

**PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA CELULAR SIMPLE A PARTIR DE RESIDUOS
SÓLIDOS ORGÁNICOS EN PASTO, UTILIZANDO COMO MICROORGANISMO
FERMENTADOR EL HONGO *Aspergillus niger***

**HUGO ORLANDO ORTEGA BELTRAN
HENRY RUPERTO PANTOJA ORTEGA**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2004**

**PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA CELULAR SIMPLE A PARTIR DE RESIDUOS
SÓLIDOS ORGÁNICOS EN PASTO, UTILIZANDO COMO MICROORGANISMO
FERMENTADOR EL HONGO *Aspergillus niger***

**HUGO ORLANDO ORTEGA BELTRAN
HENRY RUPERTO PANTOJA ORTEGA**

Trabajo de grado para optar el título de químico

**Director
Ernesto Luque Turriago
Magíster en Bioquímica**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2004**

Nota de aceptación

Presidente del Jurado

Jurado

Jurado

San Juan de Pasto, febrero del 2004

“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado, son responsabilidad exclusiva de los autores”

“Artículo 1 del acuerdo No. 234 de Octubre 11 de 1966, emanada por el honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño”

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a:

Empresa Metropolitana de Aseo, por su patrocinio en esta investigación.

Ernesto Luque, Magíster en Bioquímica, por su asesoría en esta investigación.

Al personal de Laboratorios Especializados y Laboratorio de Microbiología, por su valiosa orientación y colaboración en este trabajo.

Y en general a todas las personas que de una u otra manera colaboraron para el desarrollo satisfactorio de este trabajo.

CONTENIDO

	pág
INTRODUCCIÓN	16
1. OBJETIVOS	18
1.1 OBJETIVO GENERAL	18
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
2. ANTECEDENTES	19
3. MARCO TEÓRICO	21
3.1 HONGOS	21
3.1.1 <i>Aspergillus niger</i> .	21
3.2 CULTIVO DE LOS HONGOS	23
3.2.1 Medios de cultivo.	23
3.3 NUTRICIÓN DEL MICROORGANISMO	24
3.3.1 Nutrición de los hongos.	24
3.4 FERMENTACIÓN BIOLÓGICA	25
3.4.1 Fermentación y tipos de fermentación.	26
3.5 PROCESO FERMENTATIVO	29
3.5.1 Preservación del inóculo.	29
3.5.2 Crecimiento del inóculo.	30
3.5.3 Parámetros más importantes durante la fermentación.	30
3.6 PROTEÍNA	31
3.6.1 Producción de proteína (biomasa).	32

4. METODOLOGÍA	34
4.1 ZONA DE MUESTREO	34
4.2 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS	34
4.3 TRATAMIENTO PRELIMINAR DE LAS MUESTRAS	35
4.3.1 Determinación de carbohidratos.	35
4.3.2 Determinación de grasas.	35
4.3.3 Determinación de materia orgánica.	35
4.3.4 Determinación de proteína verdadera.	35
4.4 OBTENCIÓN DE LA CEPA DE <i>Aspergillus niger</i> .	36
4.5 CURVA DE CRECIMIENTO DEL HONGO <i>Aspergillus niger</i> .	36
4.6 FERMENTACIÓN	36
4.7 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE RESULTADOS	38
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	39
5.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS	39
5.2 FERMENTACIÓN	39
5.3 PRODUCCIÓN DE BIOPROTEÍNA	40
5.4 MATERIA ORGANICA	43
5.5 GRASAS	44
5.6 CARBOHIDRATOS	45
5.7 pH	46
5.8 PESO DE MUESTRAS	47
6. CONCLUSIONES	48
7. RECOMENDACIONES	49

BIBLIOGRAFÍA

50

ANEXOS

53

LISTA DE CUADROS

	pág
Cuadro 1. Porcentaje de proteína de las muestras utilizadas en las fermentaciones.	41
Cuadro 2. Promedios en porcentajes de bioproteína obtenida después de las fermentaciones con <i>Aspergillus niger</i> , de los residuos sólidos orgánicos, con nutrientes en diferentes concentraciones.	42
Cuadro 3. Rendimientos de bioproteína en porcentaje después de la fermentación.	43
Cuadro 4. Porcentaje de materia orgánica de las muestras utilizadas en las fermentaciones.	43
Cuadro 5. Promedios de materia orgánica encontrados después de la fermentación con los diferentes nutrientes y a diferentes concentraciones.	44
Cuadro 6. Porcentajes de grasas presentes en las muestras antes y después de la fermentación de los residuos sólidos orgánicos con nutrientes en diferentes concentraciones utilizando <i>Aspergillus niger</i> .	44
Cuadro 7. Comparación del contenido promedio de grasas antes y después de la fermentación.	45
Cuadro 8. Concentración en porcentaje de carbohidratos presentes en las muestras utilizadas en las fermentaciones.	45
Cuadro 9. Porcentajes de carbohidratos presentes después de las fermentaciones de los residuos sólidos orgánicos, con nutrientes en diferentes concentraciones utilizando <i>Aspergillus niger</i> .	46
Cuadro 10. Promedios de pHs después de las fermentaciones de los residuos sólidos orgánicos con los nutrientes en diferentes concentraciones utilizando el hongo <i>Aspergillus niger</i> .	46
Cuadro 11. Comparación de promedios de pesos de muestras en gramos antes y después de las fermentaciones de los residuos sólidos orgánicos con nutrientes en diferentes concentraciones utilizando el hongo <i>Aspergillus niger</i> .	47

LISTA DE FIGURAS

	pág
Figura 1. Fotografía de la cepa de <i>Aspergillus niger</i> .	22
Figura 2. Curva de crecimiento de un cultivo bacteriano.	27
Figura 3. Fotografía de los residuo sólidos orgánicos en el sitio de muestreo.	34
Figura 4. Fotografía del fermentador.	37
Figura 5. Curva de crecimiento del hongo <i>Aspergillus niger</i> a 330 mn.	40

LISTA DE ANEXOS

	pág
Anexo A. Análisis estadístico de la producción de bioproteína.	54
Anexo B. Análisis estadístico del contenido de materia orgánica después de la fermentación.	57
Anexo C. Análisis estadístico del contenido de grasas después de la fermentación.	59
Anexo D. Análisis estadístico del contenido de carbohidratos después de la Fermentación.	61

RESUMEN

Durante cuatro meses se recolectaron muestras de residuos sólidos orgánicos en tres plazas de mercado de la ciudad de Pasto. Los residuos se secaron, se molieron y se esterilizaron. Luego se dejaron fermentar, en condiciones ambientales, en presencia del hongo *Aspergillus niger*, durante seis días. Como fuentes de nitrógeno se utilizó urea, nitrato de potasio y nitrato de amonio en concentraciones de cero a tres por ciento. Previamente, para determinar el tiempo óptimo de fermentación, se realizó una curva de estandarización donde los residuos, tratados y aplicados en una concentración inicial del uno por ciento, se dejaron fermentar en presencia de *Aspergillus niger*. Se encontró que la adición de nitrato de amonio y nitrato de potasio, en concentraciones del 0.5 por ciento incrementaron la producción de bioproteína, con respecto al contenido inicial, en un 94.64 y 90.17 por ciento respectivamente, obteniendo un producto con un contenido de proteína verdadera del 10.9 por ciento y 10.65 por ciento en base seca respectivamente.

Palabras claves: Fermentación. *Aspergillus niger*, residuos sólidos orgánicos, bioproteína.

ABSTRACT

During four months, several samples of organic solid residuals were gathered in three squares of market of the city of Pasto. The residuals dried off, they were milled and they were sterilized. Then, they were allowed to ferment, under environmental conditions, in presence of the mushroom *Aspergillus niger*, during six days. Urea, nitrate of potassium and ammonium nitrate were used as sources of nitrogen in a interval of concentration of zero to three percent. Previously, to determine the optimal time of fermentation, a curve of standardization was done where the residuals, treated and applied in an initial concentration of one percent, they were allowed to ferment in presence of *Aspergillus niger*. The addition of ammonium nitrate and nitrate of potassium, in concentrations of 0.5 percent increased the bioproteína production, in comparison with the initial content. The increment was of 94.6 and 84 percent, obtaining a product with a content of net protein of 10.9 percent and 10.3 percent in dry base respectively.

Key words: Fermentation, *Aspergillus niger*, organic solid residuals, bioproteína.

INTRODUCCIÓN

La acumulación de residuos sólidos orgánicos en los rellenos sanitarios y en establecimientos abiertos al público, como lo son las plazas de mercado, se ha convertido en un problema de contaminación ambiental grave para las ciudades colombianas. En Pasto se producen en promedio 190 toneladas de basuras al día, de las cuales aproximadamente un 70.6%, corresponde a residuos sólidos orgánicos*. Como un intento de contribuir a la solución de esta dificultad se plantea la posibilidad de someter los residuos orgánicos sólidos a un proceso de fermentación mediante la utilización de microorganismos. De esta manera se da una respuesta al problema de la contaminación ambiental y se generan unos productos que se pueden utilizar para la obtención de concentrados baratos con destino a la alimentación animal. Algunos hongos filamentosos pueden servir a este propósito. Se ha escogido *Aspergillus niger*, por ser un hongo de fácil manejo y nula toxicidad que ya se ha utilizado para sintetizar biomasa con un alto contenido de proteína, a partir de cáscaras de naranja como lo reportan Medina y Hernández¹, y la presencia de aminoácidos esenciales tales como isoleucina, fenilalanina, treonina, valina, triptofano y lisina.

En general, existen tres tipos de procesos para efectuar las fermentaciones microbiológicas: continuo, discontinuo y retroalimentado. Para este trabajo se escogió el proceso discontinuo por requerir un equipo sencillo, ser el que más se acomoda a nuestras disponibilidades y permitir un mejor control de las variables a estudiar.

Como lo reportan Crueger y Crueger², En la fermentación discontinua, a tiempo cero, la solución esterilizada de nutrientes se inocula con microorganismos y se permite que se lleve a cabo la fermentación en condiciones controladas. A lo largo del proceso de fermentación no se añaden nuevos nutrientes. Solo oxígeno (en forma de aire), un agente antiespumante y ácidos o bases para controlar el pH. La composición del medio de cultivo, la concentración de biomasa y la concentración de metabolitos cambia generalmente en forma continua como resultado del

* ENTREVISTA con Ricardo Londoño, Director Técnico de Empresa Metropolitana de Aseo (EMAS). San Juan de Pasto, 4 de febrero del 2004.

¹ MEDINA, V. y HERNÁNDEZ, C. Estudio preliminar sobre obtención de biomasa a partir de los desechos de la naranja. En: Para sacarle mas jugo a la naranja. Citado por ARIAS L. [en línea]. Colombia. 2001. [citado 23 oct., 2002]. Disponible en Internet: URL: <<http://www.dnic.unal.edu.co/unperiodico/abril2001/tex-tos/ciencia.htm>>

² CRUEGER, Wulf y CRUEGER, Anneliese. Biotecnología: Manual de microbiología industrial. Zaragoza, España : Acribia, 1993. p. 73

metabolismo celular. Después de la inoculación de una solución nutritiva estéril con microorganismos, y su cultivo en condiciones fisiológicas, se observan cuatro fases típicas de crecimiento: fase de latencia, fase logarítmica, fase estacionaria y fase de muerte.

Según Ward, “los microorganismos utilizados en la fermentación y que sirven como alimento proteínico, no deben ser patógenos, ni formar toxinas y deben ser genéticamente estables de manera que se mantengan las cepas con características fisiológicas y bioquímicas óptimas durante el proceso y a través de cientos de generaciones”³.

Uno de los inconvenientes que presenta la proteína unicelular para su introducción como alimento para el hombre es el alto contenido de ácidos nucleicos (ARN) puesto que el producto final del metabolismo es el ácido úrico, soluble en la sangre y la orina y el cual, a altas concentraciones tiene repercusiones negativas para el organismo. Esta situación no se presenta en los organismos animales que cuentan con la urato-oxidasa, una enzima que degrada el ácido úrico a alantoína, un metabolito sin riesgos y fácilmente excretable.

