger. Revista Journal of Agriculture and Animal Sciences. Vol. 1, No. 1. Recuperado de: http://repository.lasallista.edu.co:8080/ojs/index.php/jals/article/view/149

Jaramillo Henao, G & Zapata Márquez, L, M. (2008). Aprovechamiento de los residuos sólidos orgánicos en colombia. Tesis Universidad de Antioquia. Recuperado de: http://tesis.udea.edu.co/dspace/bitstream/10495/45/1/AprovechamientoRSOUenColombia.pdf

Kaza, S., Yao, L., Bhada-Tata, P. & Van Woerden, F. (2018). What a Waste 2.0: A Global Snapshot of Solid Waste Management to 2050. Urban Development; Washington, DC: World Bank. © World Bank. Recuperado de: https://openknowledge.worldbank.org/handle/10986/30317

León Revelo, G, G. (2017). Diseño del proceso de fermentación sólida a escala piloto para la producción de celulasas con residuos agroindustriales. Revista

ebookcentral.proquest.com, Recuperado de: https://ebookcentral.proquest.com/lib/ucooperativasp/reader.action?docID=5486819

Martínez Hernández, C, M & García López, Y. (2016). Utilización de pretratamientos básicos y específicos para la producción de biogás. Revisión y análisis. Rev Cie Téc Agr, vol.25, n.3, 81- 92. Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2071-00542016000300009

Mary, J. (2012). Cuantificación de proteínas. Materials and Methods. Recuperado de: http://www.labome.es/method/Protein-Quantitation.html

Navarro Juárez, Y, S. (2017). Determinación de las proteínas. Trabajo encargado de Métodos de Análisis de la calidad para la agroindustria. Perú. Universidad Nacional de PIURA. Recuperado de: https://doku.pub/documents/determinacion-de-proteinas-en-alimentos-8lyz1y9g4nqd

Pandey, A., Negi, S & Soccol, C, R. (2017). Current developments in biotechnology and bioengineering. Recuperado de: https://www.sciencedirect.com/book/9780444636621/current-developments-in-biotechnology-and-bioengineering#book-description

Patron Noches, A, J, & Rodriguez Bermejo, A, A. (2014). Diseño de un biorreactor para la producción de bioetanol a partir de desechos orgánicos a escala de laboratorio. Trabajo de grado Universidad Autónoma del Caribe. Recuperado de: http://repositorio.uac.edu.co/bitstream/handle/123456789/798/TMEC%201131.pdf?sequence=5&isAllowed=y

Peñaranda Gonzalez, L, V, Montenegro Gómez, S, P, & Giraldo Abad, P, A. (2017). Aprovechamiento de residuos agroindustriales en colombia. Revista De Investigación Agraria y Ambiental, 8(2), 141-150. Recuperado de: https://bbibliográficas.ucc.edu.co:2149/docview/1963138129/fulltextPDF/18B70A945F044D2DPQ/1?accountid=44394

Plou, F, J. (2016). Las enzimas. Editorial CSIC Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Recuperado de: https://ebookcentral.proquest.com/lib/ucooperativasp/reader.action?docID=4569679

Resiter, Socio Estratégico Ambiental. (2019). Valorización de residuos sólidos. Resiter. Recuperado el 22 de abril de 2019, de https://resiter.com/servicios/valorizacion-de-residuos-sólidos/

Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial (2003, 26 de septiembre) Resolución 1045. Por la cual se adopta la metodología para la elaboración de los Planes de Gestión Integral de Residuos Sólidos, PGIRS, y se toman otras determinaciones. Recuperado de: http://parquearvi.org/wp-content/uploads/2016/11/Resolucion-1045-de-2003-.pdf

Robinson, T, Singh, D, & Nigam, P. (2002). Fermentación en estado sólido: una tecnología microbiana promisoria para la producción de metabolitos secundarios. Revista de la facultad de química farmacéutica, volumen 9, número 2. Recuperado de: https://www.redalyc.org/pdf/1698/169818107003.pdf

Robles, F, Gerardo, O, Piña, A, Montiel, L, Colomer, F, Orozco,C. (2013). Obtención De Un Combustible Alterno A Partir Del Biosecado De Residuos Hortofrutícolas. Rev. Int.

Contam. Ambie. 29 (Sup. 3) 79-88. Recuperado de: https://www.revistascca.unam.mx/rica/index.php/rica/article/viewFile/43523/39442

Soccol, C., Ferreira da Costa, E., Junior Letti, L., Grace Karp, S., Lorenci Woiciechowski, A., & de Souza Vandenberghe, L. (2017). Recent developments and innovations in solid state fermentation. Biotechnology Research and Innovation. Recuperado de: https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S2452072116300144?token=FB5BE032EC6A64BA00481D3121D153E407F97B166A90CE3714C9EA763935B78ED880F5082F50BF6F44CE1156AE8E3561

Superintendencia de servicios públicos domiciliarios, SUPERSERVICIOS, 2017. EVALUACIÓN INTEGRAL DE PRESTADORES CENTRO DE GERENCIAMIENTO DE RESIDUOS DOÑA JUANA S.A. E.S.P. Bogotá D.C, pp.121 - 123. Recuperado de: https://www.superservicios.gov.co/sites/default/archivos/Acueducto%2C%20alcantarillado%20y%20aseo/Aseo/2018/Sep/evaluacionintegral2017-centrodegerenciamientoderesiduosdonajuanas.a.e.s.p.pdf

Tejeda, L, Tejeda, C, Villabona, A, Alvear, M, Castillo, C, Henao, D, Marimón, W, Madariaga, N & Tarón, A. (2010). Producción de bioetanol a partir de la fermentación alcohólica de jarabes glucosados derivados de cáscaras de naranja y piña. Revista Educación en ingeniería, Núm. 10. Recuperado de: https://www.educacioneningenieria.org/index.php/edi/article/view/104/91

Yepes, S, M, Montoya Naranjo, L, J, & Orozco Sánchez, F. (2008). Valorización De Residuos Agroindustriales – Frutas – En Medellín Y El Sur Del Valle Del Aburrá, Colombia.

Rev.Fac.Nal.Agr.Medellìn 61(1):4422-4431. Recuperado de:

http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v61n1/a18v61n1.pdf.