



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**IDENTIFICACIÓN DE PRODUCTOS Y SUBPRODUCTOS
PROCEDENTES DE LA FERMENTACIÓN ESPONTÁNEA DE
DESPERDICIOS AGRÍCOLAS LOCALIZADOS EN LA CIUDAD
DE TENA-ECUADOR**

Proyecto de investigación previo a la obtención del título de:
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: SEBASTIÁN MATEO VALENCIA RAMOS
TUTOR: Dr. ROLDÁN TORRES GUTIÉRREZ

Napo-Ecuador

2023

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Tena, 5 de junio de 2023

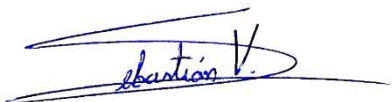
De mi consideración:

Yo, Sebastián Mateo Valencia Ramos con documento de identidad N° 1753001427, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología, son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Por la favorable atención a la presente, suscribo de usted,

Atentamente,



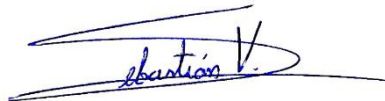
Sebastián Mateo Valencia Ramos
C.I: 1753001427

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, Sebastián Mateo Valencia Ramos, con documento de identidad N° 1753001427 en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: "Identificación de productos y subproductos procedentes de la fermentación espontánea de desperdicios agrícolas localizados en la ciudad de Tena-Ecuador" de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo autorizo a la Universidad Regional Amazónica Ikiam para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Tena, 5 de junio del 2023



Sebastián Mateo Valencia Ramos
C.I: 1753001427

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación: “Identificación de productos y subproductos procedentes de la fermentación espontánea de desperdicios agrícolas localizados en la ciudad de Tena-Ecuador” en la modalidad de: artículo, fue realizado por Sebastián Mateo Valencia Ramos, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.

Tena, 5 de junio de 2023



Dr. Roldán Torres Gutiérrez
C.I: 0151345121

DEDICATORIA

A mis maestros que formaron parte de mi vida estudiantil y que aportaron con sus conocimientos para poder cumplir una etapa de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A La Universidad Regional Amazónica Ikiam por brindarme la oportunidad de estudiar y formarme académicamente. A los comerciantes del mercado central de Tena, quienes amablemente me brindaron su colaboración y apoyo durante el proceso de investigación.

A mi tutor, Roldan Torres, quien me transmitió sus conocimientos y experiencias, siendo una guía para alcanzar mis metas y objetivos de manera efectiva. Asimismo, quiero agradecer a las técnicas de laboratorio Evelyn Oña y Carolina Castro, quienes me brindaron su conocimiento y experiencia en las técnicas de laboratorio necesarias para la investigación.

A mi querida familia, especialmente a mi madre, padre y hermano, agradezco por su amor, apoyo y paciencia durante todo mi proceso de estudios. Por último, agradezco a mis amigos y amigas, quienes me brindaron su compañía y ánimo en todo momento.

TABLA DE CONTENIDOS

CARÁTULA	
DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD	ii
CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN.....	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS.....	v
INDICE DE TABLAS.....	vii
INDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
METODOLOGÍA.....	2
Diagnóstico, recolección y procesamiento de biomasa residual	2
Fermentación en estado sólido.....	3
Análisis microbiológico de los fermentos	3
Cultivos axénicos de colonias y caracterización de los aislados	4
Análisis de compuesto volátiles por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).....	5
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	5
Diagnóstico, muestreo y fermentación de biomasa residual.....	5
Microorganismos involucrados en la fermentación.....	7
Identificación de compuestos volátiles.....	8
CONCLUSIÓN	9
REFERENCIAS	10
ANEXOS	18

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Microrganismos procedentes de residuos orgánicos...	12
Tabla 2.	Compuestos volátiles procedentes de la fermentación....	15

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Se describe el método de diluciones decimales y siembra en placas Petri.....	15
Figura 2.	Muestra los resultados de las encuestas a realizadas a comerciantes.	16
Figura 3.	Promedio de unidades formadoras de colonia por ml.....	17

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A:	Antecedentes de la investigación
Anexo B:	Colonias identificadas en el fermento
Anexo C:	Espectros de las moléculas obtenidas por GC-MS

RESUMEN

El proceso de fermentación es una opción para el aprovechamiento y manejo ambiental de residuos generados por la comercialización de productos agrícolas y puede ser utilizado para la producción de polímeros estructurales y compuestos bioactivos. Los residuos orgánicos específicamente los desperdicios agrícolas y forestales tienen el potencial de ser materias primas para la creación de biocombustibles de tercera generación, además de ser utilizados para la creación de, biofertilizantes, biomateriales, biorremediadores, entre otros. Por ello los objetivos de esta investigación fueron (i) caracterizar el inóculo obtenido de residuos generados por la comercialización de productos agrícolas en la ciudad de Tena, (ii) identificar la morfología de los microorganismos presentes en el fermento e (iii) identificar los compuestos volátiles resultantes de la fermentación semi sólida del inóculo primario. Los resultados obtenidos demostraron que el 68% de locales encuestados desechan como promedio de 1 a 3 kg diarios de residuos, donde se encuentran cereales, raíces, tubérculos, plantas oleaginosas, frutas y verduras; de los cuales se obtuvo el inóculo para el proceso de fermentación. Las levaduras fueron el grupo microbiano predominante en el fermento con $2.6E+06$ CFU mL⁻¹. Los hongos aislados presentaron morfologías típicas de los géneros *Fusarium*, *Geotrichum*, *Acremonium* y *Scopulariopsis*. Para bacterias la morfología más frecuente fueron bacilos. En la fase líquida del fermento se identificaron 20 compuestos volátiles de los que se destacan ácido láctico, butiro lactona y 1,3-propanodiol. Estos resultados demuestran el potencial de las fermentaciones de residuos agrícolas en mercados locales para la obtención de compuestos de interés biotecnológico.

Palabras Claves: fermentación; residuos; aislados microbianos; HS-GC-IMS; compuestos volátiles; bioproductos.

ABSTRACT

The fermentation process is an option for the utilization and environmental management of residues generated by the commercialization of agricultural products and can be used for the production of structural polymers and bioactive compounds. Organic residues, specifically agricultural and forestry wastes, have the potential to be raw materials for the creation of third generation biofuels, in addition to being used for the creation of biofertilizers, biomaterials, and bioremediators, among others. Therefore, the objectives of this research were (i) to characterize the inoculum obtained from residues generated by the commercialization of agricultural products in the city of Tena, (ii) to identify the morphology of the microorganisms present in the ferment and (iii) to identify the volatile compounds resulting from the semi-solid fermentation of the primary inoculum. The results obtained showed that 68% of the premises surveyed discard 1 to 3 kg of waste per day, including cereals, roots, tubers, oilseed plants, fruits and vegetables, from which the inoculum for the fermentation process was obtained. Yeasts were the predominant microbial group in the ferment with $2.6E+06$ CFU mL⁻¹. The isolated fungi presented morphologies typical of the genera *Fusarium*, *Geotrichum*, *Acremonium* and *Scopulariopsis*. For bacteria, the most frequent morphology was bacilli. In the liquid phase of the ferment, 20 volatile compounds were identified, including lactic acid, butyrolactone and 1,3-propanediol. These results demonstrate the potential of fermentations of agricultural residues in local markets for obtaining compounds of biotechnological interest.

Keywords: fermentation; waste; microbial isolation; fungi; yeast; HS-GC-IMS; volatile compounds; agro-industry; bioproducts; bioproducts

INTRODUCCIÓN

El aumento de la población mundial conlleva un incremento en los volúmenes de biomasa residual generada por las industrias forestales, agrícolas, agroindustriales y alimentarias^[1]. Aunque esta biomasa residual de tipo vegetal no tiene utilidad inmediata^[2], puede ser utilizada como materia prima para la producción de polímeros estructurales y compuestos bioactivos. Su aprovechamiento representa una gran oportunidad para generar productos de valor agregado y reducir el impacto ambiental^[3].