³ WARD, Owen. Biotecnología de la fermentación: principios, procesos y productos. Zaragoza, España : Acribia, 1991. p. 116.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar las condiciones experimentales que permitan un rendimiento óptimo de proteína a partir de la fermentación de residuos sólidos orgánicos utilizando como microorganismo el hongo *Aspergillus niger*.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la curva de crecimiento del hongo *Aspergillus niger*, para establecer el tiempo de mayor producción de proteína.

Determinar el pH y la concentración global promedio de carbohidratos, lípidos y proteínas presentes en la muestra de residuos sólidos orgánicos.

Seleccionar la mejor fuente nitrogenada entre urea, nitrato de potasio y nitrato de amonio y la concentración mas adecuada para adicionar al medio de cultivo, y obtener un mayor rendimiento de proteína en el proceso fermentativo.

2. ANTECEDENTES

El hongo *Aspergillus niger* se ha utilizado en Latinoamérica como microorganismo fermentador para la obtención de biomasa, proteínas y enzimas a partir de diferentes sustratos obteniéndose un producto no tóxico y con un alto contenido de proteína. El proceso es económico y sencillo. Así, Martínez y Garcés⁴, mezclaron tallos de piña y salvado de trigo, en una proporción de 20%-60% y obtuvieron enzimas pectolíticas, celulolíticas y proteolíticas.

Bustamante, *et al*⁵, utilizaron residuos industriales de naranja para producir bioproteína y obtuvieron un producto con un 13.61 por ciento en bioproteína, el cual fue utilizado para la alimentación de pollos de granja.

Rodríguez, *et al*⁶, utilizaron residuos industriales de frutas cítricas y obtuvieron un producto enriquecido en proteína, con un 20 por ciento de proteína cruda y sin sustancias tóxicas que se puede utilizar en la elaboración de piensos para la alimentación animal.

El Centro de Investigaciones Científicas, CENIC⁷, de la Universidad Técnica de Ambato utilizó el excedente de banano, como sustrato para producir proteína unicelular, por fermentación en estado sólido. El banano alcanzó un contenido de proteína verdadera de 9,56% en base seca con un contenido interesante de aminoácidos esenciales, un resultado favorable si se considera que el banano natural contiene solo el 3,8% de proteína. Realizaron la evaluación del banano fermentado en dietas de animales monogástricos como pollos de engorde, pollas ponedoras y cerdos, donde obtuvieron buenos resultados en ganancia de peso y sabor de la carne.

⁴ MARTINES, J. y GARCES, N. Procedimiento para la obtención de un preparado enzimático, el medio de cultivo y el producto resultante. [en línea]. 1985. [citado 20 enero 2004]. Disponible en Internet: URL: <[http://www .ocpi.cu/doc/1985/t35695.pdf](http://www.ocpi.cu/doc/1985/t35695.pdf)>.

⁵ BUSTAMANTE, Z.; GALINDO, E.; HUANTA, M. y BALLESTEROS, F. Obtención de bioproteína a partir de bagazo de naranja (*Citrus sinensis*) con *Aspergillus niger*. [en línea]. [Cochabamba, Bolivia]. Universidad mayor de San Simón. [citado 28 febrero 2002]. Disponible en Internet: URL : <<http://www.umss.edu.bo/epubs/earts/dowl-oads/49.pdf>>.

⁶ RODRÍGUEZ, J. *et al*. Procedimiento para la fermentación en estado sólido de residuo cítrico. [en línea]. [Cuba]. [citado 20 enero 2004]. Disponible en Internet: URL: <<http://www.ocpi.cu/doc/1986/t36136.PDF>> .

⁷ CENTRO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS. Enriquecimiento proteico del banano de rechazo por fermentación sólida para alimentación animal. [en línea]. [Ambato, Ecuador]. Universidad Técnica de Ambato. 2003. [citado 20 enero 2004]. Disponible en Internet: URL: <<http://www.mag.gov.ec/promsa/resumen%20%20IQ-CV-026-htm-7k>>.

Medina y Hernández, analizaron las características de este hongo y reportaron: “que por su fácil manejo, buen contenido proteico y nula toxicidad sirve para obtener biomasa a partir de residuos de naranja”⁸.

⁸ MEDINA, Op.cit.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 HONGOS

Como lo reporta Guzmán:

Los hongos son microorganismos eucarióticos quimioorganotróficos. Se reproducen de manera natural por medio de esporas aunque hay algunas excepciones. (Además, casi todas las partes de un hongo son, en potencia capaces de desarrollarse; un pequeño fragmento es suficiente para iniciar un individuo nuevo). No tienen clorofila. Sus cuerpos son usualmente alargados o filamentosos (5 a 10 μm de grosor) y por lo general, ramificados. Los filamentos poseen pared celular que contiene quitina o celulosa, o las dos. La mayor parte de los hongos son inmóviles, si bien pueden tener células reproductoras móviles. Las esporas se producen de dos maneras en casi todas las clases de hongos: sexuales y asexuales⁹.

3.1.1 *Aspergillus niger*. Según lo reporta Medina y Hernández

El moho negro del pan o *Aspergillus niger* comienza como una spora microscópica transportada por el aire, que germina en contacto con la superficie húmeda de la materia orgánica muerta. Se extiende con rapidez formando el micelio (cuerpo del hongo), constituido por una red delicada de filamentos (hifas). El micelio produce otros grupos de hifas llamadas rizoides, que son unos filamentos o pelos que hacen las veces de raíces y penetran en la materia orgánica secretando enzimas y absorbiendo agua, azúcares digeridos y almidones. Otro grupo de hifas, llamadas esporangióforos, se alargan hacia arriba formando los esporangios (protuberancias que encierran las esporas), que confieren su color particular a cada especie de moho. Cuando están maduros, los esporangios se abren y las esporas transportadas por el viento aterrizan en algún lugar para reproducirse asexualmente¹⁰.

⁹ GUZMÁN HUERTA, Gastón. Identificación de los hongos: comestibles, venenosos, alucinantes y destructores de la madera. México : Ed. Limusa, 1977. 321 p.

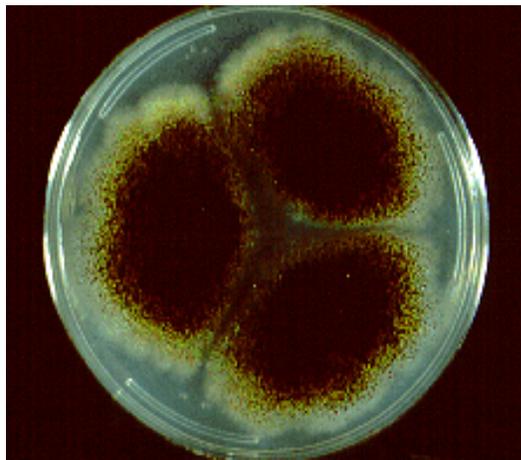
¹⁰ MEDINA, Op.cit.

Características generales del hongo *Aspergillus niger*

Según Guzmán al hongo se lo puede clasificar así:

División: Mycota
Subdivisión: Eumycotina
Clase: Deuteromycetes
Genero: *Aspergillus*
Sp: *niger*¹¹,

Figura 1. Fotografía de la cepa de *Aspergillus Niger*.



Fuente: Hoog G. y Guarro J. Atlas of clinical fungi. [en línea]. 1995. [citado 15 agosto del 2003]. Disponible en internet: <http://www.mycology.adelaide.edu.au>

El hongo *Aspergillus niger*, como lo reporta Mateos: “fue utilizado por primera vez en la industria en el año de 1923, para la producción de ácido cítrico. Además, este hongo es rico en aminoácidos como la Isoleucina, Fenilalanina, Cisteina, Treonina. Valina, Triptofano y Lisina”¹².

Ward comenta que :

Los hongos en general tienen la capacidad de degradar un amplio rango de productos vegetales complejos, particularmente los polisacáridos de las plantas y toleran pHs bajos, contribuyendo a reducir las infecciones en el fermentador. El crecimiento de los hongos en forma de filamentos cortos altamente ramificados en vez de gránulos, es esencial a la hora

¹¹ GUZMÁN, Op.cit., p. 258.

¹² MATEOS GONZÁLES, P. Generalidades y desarrollo histórico de la microbiología. [en línea]. [Salamanca, España]. Universidad de Salamanca. [citado 16 octubre 2002]. Disponible en Internet: URL: <<http://edicion-micro.usal.es/web/SEFIN/MI/tema01MI.html>>

de optimizar la velocidad de crecimiento; sin embargo, esta morfología filamentososa produce caldos de fermentación reologicamente más complejos, que son difíciles de airear¹³.

3.2 CULTIVO DE LOS HONGOS

Casi todos los hongos, según Guzmán¹⁴ se desarrollan en condiciones aeróbicas, en los medios de cultivo bacteriológicos usuales, a temperaturas que varían entre 20 y 30 °C. La mayor parte lo hacen más lentamente que las bacterias, y así, cuando llegan a coexistir, el desarrollo de éstas sobrepasa con creces el de los mohos. Si se desea aislar los mohos, resulta muy práctico usar un medio de cultivo que favorezca su desarrollo pero que no sea óptimo para las bacterias ó agregar al medio antibióticos que controlen el crecimiento bacteriano. Medios ácidos (pH 5.6) con concentraciones relativamente elevadas de azúcar son tolerados bien por los mohos pero inhiben a muchas bacterias.

3.2.1 Medios de cultivo. Según Wainwright, hay tres tipos generales de medios de cultivo para los hongos:

1. Medios naturales, como pedazos o infusiones de frutas, vegetales, granos de cereales o tejidos animales. Estos medios varían mucho en su composición y no son fácilmente reproducibles. Tampoco son de amplio uso.
2. Medios de cultivo preparados con peptonas, extractos de plantas, agar y otros compuestos de composición desconocida o variable.
3. Medios de cultivo sintéticos de composición química definida.¹⁵

Los hongos en general crecen en el laboratorio sobre un medio definido que contiene azúcares, como glucosa y sacarosa, o sobre polímeros, como celulosa. El nitrógeno inorgánico generalmente se suministra a los medios en forma de amonio, nitrato, amidas o aminoácidos. En algunos procesos de fermentación industrial también puede usarse amonio gaseoso.

Medio de cultivo de *Aspergillus niger*. Según el manual Merck:

El PDA (Agar Papa Dextrosa) es el medio de cultivo óptimo para el aislamiento y recuento de hongos y levaduras en alimentos y otros materiales; la glucosa y la infusión de papa favorecen su desarrollo.

¹³ WARD, Op.cit.,116.

¹⁴ GUZMÁN, Op.cit., p. 256.

¹⁵ WAINWRIGHT, M. Introducción a la biotecnología de los hongos. Zaragoza, España : Acribia, 1995. 228 p.

Además, se inhibe el desarrollo bacteriano con el agregado de ácido tartárico después de la esterilización llegando a un pH de 3.5 ± 0.2 al cual se hidroliza el agar. La siembra del hongo se hace en superficie, por extensión¹⁶.

3.3 NUTRICIÓN DEL MICROORGANISMO

Mateos dice, que:

Las células utilizan elementos químicos que provienen del medio ambiente para transformarlos en los constituyentes característicos que componen dicha célula. Estos compuestos químicos se llaman nutrientes y el proceso por el cual una célula transforma estos nutrientes en sus componentes celulares se denomina anabolismo o biosíntesis. La biosíntesis es un proceso que requiere energía. Esta energía se obtiene del medio ambiente. Las células pueden utilizar tres tipos distintos de fuentes de energía: luz, compuestos orgánicos o compuestos inorgánicos. Cuando los microorganismos se separan de su hábitat (donde adquieren los nutrientes) y se cultivan en laboratorios o industrias se deben usar medios de cultivo que contengan los elementos químicos necesarios para su crecimiento.