La transformación de la biomasa residual en productos de valor agregado puede lograrse mediante diferentes procesos biológicos que involucran la liberación y fermentación de azúcares para la producción de solventes verdes, pinturas, desengrasantes, agentes de limpieza, pesticidas, fertilizantes, lubricantes, grasas, resinas, aditivos, enzimas y biocombustibles^[4, 5]. Estos productos pueden ser utilizados en diversos sectores industriales, como la construcción, la agricultura y la alimentación, lo que representa una gran oportunidad para el desarrollo económico y social.

La fermentación en estado sólido (SSF, por sus siglas en inglés) es un proceso biológico en el que se cultivan bacterias y hongos, los cuales transforman los nutrientes del sustrato, como los carbohidratos, proteínas y grasas, en productos químicos útiles^[5]. La SSF se considera una herramienta adecuada para transformar desechos y subproductos agroindustriales en productos de valor agregado, además de ayudar en la eliminación de residuos evitando la quema y sus consiguientes efectos negativos sobre el medio ambiente. A la vez, representa costos bajos o nulos en la gestión de residuos sólidos^[6]. La producción de productos fermentados y el manejo adecuado de estos residuos, también puede ser una fuente importante de empleo y oportunidades económicas para las comunidades locales^[7].

En Ecuador la elaboración de nuevos productos a partir de desechos agrícolas está en desarrollo. Como ejemplo, en el cantón Bolívar se aislaron 31 hongos y 18 bacterias con capacidad enzimática de hidrólisis carboximetilcelulosa. Estos microorganismos fueron aislados del compostaje de residuos agropecuarios con fines de producción de abonos orgánicos con alto valor comercial^[8].

Además de productos enzimáticos extracelulares con actividad xilanolítica, el cual posee un gran valor comercial. Estas enzimas están relacionadas a hongos endófitos. Los investigadores Jhon V. Cruz-Davila , Jeffrey Vargas, Nardy Diez, determinaron que hongos endófitos procedentes de *Theobroma cacao* pueden ser una fuente de actividades xilanolíticas cuando se cultivan en presencia de salvado de trigo como única fuente de carbono^[9].

Teniendo en cuenta su utilidad, el aprovechamiento de la biomasa residual mediante la fermentación en estado sólido se presenta como una alternativa rentable para la gestión y eliminación de residuos, además de una oportunidad para el desarrollo económico y social. Es por ello que, el objetivo de este estudio fue caracterizar las comunidades microbianas presentes en los fermentos de productos agrícolas de establecimientos comerciales de la ciudad de Tena, ubicada en la Provincia de Napo, Ecuador; así como identificar tentativamente los compuestos volátiles de interés comercial generados en la fermentación de la biomasa residual de los productos y subproductos colectados.

Esta investigación se llevó a cabo con el propósito de caracterizar el inóculo obtenido de residuos generados por la comercialización de productos agrícolas en la ciudad de Tena, identificar la morfología de los microorganismos presentes en el fermento e identificar los compuestos volátiles resultantes de la fermentación semi sólida del inóculo primario. El estudio realizado sienta las bases para determinar la importancia del uso de fermentos producidos de residuos agrícolas y la aplicación de procesos biotecnológicos para obtener compuestos de interés industrial y económico en comunidades locales de la región Amazónica ecuatoriana.

METODOLOGÍA

Diagnóstico, recolección y procesamiento de biomasa residual

Para el análisis de la biomasa residual de productos agrícolas procedentes de locales comerciales de la ciudad de Tena, se realizó un diagnóstico inicial mediante encuestas. De un total de 12 locales pertenecientes del mercado central, se tomaron muestras en ocho ellos para obtener el sustrato para el proceso de fermentación en estado sólido,

representando un 66.7% del total de los locales. Debido a la heterogeneidad de los residuos, las muestras se homogeneizaron para contar con muestras compuestas, las cuales constituyeron la materia prima para la fermentación en los biorreactores.

Fermentación en estado sólido

La fermentación del sustrato en estado sólido se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por Chilakamarry et al.^[5] modificada. Se dispuso de un diseño experimental completamente al azar con seis biorreactores, cada uno compuesta por 20 kg de residuos, los cuales se colocaron en biorreactores (baldes de plástico) de 20 L, previamente desinfectados (lavados con jabón, cloro (15%), alcohol absoluto (100%) y agua destilada estéril). Los biorreactores se sellaron con una tapa plástica también desinfectada que contenía un tapón de algodón y/o airlock para impedir la entrada de microorganismos exógenos y favorecer la salida de gases producidos durante la fermentación. Para garantizar las condiciones de humedad y facilitar la actividad microbiana, se añadió 20% v/v de agua estéril a cada biorreactor y se depositaron a la sombra en un lugar a temperatura ambiente. El proceso de fermentación finalizó dos semanas después del inicio (montaje del diseño experimental), teniendo en cuenta que todos los biorreactores dejaron de liberar gases.

Análisis microbiológico de los fermentos

Al finalizar el proceso de fermentación, al cabo de dos semanas de iniciada, se tomaron muestras de los fermentos para cuantificar las unidades formadoras de colonias (UFC) de los microorganismos totales presentes en los biorreactores. Las muestras se procesaron mediante el método de diluciones seriadas^[10] llegando hasta la dilución $1/10^{-6}$ (Figura 1).

Para bacterias, 1 ml de cada muestra se cultivó en placas Petri con medio MRS broth Difco™ y se incubaron a 30°C por tres días. Los hongos filamentosos se cultivaron en medio agar rosa bengala (ARB) Difco™, incubándose a 26°C durante tres días. Para la diferenciación de los hongos filamentosos y levaduras, se sembraron muestras de los fermentos en medio agar YPD (para levaduras), preparado con 5 % de peptona bacteriológica, 20% de agar bacteriológico, 5% de extracto de levadura y 10% de glucosa. Las placas Petri se incubaron a 26°C durante tres días. Se utilizaron concentraciones de nistatina a 100 µg ml⁻¹ para el cultivo de bacterias y ampicilina a 100 µg ml⁻¹ para los cultivos de hongos^[11]. Para determinar el crecimiento de cada

grupo microbiano en sus respectivos medios de cultivos se realizó un diseño experimental completamente al azar con 3 réplicas por cada uno.

Posterior al crecimiento de las colonias, se cuantificaron las UFC según la siguiente fórmula de Javeed et al.^[12]:

$$UFC = \frac{\sum N^{\circ} CpP}{\frac{N^{\circ}P}{V}} \times FD$$

Donde:

N°CpP: número de colonias por cada placa Petri.

N°P: número de placa Petri.

V: volumen inoculado en la placa Petri.

FD: factor de dilución.

El conteo se realizó siguiendo una cinética de crecimiento a las 24, 48 y 72 horas después de sembradas las muestras en los respectivos medios de cultivos.

Cultivos axénicos de colonias y caracterización de los aislados

De las colonias crecidas en los medios de cultivos se obtuvieron cultivos axénicos de bacterias, hongos filamentos y levaduras. Para ello se inocularon 1000 µl de la muestra de cada fermento en placas Petri con los medios de cultivos antes mencionados, los cuales se incubaron a sus respectivas temperaturas durante siete días. Cada cultivo se realizó por triplicado sembrando en placas Petri repetidamente siguiendo el método de siembra por estrías.

La caracterización morfológica de los aislados se realizó mediante observación de sus colonias, tanto macro como microscópicamente ^[12]. Para bacterias y levaduras se tuvo en cuenta el color, apariencia, crecimiento, bordes, elevación y tinción (tinción simple para levaduras y tinción Gram para bacterias); mientras que para hongos se analizó el tipo de micelio aéreo y sus hifas.