Los nutrientes que requiere una célula para su crecimiento se pueden clasificar en los siguientes grupos:

Macronutrientes: carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno.

Micronutrientes: fósforo, potasio, azufre, magnesio.

Vitaminas y hormonas

Elementos traza: zinc, cobre, manganeso, molibdeno, cobalto¹⁷.

3.3.1 Nutrición de los hongos. Según Wainwright:

Los hongos están considerados como quimioheterótrofos estrictos. Son incapaces de fotosintetizar y por consiguiente necesitan substratos ricos en energía para alcanzar sus requerimientos de energía y biomasa. Los hongos producen una amplia variedad de enzimas extracelulares, principalmente oxidasas e hidrolasas y pueden utilizar la mayor parte de

¹⁶ MERCK, E. Manual de medios de cultivo. Alemania : E Merck, 1994. p. 183.

¹⁷ MATEOS GONZÁLES, P. Nutrición microbiana. [en línea]. [citado 26 septiembre 2002]. Disponible en Internet: URL: <<http://www.geocities.com/CollegePark/Lab/2960/Mic4.htm> - 11k.>

los substratos orgánicos que existen naturalmente, incluyendo la celulosa, la quitina, el almidón, azúcares, hemicelulosas y lignina.

Normalmente los carbohidratos son las principales fuentes de carbono accesibles a los hongos. Son metabolizados para proporcionar energía y también actúan como precursores para la síntesis de material celular. Otras fuentes de carbono utilizadas por los hongos incluyen alcoholes, hidrocarburos, glicerol y almidón.

Los hongos utilizan nitrógeno, fundamentalmente en la forma de amonio, aunque casi todos pueden utilizar nitrato. Otras fuentes de nitrógeno incluyen urea, hidroxilamina, L-aminoácidos y péptidos; sin embargo, los D-aminoácidos son fuentes pobres de nitrógeno o en ciertos casos son tóxicos.

El hongo *Aspergillus niger*, puede hidrolizar los enlaces peptídicos entre los aminoácidos que forman las proteínas para producir polipéptidos, oligopéptidos y aminoácidos que luego son metabolizados a amonio, para ser asimilado.

Otros nutrientes minerales importantes requeridos por los hongos para un máximo rendimiento incluyen fósforo, azufre, potasio y magnesio. También se requieren para el funcionamiento de las enzimas en condiciones de crecimiento rápido nutrientes menores, como zinc, cobre, molibdeno y vitaminas¹⁸.

3.4 FERMENTACIÓN BIOLÓGICA

La historia de las fermentaciones según lo reporta García: “inicio con Louis Pasteur quien demostró que la producción de alcohol en la fermentación se debe a las levaduras y que la indeseable producción de sustancias (ácido láctico, o ácido acético) que agrian el vino se debe a la presencia de organismos como las bacterias”¹⁹.

Hacia el año de 1900 se inició la producción industrial de levadura de panadería y la biomasa de levadura fue utilizada como alimento humano durante la primera guerra mundial en Alemania. Desde 1960 aproximadamente, los microorganismos empezaron a ser utilizados como una fuente de alimento para animales y a finales de los 60 se empezó la producción a gran escala de biomasa como fuente de

¹⁸ WAINWRIGHT, Op.cit., p. 10.

¹⁹ GARCÍA, J. Un químico para la historia: Louis Pasteur (1822-1895). En: Revista químicos del principado y AI – Químicos. [en línea]. Marzo de 1999. [citado 6 noviembre 2002]. Disponible en Internet: URL : <<http://www.alquimicos.com/quimprin/38/pasteur.html>>

proteína comercial. Los reportes de Hernandez²⁰ dicen: “que en la actualidad los microorganismos se utilizan para producir diversos compuestos químicos, tales como: antibióticos, vitaminas, aminoácidos, ácidos orgánicos y alcohol entre otros”²⁰.

3.4.1 Fermentación y tipos de fermentaciones. Según Wainwright:

Las fermentaciones industriales con hongos requieren en primer lugar un substrato, o nutriente; este es generalmente un azúcar, como sacarosa, glucosa o lactosa, aunque también puede ser un alcohol o algún producto residual, como efluentes de destilería o material de desecho de repostería, que son más económicos que el uso de substratos puros. En segundo lugar se requiere una fuente de nitrógeno, y finalmente nutrientes menores y vitaminas. Además, como son organismos aerobios, los procesos de producción industrial implican invariablemente la aireación u oxigenación del medio líquido de crecimiento. Sin embargo, puesto que la solubilidad del oxígeno en agua es relativamente baja, la velocidad de la transferencia de oxígeno y la toma de oxígeno son frecuentemente la etapa limitante durante el proceso a escala industrial. Por consiguiente es necesaria la máxima transferencia de oxígeno al mínimo costo posible, un proceso que generalmente implica el uso de un reactor de tanque agitado o fermentador²¹.

Hay tres tipos de fermentación biológica: continua, discontinua y retroalimentada. En esta investigación se realizó la fermentación discontinua, porque fue la más factible de realizar de acuerdo a nuestras disponibilidades y la que permitió un mejor control de las variables a estudiar.

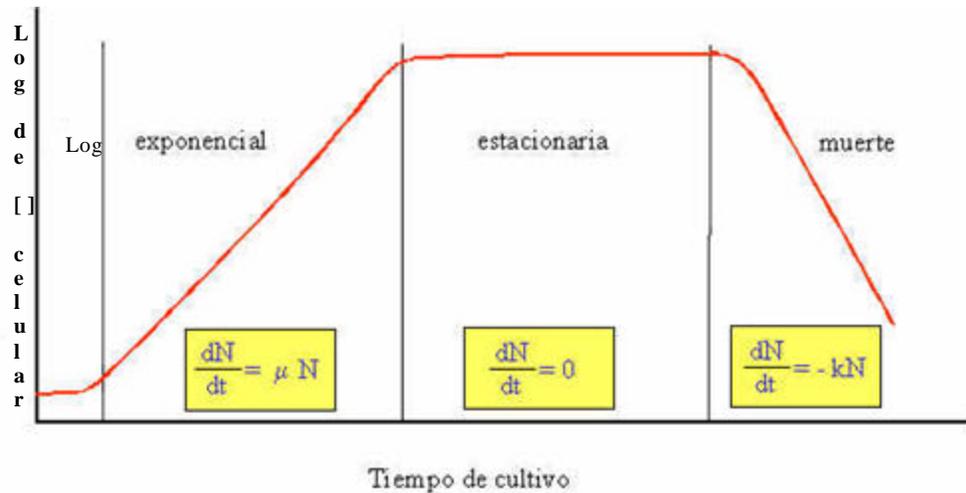
• **Fermentación discontinua.** Una fermentación discontinua (en batch) se puede considerar como un “sistema cerrado”. A tiempo cero, la solución esterilizada de nutrientes se inocula con microorganismos y se permite que se lleve a cabo la incubación en condiciones óptimas de fermentación. A lo largo de toda la fermentación no se añade nada, excepto oxígeno (en forma de aire), un agente antiespumante y ácidos o bases para controlar el pH. La composición del medio de cultivo, la concentración de biomasa y la concentración de metabolitos cambia generalmente en forma continua como el resultado del metabolismo de las células. Después de la inoculación de una solución nutritiva estéril con microorganismos y su cultivo en condiciones fisiológicas se observan cuatro fases

²⁰ HERNANDEZ, E. Producción de proteína a partir de petróleo. [en línea]. [Maracaibo, Venezuela]. Universidad Zulía Maracaibo. [citado 23 mayo 2002]. Disponible en Internet: URL: <http://www.redpav-fpolar.info.ve/fagroluz/v02_3/v023z003.html - 84k>

²¹ WAINWRIGHT, Op.cit., p. 10.

típicas de crecimiento: fase de latencia, fase logarítmica, fase estacionaria y fase de muerte, tal como se aprecia en la figura 2.

Figura 2. Curva de crecimiento de un cultivo bacteriano.



Fuente: CRUEGER, W. y CRUEGER, A. "biotecnología: Manual de microbiología industrial".

μ = Velocidad específica de crecimiento.

N = Densidad celular.

La fase de latencia se presenta cuando las células se transfieren de un medio a otro, donde no existe inicialmente aumento en el número de células, aunque la masa celular puede cambiar. En esta fase, los microorganismos se adaptan a su nuevo ambiente. Debido a esta transferencia al nuevo medio probablemente las células alteraran parámetros como: cambios en el valor de pH, aumento en el suministro de nutrientes y descenso en los inhibidores de crecimiento. También en las células se inducen nuevos sistemas de transporte. Fuera de la célula se pueden difundir cofactores esenciales y las enzimas del metabolismo primario se deben ajustar a las nuevas condiciones.

Al final de la fase de latencia las células se han adaptado a las nuevas condiciones de crecimiento. Entonces comienza la fase logarítmica. En esta fase aumenta el crecimiento de la masa celular y este crecimiento se describe cuantitativamente en función de la duplicación del número de células por unidad de tiempo o por la duplicación de la biomasa por unidad de tiempo (organismos filamentosos como estreptomicetos y hongos). Representando el número de células o la biomasa frente al tiempo en una gráfica semilogarítmica se obtiene una línea recta, de ahí el nombre de "fase logarítmica".

Aunque las células alteran el medio debido a la toma de sustratos y la secreción de productos metabólicos, la velocidad de crecimiento permanece constante durante la fase logarítmica. La velocidad de crecimiento es independiente de la concentración de sustrato en tanto que exista exceso de éste sustrato. Crueger y Crueger²², reportan las velocidades específicas de crecimiento (μ) de algunos hongos, entre ellos el *Aspergillus niger* sobre glucosa obteniendo a una temperatura de 30°C, una μ de 0.20 por hora y un tiempo de duplicación de 3.46 horas. Es al final de esta fase donde se obtiene la mayor cantidad de biomasa.

Tan pronto como el sustrato se metaboliza o se forman sustancias tóxicas, el crecimiento desciende o se detiene completamente. Esta es la fase estacionaria, donde la biomasa aumenta solo gradualmente o permanece constante, aunque la composición de las células puede cambiar. En esta fase, debido a la lisis, se liberan nuevos sustratos (carbohidratos, proteínas) que pueden servir como fuentes de energía para el crecimiento lento de los supervivientes. Los distintos metabolitos formados en esta fase son frecuentemente de gran interés biotecnológico, se conoce como Idrofase debido a la formación de Idrolitos o metabolitos secundario.

Por ultimo viene la fase de muerte, donde las reservas de energía de las células se agotan, produciendo la muerte de las células. En los procesos comerciales la fermentación frecuentemente se interrumpe al final de la fase logarítmica o antes que comience la fase de muerte.

En las fermentaciones, los microorganismos pueden producir metabolitos primarios o secundarios dependiendo de las condiciones de crecimiento (medio de cultivo). Los metabolitos primarios se producen cuando el microorganismo crece en un ambiente donde sus nutrientes esenciales están en exceso. Estos nutrientes se transforman en los productos finales del metabolismo energético, en calor o bien en compuestos requeridos para la reproducción. Algunos de los metabolitos primarios más importantes comercialmente son: alcohol, disolventes industriales, aminoácidos, ácidos orgánicos, ácidos nucleicos, polisacáridos, grasas, vitaminas, enzimas, y la biomasa celular, considerada como el metabolito primario más importante. Los metabolitos secundarios se producen cuando la concentración de sustratos va disminuyendo. Esto ocurre en la fase estacionaria donde se producen sustancias tales como antibióticos, toxinas y alcaloides.

²² CRUEGER, Op.cit., p. 74.

- **Fermentación continua.** Mateos comenta que: “en la fermentación continua se establece un sistema abierto. La solución nutritiva estéril se añade continuamente al biorreactor y una cantidad equivalente de solución utilizada de los nutrientes, con los microorganismos, se saca simultáneamente del sistema”²³.

- **Fermentación retroalimentada (fed-batch).** En los procesos alimentados, los sustratos se añaden escalonadamente a medida que progresa la fermentación. La formación de muchos metabolitos secundarios está sometida a represión catabólica (efecto glucosa). Por esta razón, en el método alimentado, los elementos críticos de la solución de nutrientes se añaden en pequeñas concentraciones al principio de la fermentación y continúan añadiéndose a pequeñas dosis durante la fase de producción.

3.5 PROCESO FERMENTATIVO

La parte central de un proceso fermentativo es el crecimiento del microorganismo en unas condiciones ambientales que estimulan la síntesis del producto comercial que se pretende obtener. Crueger y Crueger, reportan que: “La fermentación se realiza en un recipiente (fermentador) en el que se mantiene el microorganismo a la temperatura, pH, concentración de oxígeno disuelto y concentración de sustratos deseados”²⁴. Sin embargo, el cultivo del microorganismo en el fermentador es solo una de las numerosas fases del proceso. El medio en el que crece el microorganismo se formula de acuerdo con las materias primas y, posteriormente, se esteriliza. A continuación se inocula con un cultivo viable, metabólicamente activo. Después del crecimiento se separan las células de la porción líquida y se recoge la fracción que interesa (bien las células o el sobrenadante libre de células). Para que pueda realizarse la fermentación es necesario, en primer lugar, obtener un microorganismo adecuado para el proceso que se pretende llevar a cabo, lo que se efectúa normalmente seleccionando cepas naturales; la productividad del mismo debe aumentarse hasta obtener buenos niveles económicos, lo que se realiza mediante mejoras en el diseño de proceso y las condiciones de fermentación.

3.5.1 Preservación del inóculo. En la preservación del inóculo, las cepas se deben mantener tanto tiempo como sea posible sin división celular, conservando su viabilidad y capacidad de formar producto. Por esta razón las cepas de muestra se deben cultivar una vez cada dos años. Hay tres formas de preservar el inóculo: almacenamiento a baja temperatura (2-6°C), almacenamiento por congelación (-18 ó -80°C) y liofilización.

²³ MATEOS GONZÁLEZ P. Tipos de fermentadores. [en línea]. [Citado 26 septiembre 2002]. Disponible en Internet: URL: <<http://www.nostoc.usal.es/sefin/MI/tema12MI.html>>

²⁴ CRUEGER, Op.cit., p. 116.

3.5.2 Crecimiento del inóculo. El cultivo preservado se reaviva mediante crecimiento en un cultivo líquido agitado o en medio sólido. Para esto se deben tener en cuenta las condiciones utilizadas en el cultivo inicial (medio, temperatura de incubación etc.).

3.5.3 Parámetros más importantes durante la fermentación. Algunos parámetros son:

- **Temperatura.** La temperatura es uno de los parámetros esenciales para el éxito de una fermentación; por lo tanto, a medida que la temperatura aumenta, se aumenta la velocidad de las reacciones enzimáticas y por lo tanto el crecimiento se hace más rápido. Sin embargo, por encima de cierta temperatura se produce la desnaturalización de las proteínas y la descomposición de los componentes celulares esenciales para mantener la vida de los microorganismos, como son los ácidos nucleicos. Para cada microorganismo existe una temperatura mínima por debajo de la cual no hay crecimiento, una temperatura óptima a la cual el crecimiento es el más rápido y una temperatura máxima por encima de la cual no hay crecimiento. A fin de obtener rendimientos óptimos, las fermentaciones se deben llevar a cabo en un margen estrecho de temperatura y de ser posible constante. Las fermentaciones se realizan dentro del rango mesofílico (temperatura óptima 20-45°C) o el termófilo (mayor de 45°C).
- **Oxígeno.** Según Mateos, “Uno de los factores más críticos en la operación de fermentación es el suministro de oxígeno, que se realiza por medio de la aireación”²⁵. Este sustrato gaseoso es el más importante para el metabolismo microbiano. Un bajo nivel de oxígeno disuelto inhibe los cultivos aeróbicos mientras que los niveles altos inhiben la disolución de oxígeno y desperdician energía. Además, como el oxígeno se introduce en forma de aire, este se debe esterilizar. El método más usado para la esterilización es la filtración.
- **pH.** La mayor parte de los microorganismos crecen de manera óptima entre pH 5.5 y 8.5, pero durante el crecimiento en un fermentador, los metabolitos celulares son liberados al medio, lo que puede originar un cambio del pH del medio de cultivo. Por lo tanto, se debe controlar el pH del medio de cultivo y añadir un ácido o una base cuando se necesite para mantener constante el pH. La adición y mezcla del ácido o base se debe hacer rápidamente de tal manera que el pH del medio de cultivo sea el mismo en todo el fermentador. Según Bustamante Z. *et al*, “El hongo *Aspergillus niger* crece entre un pH 3.5 a 4.3, obteniendo mayor producción de proteína a pH 3.5”²⁶.

²⁵ MATEOS GONZÁLEZ P. Tipos de fermentadores. Op.cit.

²⁶ BUSTAMANTE, Op.cit.

Independientemente de las condiciones en que vivan los microorganismos (pH extracelular), el pH intracelular debe permanecer cercano a la neutralidad con el objeto de mantener activas las macromoléculas que intervienen en el mantenimiento de la vida celular.

- **Agitación y mezclado.** Mateos, menciona que:

Una adecuada agitación de un cultivo microbiano es esencial para la fermentación ya que produce los siguientes efectos:

1. - Dispersión del aire en la solución de nutrientes.
2. - Homogenización, para igualar la temperatura, pH y concentración de nutrientes, en el fermentador.
3. - Suspensión de los microorganismos y de los nutrientes sólidos.
4. - Dispersión de los líquidos inmiscibles²⁷.

Los autores Wiseman²⁸, Grueger y Grueger²⁹ concluyen que, bajo estas condiciones, cuanto mayor sea la agitación, mejor será el crecimiento. Sin embargo, la agitación excesiva puede romper las células grandes e incrementar la temperatura lo que ocasiona un descenso en la viabilidad celular.

- **Recuperación del producto.** Hernández, explica que: “la recuperación del producto depende de: su naturaleza, su concentración, los productos laterales presentes y la estabilidad del material biológico”³⁰. Para recuperar la bioproteína, donde el propio microorganismo es el producto final deseado, se calienta la solución haciendo que las células se agreguen en grandes partículas, las cuales se pueden separar por sedimentación.

3.6 PROTEÍNA

Las proteínas, junto con los carbohidratos, grasas, vitaminas y minerales, hacen parte de los cinco nutrientes principales, en la nutrición de la mayoría de seres vivos, que son esenciales para mantener la salud y un crecimiento normal.

²⁷ MATEOS GONZÁLES, P. Nutrición microbiana. [en línea]. [citado 26 septiembre 2002]. Disponible en Internet: URL: <<http://www.geocities.com/CollegePark/Lab/2960/Mic4.htm> - 11k.>

²⁸ WISEMAN Alan. Principios de Biotecnología. Zaragoza, España : Acribia, 1986. 444 p.

²⁹ CRUEGER, Op.cit. p. 118.

³⁰ HERNANDEZ, Op.cit.

La función primordial de la proteína es producir tejido corporal, sintetizar enzimas, algunas hormonas y otras sustancias complejas, que rigen los procesos corporales. Además las proteínas son compuestos orgánicos constituidos por aminoácidos unidos por enlaces peptídicos que intervienen en diversas funciones vitales esenciales, como el metabolismo, la contracción muscular o la respuesta inmunológica. Se descubrieron en 1838 y hoy se sabe que son los componentes principales de las células y que suponen más del 50 por ciento del peso seco de los animales.

Mertz comenta que: “Las necesidades de proteínas de los animales generalmente se expresan como un por ciento de la dieta la cual se puede reducir sin alterar la rapidez del crecimiento”³¹. La proteína administrada a los animales en exceso, respecto a las necesidades corporales, se convierte en carbohidratos (o grasas intermedias) y se oxida para obtener energía, o se convierte en grasa y se almacena. Como la proteína es uno de los nutrientes más caros en la alimentación animal, se realizan esfuerzos para mantener el nivel de proteína justamente al nivel o poco por encima de lo necesario para el crecimiento óptimo (o reproducción).

3.6.1 Producción de proteína (biomasa). Las células microbianas obtenidas en el proceso de la fermentación se utilizan principalmente como una fuente de proteína para la alimentación humana o animal o como inóculo comercial en las fermentaciones de la industria de elaboración de alimentos y en agricultura, tratamiento de desechos y otras aplicaciones. Los microorganismos utilizados en la fermentación y que sirven como alimento proteico, no deben ser patógenos ni tampoco formar toxinas y deben ser estables genéticamente, de forma que se mantengan las cepas con características fisiológicas y bioquímicas óptimas a través de cientos de generaciones, durante el proceso.

Existen plantas industriales para producir proteína unicelular en países tales como Inglaterra, Estados Unidos, Finlandia, la antigua Unión Soviética, Alemania, Cuba, Suecia y Suiza, donde el destino de la proteína unicelular depende de las necesidades de cada país. Generalmente, se pretende sustituir la soya o la harina de soya. En otros países es un concentrado proteico importante para la formulación de alimentos balanceados para animales, mientras que en Estados Unidos la producción se destina casi exclusivamente al campo de aditivos y saborizantes, potenciadores de sabor (sopas, cereales, consomés y salsas, entre otros) y como extendedores de productos cárnicos. En el ámbito experimental se ha investigado la producción de aislados proteicos de microorganismos, con el propósito de obtener proteínas de alto nivel nutricional para sustituirla

³¹ MERTZ, Edwin. Bioquímica. México, Buenos Aires :Centro regional de ayuda técnica, agencia para el desarrollo internacional, 1971. p. 33.

parcialmente en cereales, soya, leche, huevos y otros; y en la elaboración de helados, quesos, mayonesas, salchichas, margarinas, panes, etc.

Uno de los inconvenientes que presenta la proteína unicelular para su introducción como alimento para el hombre según los reportes de Ward³² es, el alto contenido de ácidos nucleicos (RNA), puesto que su producto final en el metabolismo es el ácido úrico. Este último es poco soluble en la sangre y orina y una concentración alta produce precipitación en los tejidos, articulaciones, vejiga y riñones, con repercusiones negativas para la salud (gota úrica, cálculos biliares, cálculos de riñón).

En el caso de los animales, la situación es distinta. En los que son utilizados como fuente proteínica para el hombre (carneros, cerdos y vacas) el sistema metabólico posee la enzima urato-oxidasa, que permite la degradación del ácido úrico a alantoína, un metabolito sin riesgos y fácilmente excretable. En consecuencia, la utilización de la proteína unicelular como complemento alimenticio de éstos no presenta riesgos.

³² WARD, Op.cit., p. 150.

4. METODOLOGÍA

La investigación comprendió cinco etapas: muestreo, tratamiento de las muestras, fermentación de los residuos sólidos orgánicos, análisis del producto y tratamiento estadístico de los resultados.

4.1 ZONA DE MUESTREO

Los residuos sólidos orgánicos se recolectaron en tres plazas de mercado de la ciudad de San Juan de Pasto. El Potrerillo ubicada en la zona sur de la ciudad, Lorenzo de Aldana ubicada en el sur oriente de la ciudad y Los Dos Puentes ubicada en la zona céntrica.

4.2 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Los residuos orgánicos sólidos se recolectaron mensualmente, durante cuatro meses, iniciando en junio y terminando en octubre del 2003. De cada plaza se escogió un sitio, donde se depositaban los residuos sólidos orgánicos frescos para su posterior recolección por la empresa de aseo. En cada una de ellas se tomó una muestra de 1500 gramos, similar a la que se muestra en la figura 3, producto de la mezcla de tres submuestras de 500 gramos. Las muestras frescas se transportaron en recipientes plásticos a los laboratorios de la Universidad de Nariño, para su posterior análisis.