Análisis de compuesto volátiles por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

Al finalizar la fermentación se recolectaron muestras de 15 ml por cada biorreactor, las cuales fueron centrifugadas a 10000 rpm durante 10 min a 4°C y luego esterilizados a 95°C durante 15 min en Baño de María. Posteriormente las muestras se almacenaron a -20°C para el debido análisis de compuestos volátiles.

Las muestras se procesaron en un cromatógrafo de gases de la serie GC-2030 acoplada con un detector selectivo de masa de la serie GCMS-QP2020 NX. El procesamiento se realizó mediante la técnica HeadSpace, para lo cual de las muestras previamente esterilizadas se tomaron 3 ml y se depositaron en un vial de 20 ml de muestreo. Cada muestra se equilibró a 85°C durante 20 min, se inyectaron 500 µl con la jeringa calentada a 120°C ^[13], en una columna capilar Rtx-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm), utilizándose un caudal de 1 mL min⁻¹ de helio como gas portador. La temperatura del gas se mantuvo a 250°C con una entrada splitless, la temperatura del horno GC se mantuvo a 40°C durante 2 min, luego se elevó a 120 °C a una velocidad de 5°C min⁻¹ y finalmente se elevó a 250°C a una velocidad de 12°C min⁻¹ ^[14]. El detector MS con una temperatura de ion se fijó a 200°C. La identificación tentativa cualitativa de cada compuesto del fermento se llevó a cabo usando la base de datos NITS20, para lo cual se tomó como referencia los tiempos de retención de cada alcano en una muestra enriquecida con n-alcános.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diagnóstico, muestreo y fermentación de biomasa residual

Un total de 38 locales comerciales fueron identificados y encuestados en la ciudad de Tena. En ellos, el 69% de los comerciantes genera principalmente biomasa residual del grupo de frutas, mientras que el 31% restante genera biomasa residual conformado por el grupo de tubérculos y plantas oleaginosas (Figura 2-A). Estos resultados están relacionados con el tiempo de vida útil de las frutas, ya que los comerciantes manifiestan que las frutas son más propensas a desecharse en un corto tiempo, lo que se ve reflejado en que el 51,5% de los encuestados aseguran que la fruta se mantiene en

condiciones óptimas para su venta hasta máximo una semana, mientras que el 10,8% asegura ser menor a una semana (Figura 2-C).

La cantidad de biomasa residual generada por locales en el mercado central de la ciudad de Tena es copiosa. Nuestro diagnóstico arrojó que todos los locales comerciales generan desechos de frutas. De ellos, el 32,4% desechan más de 3 kg diarios y el resto (67,6%) desecha de 1 a 3 kg diarios (Figura 1-B). Para reducir las pérdidas y la cantidad de desechos, han dejado de adquirir ciertas frutas, reduciéndose la variedad y cantidad de frutas que pueden comerciar. Un aspecto importante y medular es que solo el 21,6% de los comerciantes utilizan la biomasa residual para el uso en huertos urbanos y/o alimento para animales de granja. El restante 78,38% deja que el servicio de recolección de basura de la ciudad se encargue de los residuos.

Según el Consejo Nacional de Competencias del Ecuador, en su informe del 2019, menciona que en la Región Amazónica se generan 39,2 t de residuos orgánicos y 85,7 t son residuos inorgánicos ^[15]. En 2020, Solíz et al. ^[16] reporta que los desechos orgánicos del Ecuador están compuestos por residuos que son putrescibles u orgánicos, siendo estos de alimentos domiciliarios, cortezas de frutas, desechos de comidas y de jardinería. Según este autor, en la Amazonía el 55% de los residuos sólidos generados son orgánicos. Los resultados obtenidos (Figura 2) sugieren que la fuente de biomasa residual de origen vegetal para su uso en la fermentación debe ser obtenida directamente de fruterías, antes que sean mezcladas con desperdicios domiciliarios, sobras de comida y residuos no orgánicos.

Para la toma de muestra de la biomasa residual de origen vegetal producida en 24 horas en el mercado central de Tena, se mezclaron 53,1 kg de desechos, correspondiente a ocho locales comerciales. En los desechos se identificaron lechugas (*Lactuca sativa*), hojas y hueso de choclo (*Zea mays*), apio (*Apium graveolens*), cebolla (*Allium cepa*), tallos de brócoli/coliflor (*Brassica oleracea*), papas (*Solanum tuberosum*), hojas de cebolla (*Allium fistulosum*), uvas (*Vitis vinífera*), fresas (*Fragaria × ananassa*), naranjas (*Citrus × sinensis*), mandarinas (*Citrus reticulata*), sábila (*Aloe vera*), tomates (*Solanum lycopersicum*), papayas (*Carica papaya*), ají (*Capsicum frutescens*), pimiento (*Capsicum annum*) y cilantro (*Coriandrum sativum*).

Transcurridas las dos semanas de fermentación, se pudo observar el cambio de coloración y textura del material inicial. Respecto a los líquidos generados en el proceso,

aunque no se midió la cantidad de lixiviados del proceso de fermentación, se pudo constatar que el volumen no se incrementó en ninguna de los biorreactores objeto de la investigación.

Soliz et al. ^[16] señalan la necesidad de establecer políticas nacionales y locales de separación de residuos en la fuente para favorecer el reciclaje de base y el aprovechamiento de residuos orgánicos mediante procesos microbianos, tales como el compost, lombricultura, bocashi y los bioinsumos, con los beneficios de generar una importante fuente de abonos orgánicos para la restauración de los suelos. Como se ha hecho alusión, estos procesos microbianos de fermentación no solo pueden estar enfocados para su aplicación en la industria agropecuaria, sino también para la determinación de compuestos que puedan ser usados en la industria alimenticia, farmacéutica, química, entre otras.

Microorganismos involucrados en la fermentación

Los análisis microbiológicos demostraron la presencia de 17 aislados microbianos, entre hongos y bacterias, mediante observación morfológica. De los cuales seis levaduras, cinco hongos y seis bacterias (Tabla 1). Los hongos filamentosos presentaron características morfológicas pertenecientes a los géneros *Fusarium* sp., *Geotrichum* sp., *Acremonium* sp. y *Scopulariopsis* sp. En 2018, Bertonha ^[17] reportó que especies del género *Fusarium* tienen la capacidad de producir altas cantidades de enzimas como β -glucosidasa, y en menor medida enzimas como xilanasa y β -xilosidasa, lo que los convierte en fuentes potenciales de enzimas útiles para la degradación de biomasa residual de tipo vegetal, sugiriendo que este hongo es responsable de la pérdida de rigidez del sustrato.

En 2022, He et al. ^[18] identificaron una nueva especie de *Geotrichum* sp. con capacidad de absorción intracelular de metales pesados como Cu^{2+} , Zn^{2+} y Ni^{2+} , además de presentar una forma de identificar microorganismos con potencial en la biorremediación. La presencia de este género en nuestros resultados es de singular importancia, ya que los sustratos y los productos de la fermentación, pueden incidir en la remediación de ambientes contaminados con metales pesados y por consiguiente reducir sus trazas en pasivos ambientales que se crean en rellenos sanitarios o lugares donde los desechos son arrojados sin el adecuado manejo.

Mediante la cuantificación de los microorganismos, se determinó que las levaduras presentaron un mayor número de UFC ml⁻¹ de fermento en todos los biorreactores, con un promedio de 1.9E+07, un valor máximo de 3.0E+07 y un mínimo de 1.4E+07 (Figura 3). Las levaduras son grandes generadoras de nuevos compuestos, pueden generar bioetanol, pigmentos, enzimas y ácidos grasos [19], y su crecimiento poblacional en los biorreactores evidencia que el sustrato contiene nutrientes necesarios para su proliferación.

Identificación de compuestos volátiles

En el análisis de los compuestos volátiles del fermento se identificaron 20 compuestos, entre los cuales se destacan el ácido láctico y el ácido pentanoico (Tabla 2). Ambos compuestos se encontraron presentes en todos los biorreactores, por lo cual se convierten en los más recurrentes en los procesos de fermentación. Este resultado es concomitante a la caracterización de las bacterias aisladas, dentro de las cuales se determinaron bacilos potencialmente productores de ácido láctico, siendo las principales responsables del pH ácido final del fermento. El ácido láctico es un compuesto utilizado y comercializado para diversos fines, uno de ellos en la industria alimentaria, como regulador de acidez [20].

Los compuestos butirolactona y 1,3-propanediol están involucrados en la generación de otras sustancias químicas de interés comercial, especialmente el 1,3-propanediol, que es un compuesto utilizado en la industria alimentaria para una amplia gama de propósitos y algunas bacterias como *Lactobacillus*, tienen la capacidad de producir este compuesto [21]. Estos compuestos tienen el potencial de ser una fuente de nuevos trabajos en su producción y comercialización. Sin embargo, debido a la presencia de varios tipos de microorganismos, se requieren más estudios para identificar la procedencia exacta de los compuestos. Además, se necesitan estudios sobre el rendimiento y el método de extracción para determinar su rentabilidad.

CONCLUSIÓN

Existe una alta generación de biomasa residual en los locales del mercado central de la ciudad de Tena, determinándose que el 67.6% pertenecen a desechos producidos de frutas.

El sustrato creado a partir de la biomasa residual tiene potencial para el cultivo de microorganismos, tales como *Fusarium* sp., *Geotrichum* sp., bacterias ácido lácticas (BAL) y levaduras.

Los productos obtenidos a través de la fermentación de la biomasa residual tienen potencial para la obtención de productos de interés comercial, tales como el ácido láctico, butirólactona y 1,3-propanodiol. Sin embargo, se necesitan estudios futuros para evaluar su rendimiento y rentabilidad a escala comercial.

REFERENCIAS

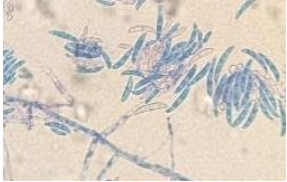
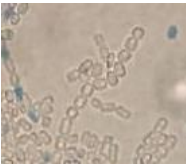
- [1] Voogt, J.; Humblet-Hua, N.-P.; Geerdink, P.; Beelen, B.; Mulder, W.; Safi, C. Valorisation of Multiple Components from Residual Biomass for Food and Biofuel Applications: A Virtual Biorefinery Evaluation. *Food and Bioproducts Processing*, **2023**, 139, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2023.02.002>.
- [2] Orejuela-Escobar, L. M.; Landázuri, A. C.; Goodell, B. Second Generation Biorefining in Ecuador: Circular Bioeconomy, Zero Waste Technology, Environment and Sustainable Development: The Nexus. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, **2021**, 6 (2), 83–107. <https://doi.org/10.1016/J.JOBAB.2021.01.004>.
- [3] de Medeiros, T. D. M.; Dufossé, L.; Bicas, J. L. Lignocellulosic Substrates as Starting Materials for the Production of Bioactive Biopigments. *Food Chem X*, **2022**, 13, 100223. <https://doi.org/10.1016/J.FOCHX.2022.100223>.
- [4] Hiloidhari, M.; Bhuyan, N.; Gogoi, N.; Seth, D.; Garg, A.; Singh, A.; Prasad, S.; Kataki, R. Agroindustry Wastes: Biofuels and Biomaterials Feedstocks for Sustainable Rural Development. *Refining Biomass Residues for Sustainable Energy and Bioproducts: Technology, Advances, Life Cycle Assessment, and Economics*, **2020**, 357–388. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818996-2.00016-8>.
- [5] Chilakamarry, C. R.; Mimi Sakinah, A. M.; Zularisam, A. W.; Sirohi, R.; Khilji, I. A.; Ahmad, N.; Pandey, A. Advances in Solid-State Fermentation for Bioconversion of Agricultural Wastes to Value-Added Products: Opportunities and Challenges. *Bioresour Technol*, **2022**, 343, 126065. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.126065>.
- [6] Leite, P.; Sousa, D.; Fernandes, H.; Ferreira, M.; Costa, A. R.; Filipe, D.; Gonçalves, M.; Peres, H.; Belo, I.; Salgado, J. M. Recent Advances in Production of Lignocellulolytic Enzymes by Solid-State Fermentation of Agro-Industrial Wastes. *Curr Opin Green Sustain Chem*, **2021**, 27, 100407. <https://doi.org/10.1016/J.COGSC.2020.100407>.
- [7] Yafetto, L. Application of Solid-State Fermentation by Microbial Biotechnology for Bioprocessing of Agro-Industrial Wastes from 1970 to 2020: A Review and Bibliometric Analysis. *Heliyon*, **2022**, 8 (3), e09173. <https://doi.org/10.1016/J.HELİYON.2022.E09173>.
- [8] Zambrano Pazmiño, D. E. Bioprospección de Cepas de Hongos y Bacterias Productoras de Enzimas Que Aceleren La Descomposición de Residuos Agropecuarios En El Compostaje. Tesis Postgrado, Universidad Técnica del Norte: Ibarra, 2021.
- [9] Cruz Dávila, J. Víctor. V. E. Bioprospección de Actividades Xilanolíticas a Partir de Hongos Endófitos Aislados de Theobroma Cacao, Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, 2022.
- [10] Ben-David, A.; Davidson, C. E. Estimation Method for Serial Dilution Experiments. *J Microbiol Methods*, **2014**, 107, 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.08.023>.
- [11] Clemente-Jimenez, J. M.; Mingorance-Cazorla, L.; Martínez-Rodríguez, S.; Las Heras-Vázquez, F. J.; Rodríguez-Vico, F. Molecular Characterization and Oenological Properties of Wine Yeasts Isolated during Spontaneous Fermentation of Six Varieties of Grape Must. *Food Microbiol*, **2004**, 21 (2), 149–155. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00063-7](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00063-7).
- [12] Tantray, J. A.; Mansoor, S.; Wani, R. F. C.; Nissa, N. U. Pour Plate Method for Bacterial Colony Counting. *Basic Life Science Methods*, **2023**, 177–179. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-19174-9.00039-8>.
- [13] Wang, Z.; Mi, S.; Wang, X.; Mao, K.; Liu, Y.; Gao, J.; Sang, Y. Characterization and

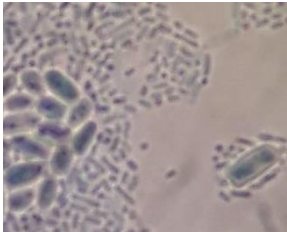
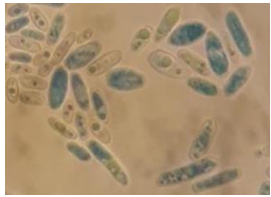
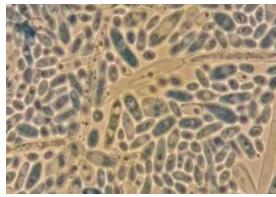
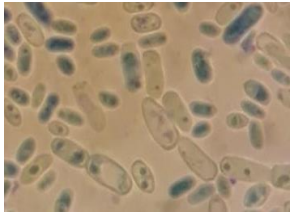
Discrimination of Fermented Sweet Melon Juice by Different Microbial Strains via GC-IMS-Based Volatile Profiling and Chemometrics. *Food Science and Human Wellness*, **2023**, 12 (4), 1241–1247. <https://doi.org/10.1016/J.FSHW.2022.10.006>.