Figura 3. Fotografía de los residuos sólidos orgánicos en el sitio de muestreo.



4.3 TRATAMIENTO PRELIMINAR DE LAS MUESTRAS

Una vez en el laboratorio, las muestras se pesaron, se secaron al ambiente, durante siete días, y luego en estufa a 65 °C, durante 48 horas. El residuo seco se molió en molino eléctrico Nossen y se pesó. Luego, se determinó el contenido inicial de carbohidratos, mediante el método de Antrona, el contenido inicial de grasas utilizando el método de Soxhlet, el contenido inicial de materia orgánica por incineración de la muestra, el porcentaje de proteína verdadera inicial por el método de Microhjedahl y el pH con pHmetro.

4.3.1 Determinación de carbohidratos. La determinación de carbohidratos totales se realizó por el método de Antrona, para lo cual inicialmente se realizó una curva de calibración a 620 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer con soluciones de glucosa de 10, 20, 40, 60 y 100 ppm. Para la determinación de los carbohidratos en las muestras, se tomaron 200 miligramos de cada una y se agregaron a 10 ml de agua, se agitó magnéticamente el conjunto durante 10 minutos y se filtró a través de papel filtro cualitativo. Del filtrado se tomaron 2 ml y se diluyeron hasta 10 ml con agua, de aquí se tomaron 2 ml y se diluyeron a 10 ml con reactivo de Antrona al 0.1% en ácido sulfúrico concentrado, luego se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro a 620 nm. En muestras donde la concentración de carbohidratos era muy alta fue necesario hacer diluciones para poder leer en el espectrofotómetro.

4.3.2 Determinación de grasas. La determinación de grasas se realizó por el método de Soxhlet. Se tomó un gramo de cada una de las muestras, se empacó en papel filtro cualitativo y se introdujo en el equipo Soxhlet. Como agente extractor se utilizó éter de petróleo, y se dejó en reflujo durante ocho horas. El cálculo del porcentaje de grasa en la muestra se obtuvo por diferencia de pesos entre el balón vacío que fue previamente tarado y el balón con las grasas adheridas después de la extracción.

4.3.3 Determinación de materia orgánica. La determinación de materia orgánica se hizo por el método de incineración. Se pesó un gramo de cada una de las muestras, las cuales se colocaron en crisoles previamente tarados, luego se introdujeron en una mufla a 600 grados centígrados por cuatro horas, se enfriaron en desecador, se pesaron y el porcentaje de materia orgánica se encontró por diferencia de pesos.

4.3.4 Determinación de proteína verdadera. En la determinación de proteína verdadera se hizo un tratamiento previo a la muestra para realizar luego el método de Microhjedahl. Para el efecto se pesaron 200 miligramos de muestra que se agregaron a 20 mililitros de agua destilada. El conjunto se colocó en reflujo durante una hora para coagular la proteína, al cabo de la cual se filtró en papel filtro cualitativo y se lavó con agua caliente con el fin de eliminar el nitrógeno no

proteico, se seco en estufa a 60 grados centígrados y a la muestra con el papel filtro se le determino proteína por el método de Microhjeldahl.

4.4 OBTENCIÓN DE LA CEPA DE *Aspergillus niger*

La cepa de *A. niger* se obtuvo a través del Departamento de Microbiología de la Universidad Javeriana de Bogotá. En todos los casos, para el proceso de fermentación, se aplicaron 10 ml de suspensión del hongo en agua estéril, con un contenido mínimo de 10^6 esporas por mililitro, a un litro de la mezcla que contenía los residuos sólidos y el nutriente nitrogenado.

4.5 CURVA DE CRECIMIENTO DEL HONGO *Aspergillus niger*

Inicialmente, para determinar el tiempo óptimo de fermentación, se estandarizó la curva de crecimiento de *Aspergillus niger*. Para tal efecto se determinó la longitud de honda de máxima absorbancia de la solución con residuos sólidos orgánicos al uno por ciento (esta concentración se tomo teniendo en cuenta la preparación del medio de cultivo estándar para hongos en caldo peptonado reportado por Merck³³), y sin fuente nitrogenada, tomando como blanco agua destilada. Utilizando esta longitud de onda se hizo la curva de crecimiento tomando lecturas cada dos horas de muestras de los residuos sólidos en fermentación con *Aspergillus niger*. Este procedimiento se hizo por triplicado con dos muestras diferentes.

4.6 FERMENTACIÓN

El biorreactor que se utilizó para la fermentación (Figura 4), consta de un Erlenmeyer de 2 litros, el cual tiene en la base un dispositivo de entrada por donde se hizo la inoculación, y en la parte superior se encuentra un dispositivo que permite la entrada y salida de aire; allí se encuentran filtros de algodón y fibra de vidrio para prevenir contaminación. El aire se introdujo al biorreactor mediante una aireador de acuario.

³³ MERCK, Op.cit., 183.

Figura 4. Fotografía del fermentador.



La fermentación se realizó dentro del laboratorio de Fijación Biológica de Nitrógeno de la Universidad de Nariño, donde se pudo mantener relativamente constantes la temperatura (18°C – 22°C) y la humedad ambiente (78.5 por ciento^{*}); para esto se tomaron 10 gramos de muestra para cada tratamiento, se introdujeron en los biorreactores con un litro de agua y su nutriente nitrogenado, se esterilizaron en autoclave y por una noche con luz ultravioleta. Luego, con una jeringa estéril se inoculó el conjunto con 10 mililitros de suspensión de ***Aspergillus niger*** con una concentración de 10⁶ esporas / mililitro. Luego, se conectaron los aireadores y se agitó magnéticamente.

Como nutrientes nitrogenados se utilizaron: Urea, Nitrato de potasio y Nitrato de amonio, en concentraciones que iban del 0.5 % al 3.0% del peso total. Se dejó fermentar bajo condiciones estándares de agitación y aireación igual para todos los tratamientos durante el mismo tiempo, según la curva de crecimiento.

^{*} Instituto de Hidrológica Meteorología y Estudios Ambientales. (IDEAM). Registro climático. 2003

En total se realizarán trece tratamientos así:

T1 = Residuos sólidos más *Aspergillus niger*

T2 = Residuos sólidos más *Aspergillus niger* más Urea al 0.5%

T3 = Residuos sólidos más *Aspergillus niger* más Urea al 1.0%

T4 = Residuos sólidos más *Aspergillus niger* más Urea al 2.0%

T5 = Residuos sólidos más *Aspergillus niger* más Urea al 3.0%

T6 = Residuos sólidos más *Aspergillus niger* más Nitrato de potasio al 0.5%

T7 = Residuos sólidos más *Aspergillus niger* más Nitrato de potasio al 1.0%

T8 = Residuos sólidos más *Aspergillus niger* más Nitrato de potasio al 2.0%

T9 = Residuos sólidos más *Aspergillus niger* más Nitrato de potasio al 3.0%

T10 = Residuos sólidos más *Aspergillus niger* más Nitrato de amonio al 0.5%

T11 = Residuos sólidos más *Aspergillus niger* más Nitrato de amonio al 1.0%

T12 = Residuos sólidos más *Aspergillus niger* más Nitrato de amonio al 2.0%

T13 = Residuos sólidos más *Aspergillus niger* más Nitrato de amonio al 3.0%

Se realizaron tres replicaciones a cada tratamiento. Una vez finalizada la fermentación, el producto se calentó en estufa 60 °C aproximadamente para aglutinar la bioproteína, se filtró utilizando una mota de algodón en el embudo, se secó en estufa a 65 °C durante 48 horas, se pesó, se molió en un mini molino eléctrico Ika y se determinó el contenido final de carbohidratos mediante el método de Antrona, el contenido final de grasas utilizando el método de Soxhlet, el contenido final de materia orgánica por incineración de la muestra, el porcentaje de proteína verdadera final, por el método de Microhjedahl, y el pH con pHmetro.

4.7 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE RESULTADOS

Para la tabulación de los datos se realizó un diseño experimental irrestrictamente al azar con tres replicaciones y trece tratamientos, con lo cual se hizo un análisis de varianza, y como resultó significativo se procedió a hacer la prueba de medias de Tukey. Se escogió este tratamiento estadístico ya que las condiciones como temperatura, agitación y aireación son homogéneas para todos los tratamientos.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS

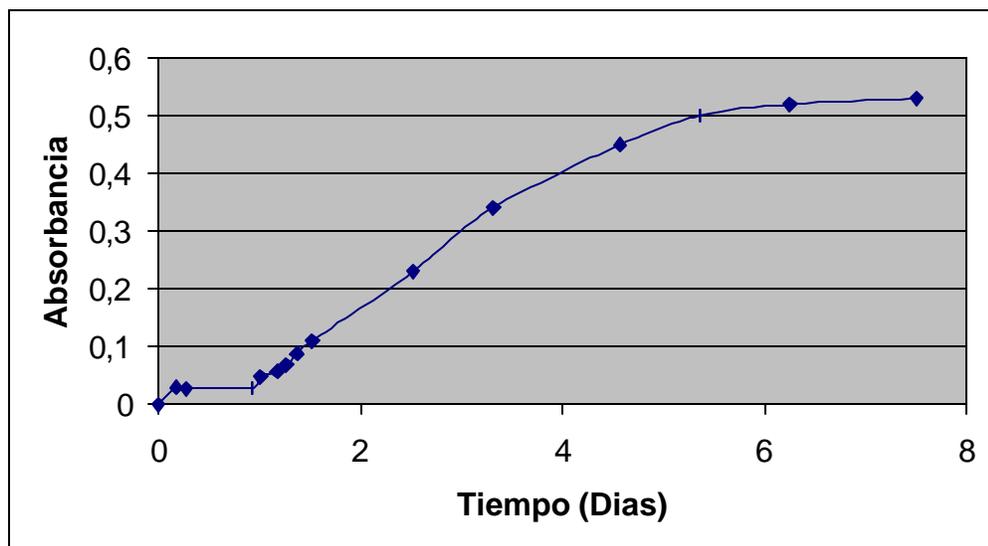
Las muestras recolectadas en los cuatro meses, tenían una composición similar: residuos de papa, de frutas como naranja, piña, mango, guayaba, tomate, mandarina, limón y plátano, de hortalizas como cebolla, de cáscaras de fríjol y arveja. Los más abundantes fueron los residuos de naranja y limón; estos residuos por ser frutos cítricos favorecieron el crecimiento del hongo ya que ayudaron a mantener un pH ligeramente ácido (5.2 en promedio) en todas las muestras. La humedad de las muestras fue en promedio de 85 por ciento.

5.2 FERMENTACIÓN

Se encontró que la solución con residuos sólidos orgánicos tenía una absorbancia máxima a una longitud de onda de 330 nm, esta longitud de onda se utilizó para hacer la curva de crecimiento del *Aspergillus niger*, la cual se muestra en la figura 5. La curva muestra que la absorbancia de la solución en fermentación es directamente proporcional al crecimiento del microorganismo; así, cuando el microorganismo se reproduce, aumenta también la absorbancia.

La figura 5 muestra que el hongo *Aspergillus niger* permaneció en fase de latencia un día, donde no hubo un crecimiento significativo porque el hongo se estaba adaptando al medio. Después del primer día se observó un crecimiento significativo, ya que el hongo entra en la fase de crecimiento exponencial, la que se hizo cada vez más evidente por la formación de hifas algodonosas de color blanco y el incremento de la absorbancia en la solución. Esto obligó a aumentar las revoluciones del agitador magnético para optimizar el crecimiento. La fase exponencial terminó en promedio a los seis días, esto se determinó ya que la absorbancia se estabilizó después de la inoculación, lo que indicó que el microorganismo se dejó de reproducir por la falta de nutrientes, entrando en la fase estacionaria donde se pueden producir metabolitos secundarios tóxicos o mutación del microorganismo. En adelante y para todos los ensayos, el tiempo que se utilizó para la fermentación de los residuos sólidos orgánicos fue de seis días, cuando terminó la fase exponencial, la producción de biomasa era la mayor y no existían metabolitos secundarios tóxicos que pudieran alterar el producto haciéndolo no apto para el consumo de animales.