- [14] Li, Y.; Yuan, L.; Liu, H.; Liu, H.; Zhou, Y.; Li, M.; Gao, R. Analysis of the Changes of Volatile Flavor Compounds in a Traditional Chinese Shrimp Paste during Fermentation Based on Electronic Nose, SPME-GC-MS and HS-GC-IMS. *Food Science and Human Wellness*, **2023**, 12 (1), 173–182. <https://doi.org/10.1016/J.FSHW.2022.07.035>.
- [15] Consejo Nacional de Competencias (CNC). *INFORME SOBRE MAPEO DE ACTORES GENERADORES DE INFORMACIÓN A NIVEL TERRITORIAL E IDENTIFICACIÓN DE FUENTES DE INFORMACIÓN DE LA COMPETENCIA DE DESECHOS SÓLIDOS.*, 1ra ed.; Maria Lorena Santillán, Ed.; Quito , 2019; Vol. 1.
- [16] Soliz Torres, M. F.; Durango Cordero, J. S.; Solano Peláez, J. L.; Yépez Fuentes, M. A. *Cartografía de Los Residuos Sólidos En Ecuador, 2020*; Quito, EC: Universidad Andina Simón Bolívar, Sede Ecuador/INEC/VLIR-UOS/GAIA ..., 2020.
- [17] Bertonha, L. C.; Leal Neto, M.; Garcia, J. A. A.; Vieira, T. F.; Castoldi, R.; Bracht, A.; Peralta, R. M. Screening of Fusarium Sp. for Xylan and Cellulose Hydrolyzing Enzymes and Perspectives for the Saccharification of Delignified Sugarcane Bagasse. *Biocatal Agric Biotechnol*, **2018**, 16, 385–389. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2018.09.010>.
- [18] He, M.; Xu, Y.; Qiao, Y.; Zhang, Z.; Liang, J.; Peng, Y.; Liao, J.; Shang, C.; Guo, Z.; Chen, S. A Novel Yeast Strain Geotrichum Sp. CS-67 Capable of Accumulating Heavy Metal Ions. *Ecotoxicol Environ Saf*, **2022**, 236, 113497. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2022.113497>.
- [19] Gottardi, D.; Siroli, L.; Vannini, L.; Patrignani, F.; Lanciotti, R. Recovery and Valorization of Agri-Food Wastes and by-Products Using the Non-Conventional Yeast *Yarrowia Lipolytica*. *Trends Food Sci Technol*, **2021**, 115, 74–86. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.06.025>.
- [20] Woraprayote, W.; Janyaphisan, T.; Adunphatcharaphon, S.; Sonhom, N.; Showpanish, K.; Rumjuankiat, K.; Visessanguan, W.; Elliott, C. T.; Petchkongkaew, A. Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria from Thai Fermented Foods: Potential Food Applications. *Food Biosci*, **2023**, 52, 102385. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2023.102385>.
- [21] Mota, M. J.; Lopes, R. P.; Sousa, S.; Gomes, A. M.; Delgadillo, I.; Saraiva, J. A. Lactobacillus Reuteri Growth and Fermentation under High Pressure towards the Production of 1, 3-Propanediol. *Food Research International*, **2018**, 113, 424–432.
- [22] Govil, T.; Wang, J.; Samanta, D.; David, A.; Tripathi, A.; Rauniyar, S.; Salem, D. R.; Sani, R. K. Lignocellulosic Feedstock: A Review of a Sustainable Platform for Cleaner Production of Nature's Plastics. *J Clean Prod*, **2020**, 270, 122521. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2020.122521>.
- [23] Karagoz, P.; Bill, R. M.; Ozkan, M. Lignocellulosic Ethanol Production: Evaluation of New Approaches, Cell Immobilization and Reactor Configurations. *Renew Energy*, **2019**, 143, 741–752. <https://doi.org/10.1016/J.RENENE.2019.05.045>.
- [24] Kucharska, K.; Rybarczyk, P.; Hołowacz, I.; Łukajtis, R.; Glinka, M.; Kamiński, M. Pretreatment of Lignocellulosic Materials as Substrates for Fermentation Processes. *Molecules*, **2018**, 23 (11). <https://doi.org/10.3390/molecules23112937>.

TITULOS DE FIGURAS

Tabla 1: Microorganismos procedentes de residuos orgánicos del mercado central de la ciudad de Tena. Se detallan las características morfológicas observadas.

Morfología presentada	Microscopia óptica
Crecimiento en agar Rosa de Bengala: Después de 7 días a 26 °C, Filiades septados Fermento: Aeróbico; Crecimiento: Circular; Textura: algodonosa; Color de la colonia: Blanco; Genero: <i>Fusarium sp.</i>	 A2H2-1-2 (Valencia,2023)
Crecimiento en agar Rosa de Bengala; después de 7 días a 26 °C, Conidióforos simples; Fermento: Aeróbico; Crecimiento: Circular; Textura: Algodonosa; Color: Blanco; Genero: <i>Acremonium sp.</i>	 A2H2-2-2 (Valencia,2023)
Crecimiento en agar Rosa Bengala; después de 7 días a 26 °C, Conidióforos múltiples; Fermento: Aeróbico; Crecimiento: Circular; Textura: Algodonosa; Color: Blanco; Género: <i>Scopulariopsis sp.</i>	 A2H2-2-4 (Valencia,2023)
Crecimiento en agar Rosa de Bengala; después de 7 días a 26 °C, Hifas septadas y separadas, células cuadradas; Fermento: Aeróbico; Tipo: Circular; Textura: Algodonosa; Color: Blanco; Genero: <i>Geotrichum sp.</i>	 A2H2-2-1 (Valencia,2023)
Crecimiento en agar YPD; después de 3 días a 26 °C, Células separadas y cuadradas, hifas sin septo; Fermento: Aeróbico; Crecimiento: Circular; Textura: Algodonosa; Color: blanco; Genero: <i>Geotrichum sp.</i>	 A2L2 -1B (Valencia,2023)
Crecimiento en agar Rosa Bengala; después de 3 días a 26 °C, las células son circulares; Fermento: Aeróbico; Crecimiento: Circular; Margen: Regular; Textura: Cremosa; Aspecto: Brillosa; Color: Amarillo; Grupo: Levaduras.	 A2L2-3 (Valencia,2023)

Crecimiento en agar YPD; después de 3 días a 26 °C, las células son ovoides y alargadas; Fermento: Anaeróbico y Aeróbico; Tipo: Circular; Textura: Cremosa; Color de la colonia: blanco -crema; Grupo: Levaduras.	 A3L1-D (Valencia,2023)
Crecimiento en agar YPD; después de 3 días a 26 °C, las células son ovoides y alargadas; Fermento: Aeróbico; Crecimiento: Circular concéntrico; Margen: Borde interno central; Textura: Ramificación interna central; Aspecto: Cremosa; Color: Blanco-Crema. Aeróbico; Grupo: Levaduras.	 A2L2-1 (Valencia,2023)
Crecimiento en agar YPD; después de 3 días a 26 °C, las células son ovoides y alargadas, varios sacos esporangios; Fermento: Anaeróbico Crecimiento: Circular; Textura: Cremosa; Color: Blanco-Crema; Grupo: Levaduras.	 B1L3-2 (Valencia,2023)
Crecimiento en agar YPD: después de 3 días a 26 °C, las células son ovoides largadas, 2 sacos esporangios; Fermento: Anaeróbico; Crecimiento: Circular; Margen: borde interno irregular; Textura: Cremosa; Aspecto: Rugosa externa; Color: Blanquecina; Grupo: Levaduras.	 B2L1-1 (Valencia,2023)
Crecimiento en agar YPD; después de 3 días a 26 °C, las células son ovoides y alargadas, se observan sacos esporangios; Fermento: Anaeróbico; Crecimiento: Circular; Margen: Borde irregular; Textura: Ramificación interna; Aspecto: Cremoso; Color: Blanco-Crema; Grupo: Levaduras.	 B1L2-3 (Valencia,2023)
Crecimiento en agar MRS; después de 3 días a 30 °C, Gram positiva, Cocos; Fermento: Aeróbico; Crecimiento: Circular; Margen: Irregular; Textura: Cremosa; Aspecto: Brillosa; Color: Blanquecino; Grupo: Bacterias.	 A2B1 -1 (Valencia,2023)

Crecimiento en agar MRS; después de 3 días a 30 °C, Gram negativo, Streptobacilos; Fermento: Aeróbico y Anaeróbico; Tipo de crecimiento: Circular; Margen: Irregular; Textura: Cremosa; Aspecto: Cóncava; Color: café-marrón; Grupo: Bacterias.	 A1B2 -2 (Valencia,2023)
Crecimiento en agar MRS; después de 3 días a 30 °C, las células Gram negativo, Diplobacilos; Fermento: Anaeróbico; Crecimiento: Circular; Margen: irregular; Textura: Cremosa, Mucoide; Aspecto: Brillosa, Plano; Color de la colonia: Blanco-Crema; Grupo: Bacterias.	 B2B1 -2 (Valencia,2023)
Crecimiento en agar MRS; después de 3 días a 30 °C, Gram negativa, cocos; Fermento: Aeróbico; Crecimiento: Circular; Margen: Irregular; Textura: Cremosa; Aspecto: Brillosa; Color: Blanco-Crema; Grupo: Bacterias.	 B2B1_4 (Valencia,2023)
Crecimiento en agar MRS; después de 3 días a 30 °C, Gram positivo, Streptobacilos; Fermento: anaeróbico; Crecimiento: Circular; Margen: Irregular; Textura: Brillosa; Aspecto: Cóncava; Color de la colonia: Amarillo-Marrón; Grupo: Bacterias.	 B2B1_3 (Valencia,2023)
Crecimiento en agar MRS; después de 3 días a 30 °C, Gram positiva, Cocos; Fermento: Anaeróbico; Crecimiento: Esférica; Margen: regular; Textura: Cremosa, Mucoide; Aspecto: Suave; Color: Marrón-Café.	 B2B1_5 (Valencia,2023)

Realizado por: Valencia,2023.

Tabla 2: Compuestos volátiles procedentes de la fermentación, muestra los resultados del análisis realizado por cromatografía de gases, se detallan tiempos de retención, el porcentaje de similitud con espectros de galerías en base de datos y la retención index.

Nº	Tiempo de retención	% De Similitud	Ret.Index	Nombre del compuesto
1	3.382	83	792	1-isopropoxi-2-propanol
2	3.535	84	783	Formato de butilo
3	3.705	85	0	Ácido acético
4	3.817	81	811	1,3-propanodiol
5	3.974	82	0	Formamidina
6	4.109	76	811	Ácido butanoico, 2-metil
7	4.345	75	0	2-pentadecil-4,4,5,5-tetradeutero-1,3-dioxolano
8	4.461	84	818	Formado de isopentilo
9	4.670	75	818	2-pentanol, formiato
10	5.173	76	832	1-pentanol,2,3 dimetil
11	5.821	86	838	(+) Ácido láctico
12	6.035	81	0	Ácido butírico de metilo
13	7.047	81	875	Ácido pentanoico
14	7.850	82	886	Butirolactona
15	8.737	88	0	4-D-2-metil-3-pentanol
16	11.370	82	999	Pentanoato de terc-butilo
17	12.515	76	0	1,2,4,5-tetrazina, 1,2,3,6-tetrahidro-3,6-dimetil-
18	14.599	78	1099	3-Isopropenil-1,2dimetilciclopentanol
19	17.485	78	1200	Ácido 6-noninoico, éster metílico
20	18.045	73	0	1-propeno, 3-azido-

Realizado por: Valencia, 2023.

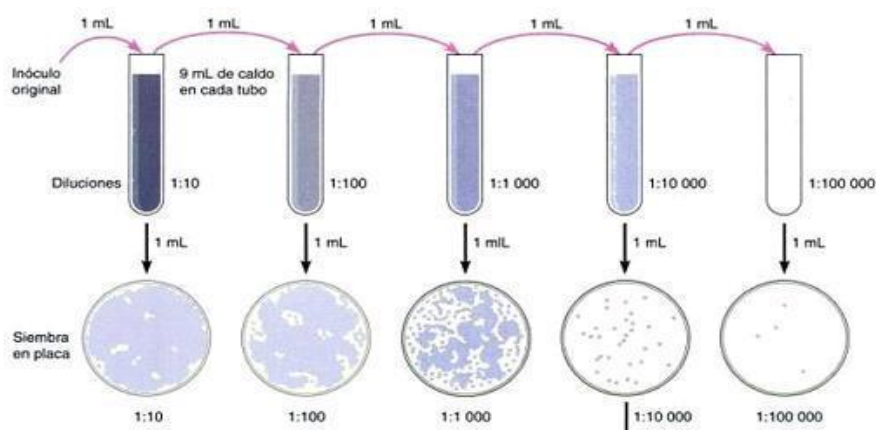


Figura 1: Se describe el método de diluciones decimales y siembra en placas Petri.
Realizado por: Arredondo-Solorzano, 2016.

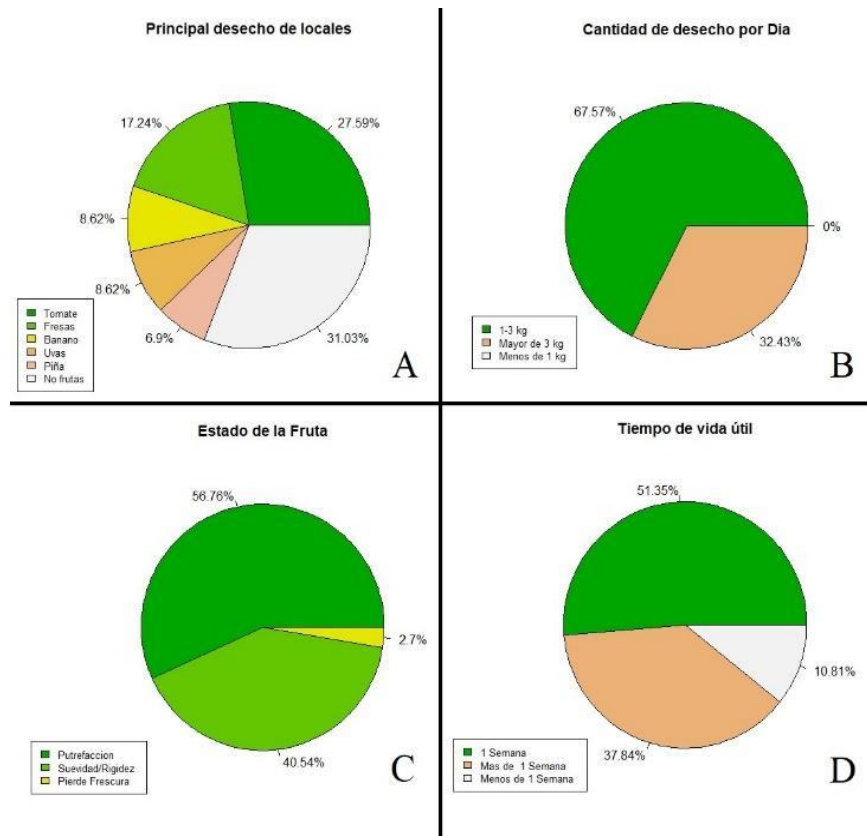


Figura 2: Muestra los resultados de las encuestas a realizadas a comerciantes. Las preguntas a comerciantes del mercado central de Tena basadas en sus experiencias en la venta de frutas. Los resultados del estudio se presentan en cuatro figuras diferentes. La Figura 2-A muestra el principal residuo generado. La Figura 2-B indica la cantidad aproximada de desechos generados diariamente. La Figura 2-C describe el estado en el que se encuentra la fruta cuando se retira de la venta al público. Por último, la Figura 2-D detalla el tiempo que transcurre desde la compra de la fruta hasta que se retira de la venta al público.

Realizado por: Valencia, 2023.