Figura 5. Curva de crecimiento del hongo *Aspergillus niger* a 330 nm



5.3 PRODUCCIÓN DE BIOPROTEÍNA

El cuadro 1 muestra el porcentaje de proteína de las diferentes muestras de residuos orgánicos sólidos recolectados de las tres plazas de mercado de la ciudad de San Juan de Pasto. Como se observa, el porcentaje promedio de proteína de estos residuos es bajo (5.6 %). Sin embargo, este contenido es superior al encontrado en residuos industriales como el bagazo de naranja que es del 4.45 por ciento reportado por Bustamante Z. *et al*³⁴, y banano que es del 3.8 por ciento reportado por el Centro de investigaciones científicas³⁵, que han sido utilizados para producir bioproteína con el hongo *Aspergillus niger*.

Por otra parte y como lo reporta Wainwright:

Esta proteína se puede utilizar como sustrato para microorganismos fermentadores como el hongo *Aspergillus niger*, los cuales pueden hidrolizar los enlaces peptídicos entre los aminoácidos que forman las proteínas para producir polipéptidos, oligopéptidos y aminoácidos, los que son, luego, metabolizados a amonio. Este es asimilado como fuente alternativa de nitrógeno para sintetizar sus propias proteínas y, por consiguiente, aumentar la biomasa³⁶.

³⁴ BUSTAMANTE, Op.cit.

³⁵ CENTRO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, Op.cit.

³⁶ WAIWRIGHT, Op.cit., p. 10.

Cuadro 1. Porcentaje de proteína de las muestras utilizadas en las fermentaciones

Muestra No.*	Proteína (%)
1	6.72
2	6.52
3	4.37
4	4.81
Promedio	5.6

* Las muestras numero 1, 2, 3 y 4 fueron las recolectadas en los cuatro meses de muestreo.

El análisis de varianza (Anexo A), muestra que existe diferencia estadística significativa al 95 por ciento de confianza entre los tratamientos, por lo cual se hizo la prueba de Tukey para los diferentes tratamientos.

La prueba de Tukey al 5 por ciento de probabilidad (Anexo A), muestra que no existe diferencia significativa entre los tratamientos con Nitrato de amonio y Nitrato de potasio (T6 = T7 = T8 = T9 = T10 = T11 = T12 = T13), y tampoco entre los tratamientos con Urea (T2 = T3 = T4 = T5). De estos resultados se puede concluir, que la aplicación de los nutrientes nitrogenados en diferentes concentraciones no afectó el rendimiento en la producción de proteína. Por lo cual, se aconseja aplicar la mínima concentración de nutriente nitrogenado, la cual es 0.5 por ciento, porque se obtienen resultados similares que con concentraciones más altas. De acuerdo con lo anterior, la aplicación de Nitrato de Amonio al 0.5 por ciento ó Nitrato de Potasio al 0.5 por ciento garantizan una mayor producción de proteína, en las condiciones más económicas, porque estos nutrientes fueron los que presentaron los mayores promedios en producción de proteína.

Los tratamientos con Urea no dieron buenos resultados, a pesar de que sí se observó crecimiento del hongo por la formación de hifas algodonosas de color blanco. Probablemente, no hubo un aumento considerable de proteína, por ser la Urea un compuesto básico. Esto hacía que la solución virara hacia un pH básico (8 a 7.5) lo cual no favorece el desarrollo del hongo *Aspergillus niger* ya que, según Bustamante, Z. *et al*, "este crece favorablemente entre pH 3.5 a 5"³⁷.

Como lo muestra el cuadro 2, el tratamientos Testigo (T1) tuvo un rendimiento bajo comparado con los tratamientos con Nitrato de Amonio y Nitrato de Potasio, evidenciando que la adición de estos nutrientes nitrogenados favorecen la producción de bioproteína.

³⁷ BUSTAMANTE, Op.cit.

Cuadro 2. Promedios en porcentajes de bioproteína obtenida después de las fermentaciones con *Aspergillus niger*, de los residuos sólidos orgánicos, con nutrientes en diferentes concentraciones.

Testigo	Concentración	NH ₄ NO ₃	KNO ₃	CO(NH ₂) ₂
1.37	0.5 %	4.55	4.51	0.50
1.52	1.0 %	5.78	5.41	0.44
1.70	2.0 %	5.85	5.69	0.10
	3.0 %	5.03	4.61	0.20
X = 1.53	Promedio	5.30	5.05	0.31

Como se observa en el cuadro 3, la fermentación de residuos orgánicos sólidos con *Aspergillus niger* produce un incremento en bioproteína del 94.64 por ciento en promedio, con el nutriente Nitrato de amonio y del 90.17 por ciento en promedio, con el nutriente Nitrato de potasio, con respecto a la proteína inicial del 5.60 por ciento en la muestra (cuadro1). Por lo tanto el producto final de la fermentación enriquecido con *Aspergillus niger* presenta en promedio un contenido de proteína verdadera del 10.90 por ciento en base seca en la fermentación con Nitrato de amonio y del 10.65 por ciento en base seca con Nitrato de potasio, que puede ser utilizado en la alimentación de animales. Estos resultados son ligeramente más altos que los reportados por el Centro de investigaciones científicas³⁸ en la fermentación de banano de rechazo que fue de 9.56 por ciento, y los cuales ya han sido probados en la alimentación animal obteniendo buenos resultados, pero comparados con los resultados en residuos cítricos que fue del 20 por ciento reportados por Rodríguez J. *et al*³⁹ y en residuos de vagazo de naranja que fue del 18.06 por ciento reportados por Bustamante Z. *et al*⁴⁰, son más bajos. La mayor producción de proteína en residuos de frutas cítricas, se da posiblemente porque, estos presentan un pH inicial más ácido que los residuos orgánicos sólidos, lo cual favorece el desarrollo del microorganismo, o por las diferencias en la técnica de fermentación. En los tratamientos con Urea y el Testigo no se observaron buenos rendimientos, posiblemente por el pH básico (7.5) en el caso de la Urea o por la falta de nutrientes en el testigo.

³⁸ CENTRO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, Op.cit.

³⁹ RODRÍGUEZ, Op.cit.

⁴⁰ BUSTAMANTE, Op.cit.

Cuadro 3. Rendimientos de bioproteína en porcentaje después de la fermentación

Proteína inicial	Tratamiento	Bioproteína	Proteína en el producto	Rendimiento (%)
5.60	Testigo	1.53	7.13	27.32
5.60	CO(NH ₂) ₂	0.31	5.91	5.53
5.60	KNO ₃	5.05	10.65	90.17
5.60	NH ₄ NO ₃	5.30	10.90	94.64

5.4 MATERIA ORGANICA

El cuadro 4 nos indica, que todas las muestras tenían un contenido similarmente alto (90.37 por ciento) de materia orgánica. Esto nos indica que hay una muy buena fuente de carbono en los residuos orgánicos sólidos de las plazas de mercado. Lo que los hace Adecuados para el desarrollo del hongo *Aspergillus niger* que requiere sustratos con un alto contenido de carbono.

Cuadro 4. Porcentaje de materia orgánica de las muestras utilizadas en las fermentaciones.

Muestra	Materia Orgánica
1	89.18
2	90.92
3	90.97
4	90.43
Promedio	90.37

Del análisis de varianza al 95 por ciento de confianza (Anexo B), se observa que no hubo diferencia significativa en el porcentaje de materia orgánica después de la fermentación, manteniéndose el producto fermentado con un contenido de materia orgánica entre 87.95 y 92.05 por ciento (Cuadro 5), similar al inicial de 90.37 por ciento(Cuadro 4), lo cual indica que la fermentación con *Aspergillus niger* no afecta este parámetro. Este producto, además de contener un buen porcentaje de bioproteína contiene también un buen contenido de materia orgánica que probablemente es fuente de carbono potencialmente utilizable por los animales.

Cuadro 5. Promedios de materia orgánica encontrados después de la fermentación con los diferentes nutrientes y a diferentes concentraciones

Testigo	Concentración	CO(NH ₂) ₂	KNO ₃	NH ₄ NO ₃
92.85	0.5 %	91.90	90.53	91.98
92.27	1.0 %	88.41	92.32	93.70
92.80	2.0 %	92.82	83.57	92.78
X = 92.74	3.0 %	95.70	85.38	97.76
	Promedio	92.20	87.95	94.05

5.5 GRASAS

Cuadro 6. Porcentajes de grasas presentes en las muestras antes y después de la fermentación de los residuos sólidos orgánicos con nutrientes en diferentes concentraciones utilizando *Aspergillus niger*.

Antes	Después				
Muestra inicial	Testigo	Concentración	CO(NH ₂) ₂	KNO ₃	NH ₄ NO ₃
3.61	2.74	0.5 %	1.63	1.73	1.57
3.99	3.45	1.0 %	2.59	2.05	2.55
3.55	2.78	2.0 %	2.48	3.54	2.12
4.54		3.0 %	2.43	3.54	4.18
X =3.92	x = 2.99	Promedio	2.28	2.71	2.60

El análisis de varianza al 95 por ciento de confianza (Anexo C), muestra que no hay diferencia estadística significativa en el contenido de grasas después de la fermentación en ninguno de los tratamientos con *Aspergillus niger*. El contenido de grasas, con respecto a la muestra inicial como lo muestra el cuadro 7, disminuye después de la fermentación. La disminución es para los tratamientos con Nitrato de Potasio del 30.87 por ciento en promedio y del 33.67 por ciento en promedio para los tratamientos con Nitrato de Amonio, esta disminución en el producto fermentado se produce posiblemente por que el hongo *Aspergillus niger* los utilizó como nutriente o fuente de energía.

Cuadro 7. Comparación del contenido promedio de grasas antes y después de la fermentación.

Grasas iniciales	Tratamiento	Grasas finales	Diferencia	Porcentaje de disminución
3.92	Testigo	2.92	1.00	25.52
3.92	CO(NH ₂) ₂	2.28	1.64	41.84
3.92	KNO ₃	2.71	1.21	30.87
3.92	NH ₄ NO ₃	2.60	1.32	33.67

5.6 CARBOHIDRATOS

El cuadro 8, indica que las muestras de residuos sólidos orgánicos de las plazas de mercado, contienen en promedio una concentración alta de carbohidratos, los cuales, pueden ser un sustrato muy importante para el crecimiento del hongo *Aspergillus niger*.

Cuadro 8. Concentración en porcentaje de carbohidratos presentes en las muestras utilizadas en las fermentaciones.

Muestra	CONCENTRACIÓN
1	9.62
2	18.75
3	22.37
4	18.43
PROMEDIO	17.29

El análisis de varianza al 95 por ciento de confianza (Anexo D), sobre la concentración de carbohidratos, muestra que no hay diferencia estadística significativa en el contenido de carbohidratos en el producto para todos los tratamientos.

En los tratamientos donde hubo mayor producción de bioproteína (Nitrato de Potasio y Nitrato de Amonio) se determino la concentración de carbohidratos en el liquido filtrado después de la fermentación. Se encontró que la concentración de carbohidratos en promedio era del 11.22 por ciento con Nitrato de Amonio y 15.22 por ciento con el Nitrato de Potasio, lo que indica que hubo un aumento en los carbohidratos totales con respecto a los de la muestra inicial, esto se produjo ya que el *Aspergillus niger* produce también carbohidratos en la fermentación. La alta solubilidad de los carbohidratos en la solución acuosa hace que el producto fermentado contenga baja concentración de estos.

Cuadro 9. Porcentajes de carbohidratos presentes después de las fermentaciones de los residuos sólidos orgánicos, con nutrientes en diferentes concentraciones utilizando *Aspergillus niger*.