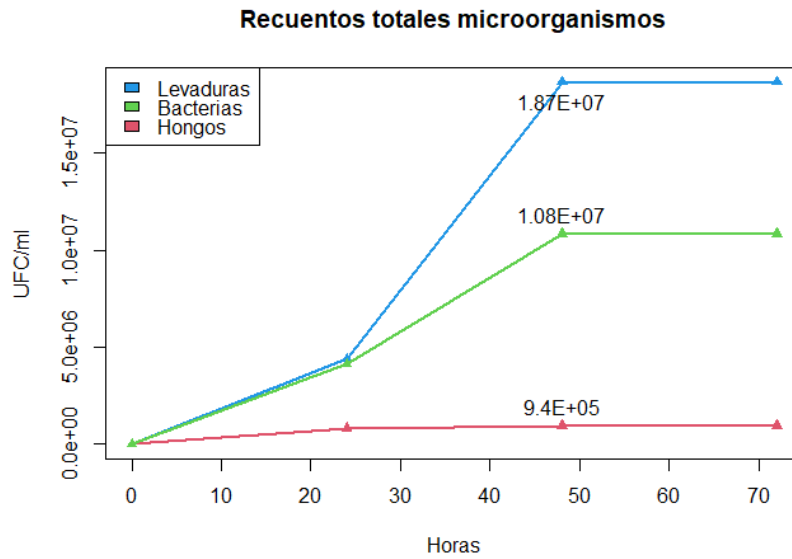


Figura 3: Promedio de unidades formadoras de colonia por ml. Se observa que en el valor máximo de colonias fue alcanzado después de 48 horas, donde las levaduras presentaron un recuento de UFC/ml⁻¹ con $\bar{X}$ = 1.87E+07, Max= 3.00E+07 y Min=1.36E+07, las bacterias presentaron recuentos de UFC/ml⁻¹ con $\bar{X}$ = 1.08E+07, Max= 1.73E+07 y Min=5.60E+06 y los hongos presentaron recuentos de UFC/ml⁻¹ con $\bar{X}$ =9.4E+05, Max= 1.81E+06 y Min=1.90E+05.

Realizado por: Valencia,2023.

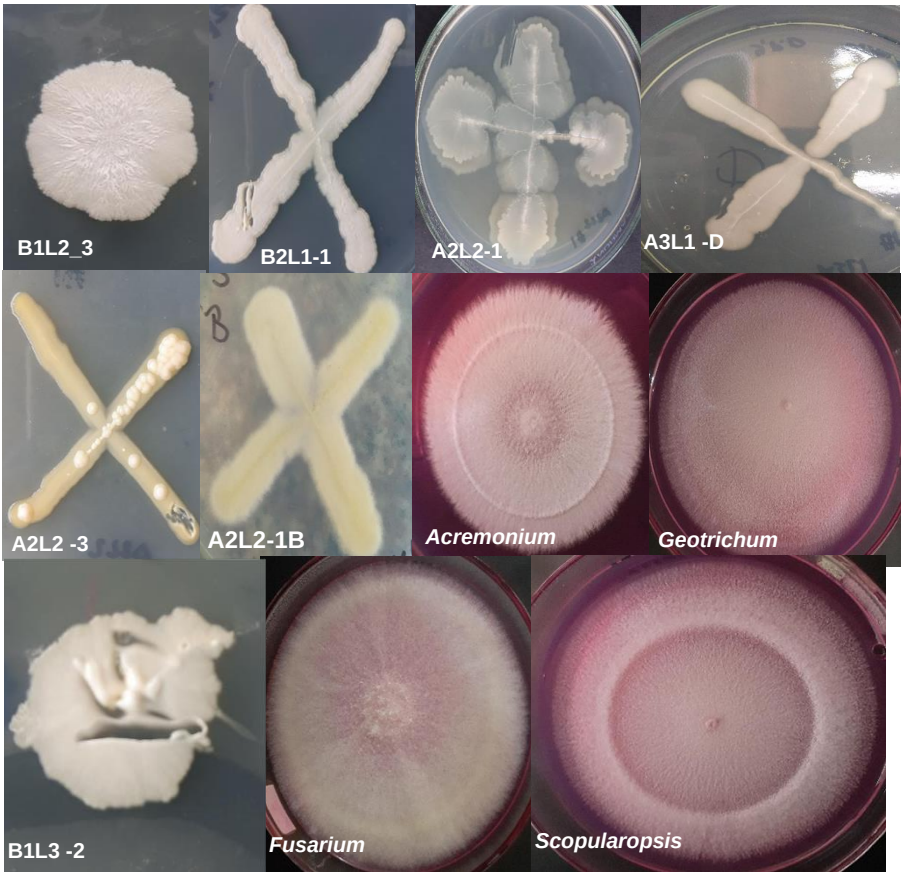
ANEXOS

Anexo A: Antecedentes de la investigación

Los residuos orgánicos, específicamente los de procedencia agrícola y forestal, tienen el potencial de ser materias primas para la producción de biocombustibles de tercera generación, biofertilizantes, biomateriales, entre otros, debido a la presencia de lignocelulosa en su composición ^[22]. Los componentes de la lignocelulosa son carbohidratos reticulados covalentemente a polímeros de celulosa y hemicelulosa, junto con lignina sin carbohidrato ^[23]. Y para usar estos carbohidratos se requiere de costosos pretratamientos físicos, químicos y/o enzimáticos seguido de fermentación, donde se obtiene productos y sub productos que son precursores al desarrollo de nuevos productos con valor agregado (bioetanol, bio butanol, bioplástico, entre otras) ^[24].

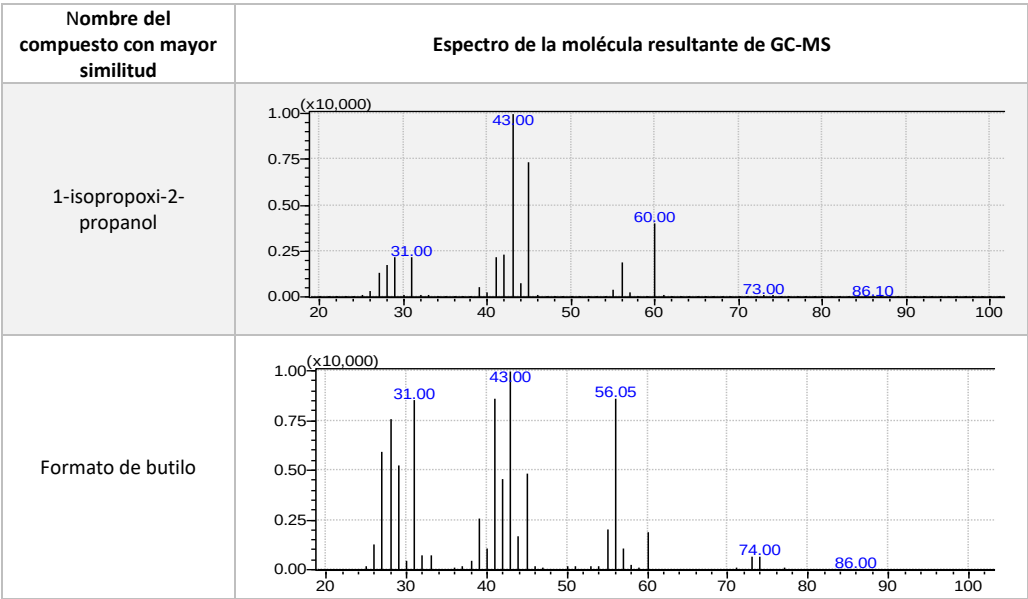
Se sabe que cada país tiene diferentes formas de manejo de residuos sólidos, por lo general se diferencian en temas de legislación, recursos y sobre todo del nivel tecnológico de cada país. La biotecnología puede ser un factor clave para mejorar el manejo de residuos sólidos de tipo orgánico en el Ecuador, ya que tiene el potencial para el aprovechamiento/transformación de esta biomasa, convertirla en un servicio, un bien o un producto nuevo con valor económico agregado, para lograrlo, debemos estudiar al detalle esta biomasa, desde sus lixiviados hasta sus recursos genéticos y biológicos comenzando así la bioprospección de microorganismo con potencial biotecnológico.