Testigo	Concentración	CO(NH ₂) ₂	KNO ₃	NH ₄ NO ₃
1.85	0.5 %	0.56	5.30	4.21
1.88	1.0 %	1.98	4.68	2.52
2.03	2.0 %	2.51	4.28	3.45
	3.0 %	0.66	3.07	4.37
X = 1.92	Promedio	1.44	4.33	3.63

Al comparar los promedios de carbohidratos en los tratamientos con mayor producción de bioproteína, Nitrato de Potasio y Nitrato de Amonio (cuadro 9) con el promedio inicial en la muestra (cuadro 8), se observa que la disminución de carbohidratos iniciales en el producto fue en promedio para los tratamientos con Nitrato de Potasio del 74.95 por ciento, y para los tratamientos con Nitrato de Amonio del 78.42 por ciento; cantidad que está presente en la solución y se pierde al extraer el producto por filtración.

5.7 pH

El cuadro 10, indica que en los diferentes tratamientos a excepción de los tratamientos con Urea, el pH desciende desde 5.20 en la muestra inicial hasta 3.75 en promedio para los tratamientos con Nitrato de Potasio, Nitrato de Amonio y Testigo. Esto indica que a medida que hongo *Aspergillus niger* aumenta su biomasa, disminuye el pH en la solución hasta acercarse al pH ideal de crecimiento de 3.5, el cual además, no permite el crecimiento de bacterias y levaduras según lo reporta Bustamante Z. *et al*⁴¹. Los pH finales de los tratamientos con Nitrato de Potasio y con Nitrato de Amonio, confirman que el crecimiento del hongo fue satisfactorio, por lo cual en ellos hubo mayor producción de bioproteína.

Cuadro 10. Promedios de pHs después de las fermentaciones de los residuos sólidos orgánicos con los nutrientes en diferentes concentraciones utilizando el hongo *Aspergillus niger*

	Muestra	Testigo	CO(NH ₂) ₂	KNO ₃	NH ₄ NO ₃
Promedio	5.20	3.75	7.50	3.77	3.75

⁴¹ Ibid.

5.8 PESOS DE MUESTRAS

El cuadro 11, muestra que hay una disminución en el peso final del producto enriquecido con respecto a la muestra inicial. Esto se produjo por la solubilidad de algunos componentes como los carbohidratos, algunas proteínas solubles y metabolitos resultantes de la degradación de los residuos sólidos orgánicos por el hongo *Aspergillus niger* como ácido cítrico, ácido gluconio entre otros.

Cuadro 11. Comparación de promedios de pesos de muestras en gramos antes y después de las fermentaciones de los residuos sólidos orgánicos con nutrientes en diferentes concentraciones utilizando el hongo *Aspergillus niger*

Antes	Después				
	Testigo	Concentración	CO(NH ₂) ₂	KNO ₃	NH ₄ NO ₃
Muestra inicial					
10	5.70	0.5 %	5.86	5.57	5.64
10	6.37	1.0 %	5.55	6.89	6.51
10	7.45	2.0 %	8.14	8.40	8.16
10	5.49	3.0 %	5.16	6.35	5.23
X = 10	6.25	Promedio	6.17	6.80	6.38

6. CONCLUSIONES

Los residuos sólidos orgánicos presentaron en los meses de junio a octubre, un contenido similar en su composición, con un contenido alto de humedad, materia orgánica y carbohidratos y un contenido bajo de proteínas y lípidos.

Los residuos sólidos orgánicos se pueden utilizar como fuente de proteína utilizando Nitrato de Amonio al 0.5 por ciento ó Nitrato de potasio al 0.5 por ciento como nutrientes y el hongo ***Aspergillus niger*** como microorganismo fermentador.

La Urea, no permitió un crecimiento favorable de ***Aspergillus niger*** y, por lo tanto, no se recomienda como nutriente nitrogenado en ninguna concentración.

Durante la fermentación, la composición de proteína aumentó, la composición en materia orgánica permaneció constante, las grasas disminuyeron en baja proporción y los carbohidratos disminuyeron en una alta proporción.

7. RECOMENDACIONES

Realizar ensayos en planta piloto, con el objetivo de obtener un incremento en el contenido de proteína, utilizando Nitrato de Amonio al 0.5 por ciento ó Nitrato de Potasio al 0.5 por ciento como nutrientes nitrogenados, los residuos sólidos orgánicos como sustrato y el hongo ***Aspergillus niger*** como microorganismo fermentador.

Preparar concentrados para animales con el producto de la fermentación por ***Aspergillus niger*** de los residuos sólidos orgánicos y ensayar su aceptabilidad, toxicidad y mejoramiento en peso y desarrollo en diferentes especies animales.

Hacer un estudio sobre la rentabilidad económica del proceso.

Analizar otros productos de interés comercial, diferentes a la proteína, que se pueden obtener por fermentación de residuos sólidos orgánicos con ***Aspergillus niger***.

BIBLIOGRAFÍA

APRAEZ, G. Análisis químico de alimentos. Pasto : Universidad de Nariño, 1990. 175 p.

BENAVIDES, D. y ZAMUDIO, X. Aislamiento e identificación de microorganismos presentes en la descomposición del tamo de trigo y evaluación de su capacidad fermentativa de residuos fibrosos. Pasto, 2002, 80 p. Tesis (Biólogo). Universidad de Nariño.

BUSTAMANTE, Z.; GALINDO, E.; HUANTA, M. y BALLESTEROS, F. Obtención de bioproteína a partir de bagazo de naranja (*Citrus sinensis*) con *Aspergillus niger*. [en línea]. [Cochabamba, Bolivia]. Universidad mayor de San Simón. [citado 28 febrero 2002]. Disponible en Internet: URL : <<http://www.umss.edu.bo/epubs/earts/dowl-oads/49.pdfpdf>>

CENTRO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS. Enriquecimiento proteico del banano de rechazo por fermentación sólida para alimentación animal. [en línea]. [Ambato, Ecuador]. Universidad Técnica de Ambato. 2003. [citado 20 enero 2004]. Disponible en Internet: URL: <<http://www.mag.gov.ec/promsa/resumen%20%20IQ-CV-026-hm-7k>>

ENTREVISTA con Ricardo Londoño, Director Técnico de Empresa Metropolitana de Aseo (EMAS). San Juan de Pasto, 4 de febrero del 2004.

GARCÍA, J. Un químico para la historia: Louis Pasteur (1822-1895). En: Revista químicos del principado y Al – Químicos. [en línea]. Marzo de 1999. [citado 6 noviembre 2002]. Disponible en Internet: URL : <<http://www.alquimicos.com/quimprin /38/pasteur.html>>

CRUEGER, Wulf y CRUEGER, Anneliese. Biotecnología: Manual de microbiología industrial. Zaragoza, España : Acribia, 1993. p. 70-116.

GUZMÁN HUERTA, Gastón. Identificación de los hongos: comestibles, venenosos, alucinantes y destructores de la madera. México : Ed. Limusa, 1977. 321 p.

HAEHN, Hugo. Bioquímica de las fermentaciones. Madrid, España : Aguilar, 1956. 286 p.

HERNANDEZ, E. Producción de proteína a partir de petróleo. [en línea]. [Maracaibo, Venezuela]. Universidad Zulia Maracaibo. [citado 23 mayo 2002].

Disponible en Internet: URL: <http://www.redpav-fpolar.info.ve/fagroluz/v02_3/v023z003.html - 84k>

HOOG, G. y GUARRO, J. Atlas of clinical fungi. [online]. 1995. [citado 15 agosto del 2003]. Available from internet: URL: <<http://www.mycology.adelaide.edu.au>>

LAREDO, M. y CUESTA, A. Técnicas para evaluación de forrajes y análisis de minerales en tejido vegetal y animal. Pasto, 1985, 71 p. Universidad de Nariño.

LUQUE, E. Prácticas de Bioquímica. Pasto, 1990, 211 p. Universidad de Nariño.

MARTINES, J. y GARCES, N. Procedimiento para la obtención de un preparado enzimático, el medio de cultivo y el producto resultante. [en línea]. 1985. [citado 20 enero 2004]. Disponible en Internet: URL: <<http://www.ocpi.cu/doc/1985/t35695.pdf>>

MATEOS GONZÁLES, P. Generalidades y desarrollo histórico de la microbiología. [en línea]. [Salamanca, España]. Universidad de Salamanca. [citado 16 octubre 2002]. Disponible en Internet: URL: <<http://edicion-micro.usal.es/web/SEFIN/MI/tema01MI.html>>

_____. Nutrición microbiana. [en línea]. [citado 26 septiembre 2002]. Disponible en Internet: URL: <<http://www.geocities.com/CollegePark/Lab/2960/Mic4.htm> - 11k.>

_____. Tipos de fermentadores. [en línea]. [Citado 26 septiembre 2002]. Disponible en Internet: URL: <<http://www.nostoc.usal.es/sefin/MI/tema12MI.html>>

MEDINA, V. y HERNÁNDEZ, C. Estudio preliminar sobre obtención de biomasa a partir de los desechos de la naranja. En: Para sacarle mas jugo a la naranja. Citado por ARIAS L. [en línea]. Colombia. 2001. [citado 23 oct., 2002]. Disponible en Internet: URL: <<http://www.dnic.unal.edu.co/unperiodico/abril2001/textos/ciencia.htm>>

MERCK, E. Manual de medios de cultivo. Alemania : E Merck, 1994. 382 p.

MERTZ, Edwin. Bioquímica. México, Buenos Aires : entro regional de ayuda técnica, agencia para el desarrollo internacional, 1971. 325 p.

PEARSON, David. Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos. Zaragoza, España, 1986. 331 p.

RODRÍGUEZ, J. *et al.* Procedimiento para la fermentación en estado sólido de residuo cítrico. [en línea]. [Cuba]. [citado 20 enero 2004]. Disponible en Internet: URL: <<http://www.ocpi.cu/doc/1986/t36136.PDF>>

TREVAN, M. *et al.* Biotecnología: Principios Biológicos. Zaragoza, España : Acribia, 1990. 214 p.

WAINWRIGHT, M. Introducción a la biotecnología de los hongos. Zaragoza, España : Acribia, 1995. 228 p.

WALTER, J. y GINGOLD, E. Biología molecular y biotecnología. Zaragoza, España : Acribia, 1997. 475 p.

WARD, Owen. Biotecnología de la fermentación: principios, procesos y productos. Zaragoza, España : Acribia, 1991. 413 p.

WISEMAN, Alan. Principios de Biotecnología. Zaragoza, España : Acribia, 1986. 444 p.

ANEXOS

Anexo A. Análisis estadístico de la producción de bioproteína

CUADRO ORDENADO DE DATOS

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13
	1.37	0.50	0.40	0.10	0.30	4.60	5.50	5.80	4.72	4.61	5.19	5.58	4.98
	1.52	0.60	0.60	0.10	0.10	4.50	5.53	5.52	4.48	4.72	4.80	5.95	5.01
	1.70	0.40	0.32	0.10	0.20	4.43	5.40	5.75	4.63	4.32	6.35	5.75	5.10
Σ	4.59	1.50	1.32	0.30	0.60	13.53	16.23	17.07	13.83	13.65	17.34	17.55	15.09
X	1.53	0.50	0.44	0.10	0.20	4.51	5.41	5.69	4.61	4.55	5.78	5.85	5.03

T1 = Residuos sólidos más *A. niger*

T2 = Residuos sólidos más *A. niger* más Urea al 0.5%

T3 = Residuos sólidos más *A. niger* más Urea al 1.0%

T4 = Residuos sólidos más *A. niger* más Urea al 2.0%

T5 = Residuos sólidos más *A. niger* más Urea al 3.0%

T6 = Residuos sólidos más *A. niger* más Nitrato de potasio al 0.5%

T7 = Residuos sólidos más *A. niger* más Nitrato de potasio al 1.0%

T8 = Residuos sólidos más *A. niger* más Nitrato de potasio al 2.0%

T9 = Residuos sólidos más *A. niger* más Nitrato de potasio al 3.0%

T10 = Residuos sólidos más *A. niger* más Nitrato de amonio al 0.5%

T11 = Residuos sólidos más *A. niger* más Nitrato de amonio al 1.0%

T12 = Residuos sólidos más *A. niger* más Nitrato de amonio al 2.0%

T13 = Residuos sólidos más *A. niger* más Nitrato de amonio al 3.0%

Numero de replicaciones: 3

Unidades experimentales: 39

Variables a evaluar: Producción de bioproteína (Porcentaje).

ANÁLISIS DE VARIANZA

Andeva diseño DIA

Factor Variable	Grados Libertad	Suma Cuadrados	Cuadrado Medio	Frecuencia calculada	Frecuencia tabulada	
Tratamientos	12	208.27	23.35	598.71 *	2.15	95%
Error	26	1.03	0.039			
Total	38	209.30				

* : diferencia significativa

PRUEBA DE TUKEY

Cuadro de doble entrada

	T4	T5	T3	T2	T1	T6	T10	T9	T13	T7	T8	T11	T12
T1					4,32 *	1,34N S		1,24N S	0,82N S	0,44N S	0,16N S	0,07N S	
2	5,75*	5,65*	5,41*	5,35*			1,3NS						0
T11	5,68*	5,58*	5,34*	5,28*	4,25 *	1,27N S	1,23N S	1,17N S	0,75N S	0,37N S	0,09N S		
T8	5,59*	5,49*	5,25*	5,19*	4,16 *	1,18N S	1,14N S	1,08N S	0,66N S	0,28N S		0	
T7	5,31*	5,21*	4,97*	4,91*	3,88 *	0,9NS	0,86N S	0,8NS	0,38N S		0		
T13	4,93*	4,83*	4,59*	4,53*	3,5*	0,52N S	0,48N S	0,42N S		0			
T9	4,51*	4,41*	4,17*	4,11*	3,08 *	0,1NS	0,06N S		0				
T10	4,45*	4,35*	4,11*	4,05*	3,02 *	0,04N S		0					
T6	4,41*	4,31*	4,07*	4,01*	2,98 *		0						
T1	1,43N S	1,33N S	1,09N S	1,03N S		0							
T2	0,4NS	0,3NS	0,06N S		0								
T3	0,34N S	0,24N S		0									
T5	0,1NS		0										
T4		0											

Comparador Tukey 5% = 1.47

* : Diferencia significativa

NS: Diferencia no significativa

Ho: T4 = T5 = T3 = T2

Ho: T6 = T10 = T9 = T13 = T7 = T8 = T11 = T12

Anexo B. Análisis estadístico del contenido de materia orgánica después de la fermentación

CUADRO ORDENADO DE DATOS

T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	
92.85	94.449	92.65	91.73	92.58	89.94	91.75	83.36	80.22	93.12	93.64	92.84	97.55	
92.80	91.35	83.71	95.49	97.42	89.90	92.32	83.65	85.80	90.47	93.68	92.40	97.10	
92.27	89.86	88.87	91.24	97.10	91.75	92.89	83.70	90.12	92.35	93.78	93.10	98.63	
S	277.92	275.70	265.23	278.46	288.10	271.59	276.96	250.71	256.14	275.94	281.10	278.34	293.28
X	92.64	91.90	88.41	92.82	95.70	90.53	92.32	83.57	85.38	91.98	93.70	92.78	97.76

Numero de replicaciones: 3

Unidades experimentales: 39

Variables a evaluar: Contenido de materia orgánica (Porcentaje).

ANÁLISIS DE VARIANZA

Andeva diseño DIA

FV	Grados Libertad	Suma Cuadrados	Cuadrado Medio	Frecuencia calculada	Frecuencia tabulada
Tratamientos	12	534.71	44.56	8.61 *	2.15 95%
Error	26	134.56	5.17		
Total	38	669.27			

* : diferencia significativa

PRUEBA DE TUKEY

Cuadro de doble entrada

	T8	T9	T3	T6	T2	T10	T7	T1	T12	T4	T11	T5	T13
T13	14,19*	12,38*	9,35*	7,23*	5,86 NS	5,78 NS	5,44 NS	5,12 NS	4,98 NS	4,94 NS	4,06 NS	2,06 NS	0
T5	12,13*	10,32*	7,29*	5,17 NS	3,8 NS	3,72 NS	3,38 NS	3,06 NS	2,92 NS	2,88 NS	2 NS	0	
T11	10,13*	8,32*	5,29 NS	3,17 NS	1,8 NS	1,72 NS	1,38 NS	1,06 NS	0,92 NS	0,88 NS	0		
T4	9,25*	7,44*	4,41 NS	2,29 NS	0,92 NS	0,84 NS	0,5 NS	0,18 NS	0,04 NS	0			
T12	9,21*	7,4*	4,37 NS	2,25 NS	0,88 NS	0,8 NS	0,46 NS	0,14 NS	0				
T1	9,07*	7,26*	4,23 NS	2,11 NS	0,74 NS	0,66 NS	0,32 NS	0					
T7	8,75*	6,94*	3,91 NS	1,79 NS	0,42 NS	0,34 NS	0						
T10	8,41*	6,6 NS	3,57 NS	1,45 NS	0,08 NS	0							
T2	8,33*	6,52 NS	3,49 NS	1,37 NS	0								
T6	6,96*	5,15 NS	2,12 NS	0									
T3	4,84 NS	3,03 NS	0										
T9	1,81 NS	0											
T8	0												

Comparador Tukey 5% = 6.74

* : Diferencia significativa

NS: Diferencia no significativa

Ho: T8 = T9 = T3 = T6 = T2 = T10 = T7 = T1 = T12 = T4 = T11 = T5 = T13

Anexo C. Análisis estadístico del contenido de grasas después de la fermentación

CUADRO ORDENADO DE DATOS

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13
	2,74	1,58	2,12	2,38	2,14	1,32	2,03	3,55	3,46	1,87	2,31	2,10	4,25
	3,45	1,42	2,44	2,62	2,57	1,84	2,16	3,45	3,71	1,28	2,44	2,20	3,84
	2,78	1,89	3,21	2,44	2,58	2,03	1,96	3,62	3,45	1,56	2,90	2,06	4,45
S	8,97	4,89	7,77	7,44	7,29	5,19	6,15	10,62	10,62	4,71	7,65	6,36	12,54
X	2,99	1,63	2,59	2,48	2,43	1,73	2,05	3,54	3,54	1,57	2,55	2,12	4,18

Numero de replicaciones: 3

Unidades experimentales: 39

Variables a evaluar: Contenido de grasa (Porcentaje).

ANÁLISIS DE VARIANZA

Andeva diseño DIA

FV	Grados Libertad	Suma Cuadrados	Cuadrado Medio	Frecuencia calculada	Frecuencia tabulada	
Tratamientos	12	23.50	1.96	8.16 *	2.15	95%
Error	26	6.47	0.24			
Total	38	29.97				

* : diferencia significativa

PRUEBA DE TUKEY

Cuadro de doble entrada

	T10	T2	T6	T7	T12	T5	T4	T11	T3	T1	T8	T9	T13
T13	2,61*	2,55*	2,45*	2,13*	2,06*	1,75*	1,7*	1,63*	1,59*	1,19 NS	0,64 NS	0,64	0
T9	1,97*	1,91*	1,81*	1,49*	1,42 NS	1,11 NS	1,06 NS	0,99 NS	0,95 NS	0,55 NS	0 NS	0	
T8	1,97*	1,91*	1,81*	1,49*	1,42 NS	1,11 NS	1,06 NS	0,99 NS	0,95 NS	0,55 NS	0		
T1	1,42 NS	1,36 NS	1,26 NS	0,94 NS	0,87 NS	0,56 NS	0,51 NS	0,44 NS	0,4 NS	0			
T3	1,02 NS	0,96 NS	0,86 NS	0,54 NS	0,47 NS	0,16 NS	0,11 NS	0,04 NS	0				
T11	0,98 NS	0,92 NS	0,82 NS	0,5 NS	0,43 NS	0,12 NS	0,07 NS	0					
T4	0,91 NS	0,85 NS	0,75 NS	0,43 NS	0,36 NS	0,05 NS	0						
T5	0,86 NS	0,8 NS	0,7 NS	0,38 NS	0,31 NS	0							
T12	0,55 NS	0,49 NS	0,39 NS	0,07 NS	0								
T7	0,48 NS	0,42 NS	0,32 NS	0									
T6	0,16 NS	0,1 NS	0										
T2	0,06 NS	0											
T10	0												

Comparador Tukey 5% = 1.45

* : Diferencia significativa

NS: Diferencia no significativa

Ho: T10 = T2 = T6 = T7 = T12 = T5 = T4 = T11 = T3 = T1 = T8 = T9 = T13

Anexo. D. Análisis estadístico del contenido de carbohidratos después de la fermentación

CUADRO ORDENADO DE DATOS

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13
	1,85	0,63	1,94	2,18	0,54	5,11	5,03	4,28	3,25	4,22	2,65	3,25	3,69
	1,88	0,58	2,11	2,31	0,88	6,22	4,40	4,51	2,13	5,31	2,67	4,26	4,12
	2,03	0,47	1,89	3,04	0,56	4,58	4,61	4,05	3,84	3,10	2,23	2,84	5,30
S	5,76	1,68	5,94	7,53	1,98	15,91	14,04	12,84	9,22	12,63	7,55	10,35	13,11
X	1,92	0,56	1,98	2,51	0,66	5,30	4,68	4,28	3,07	4,21	2,52	3,45	4,37

Numero de replicaciones: 3

Unidades experimentales: 39

Variables a evaluar: Contenido de carbohidratos (Porcentaje).

ANÁLISIS DE VARIANZA

Andeva diseño DIA

FV	Grados Libertad	Suma Cuadrados	Cuadrado Medio	Frecuencia calculada	Frecuencia tabulada
Tratamientos	12	82.09	6.84	10.85 *	2.15 95%
Error	26	16.39	0.63		
Total	38	98.48			

* : diferencia significativa

PRUEBA DE TUKEY

Cuadro de doble entrada

	T2	T5	T1	T3	T4	T11	T9	T12	T10	T8	T13	T7	T6
T6	4,74*	4,64*	3,38*	3,32*	2,79*	2,78*	2,23 NS	1,85 NS	1,09 NS	1,02 NS	0,93 NS	0,62 NS	0
T7	4,12*	4,02*	2,76*	2,7*	2,17 NS	2,16 NS	1,61 NS	1,23 NS	0,47 NS	0,4 NS	0,31 NS	0	
T13	3,81*	3,71*	2,45*	2,39*	1,86 NS	1,85 NS	1,3 NS	0,92 NS	0,16 NS	0,09 NS	0		
T8	3,72*	3,62*	2,36*	2,30 NS	1,77 NS	1,76 NS	1,21 NS	0,83 NS	0,07 NS	0			
T10	3,65*	3,55*	2,29 NS	2,23 NS	1,7 NS	1,69 NS	1,14 NS	0,76 NS	0				
T12	2,89*	2,79*	1,53 NS	1,47 NS	0,94 NS	0,93 NS	0,38 NS	0					
T9	2,51*	2,41*	1,15 NS	1,09 NS	0,56 NS	0,55 NS	0						
T11	1,96 NS	1,86 NS	0,6 NS	0,54 NS	0,01 NS	0							
T4	1,95 NS	1,85 NS	0,59 NS	0,53 NS	0								
T3	1,42 NS	1,32 NS	0,06 NS	0									
T1	1,36 NS	1,26 NS	0										
T5	0,1 NS	0											
T2	0												

Comparador Tukey 5% = 2.35

* : Diferencia significativa

NS: Diferencia no significativa.

Ho: T2 = T5 = T1 = T3 = T4 = T11 = T9 = T12 = T10 = T8 = T13 = T7 = T6