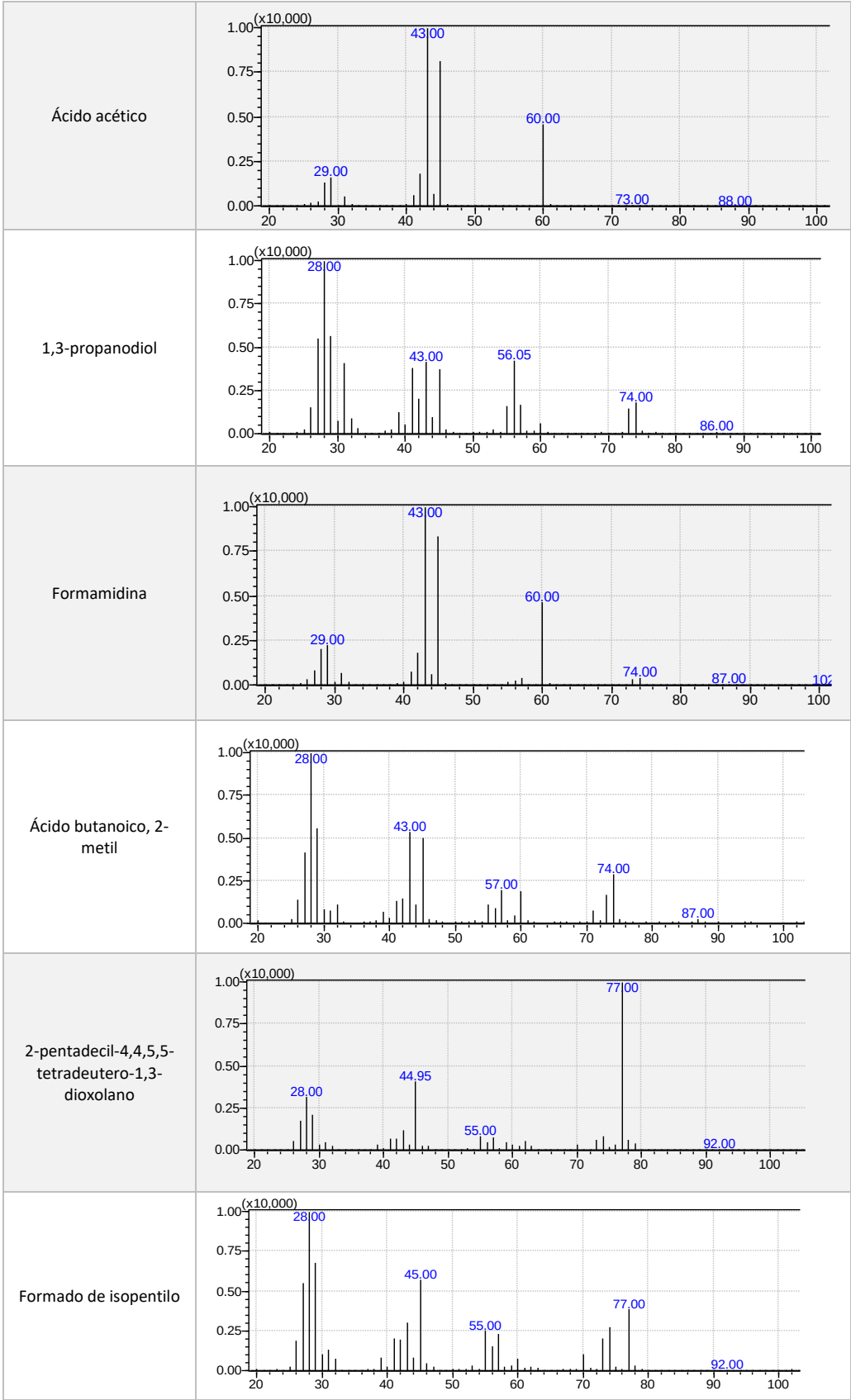
Anexo B: Colonias identificadas en el fermento

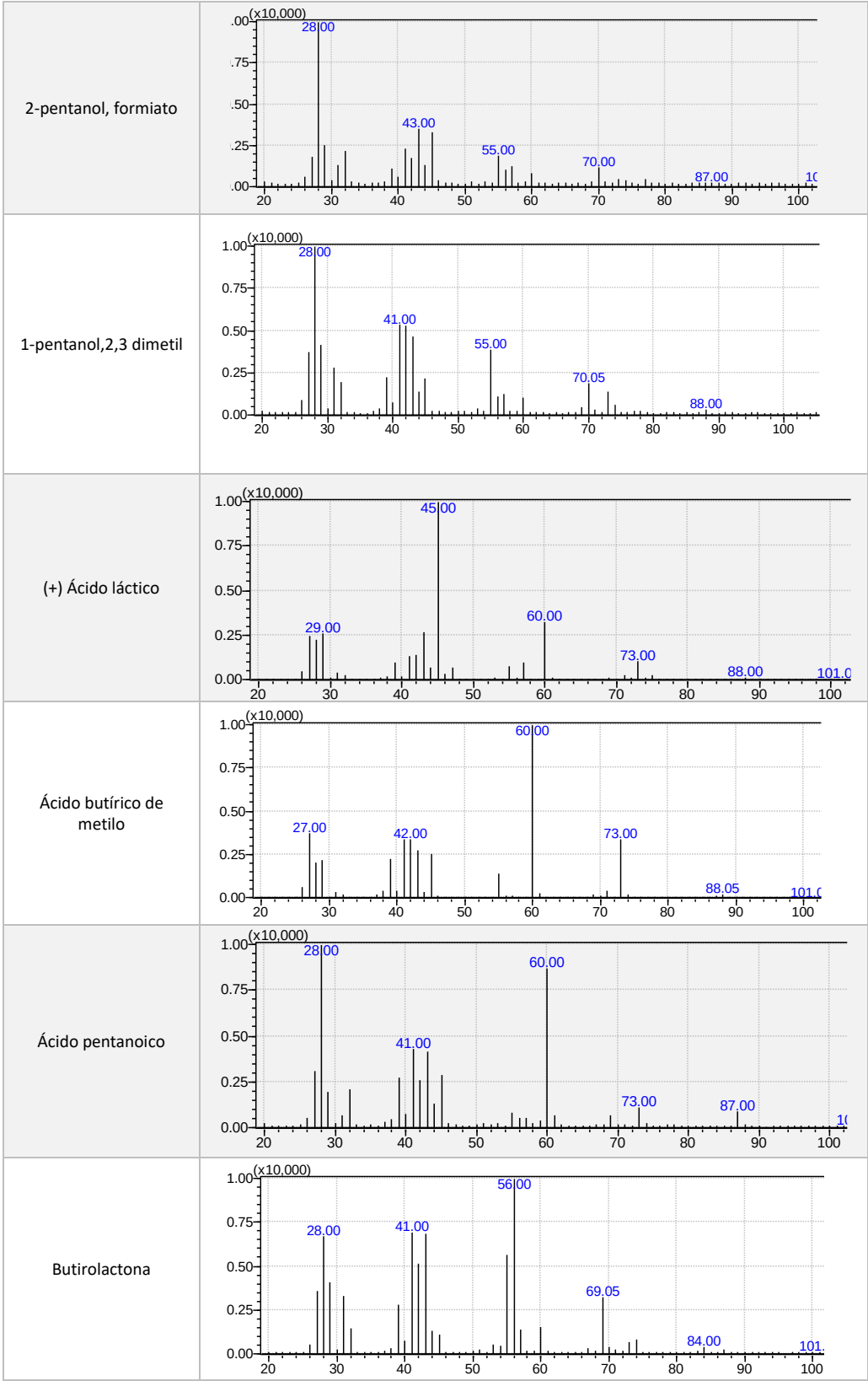


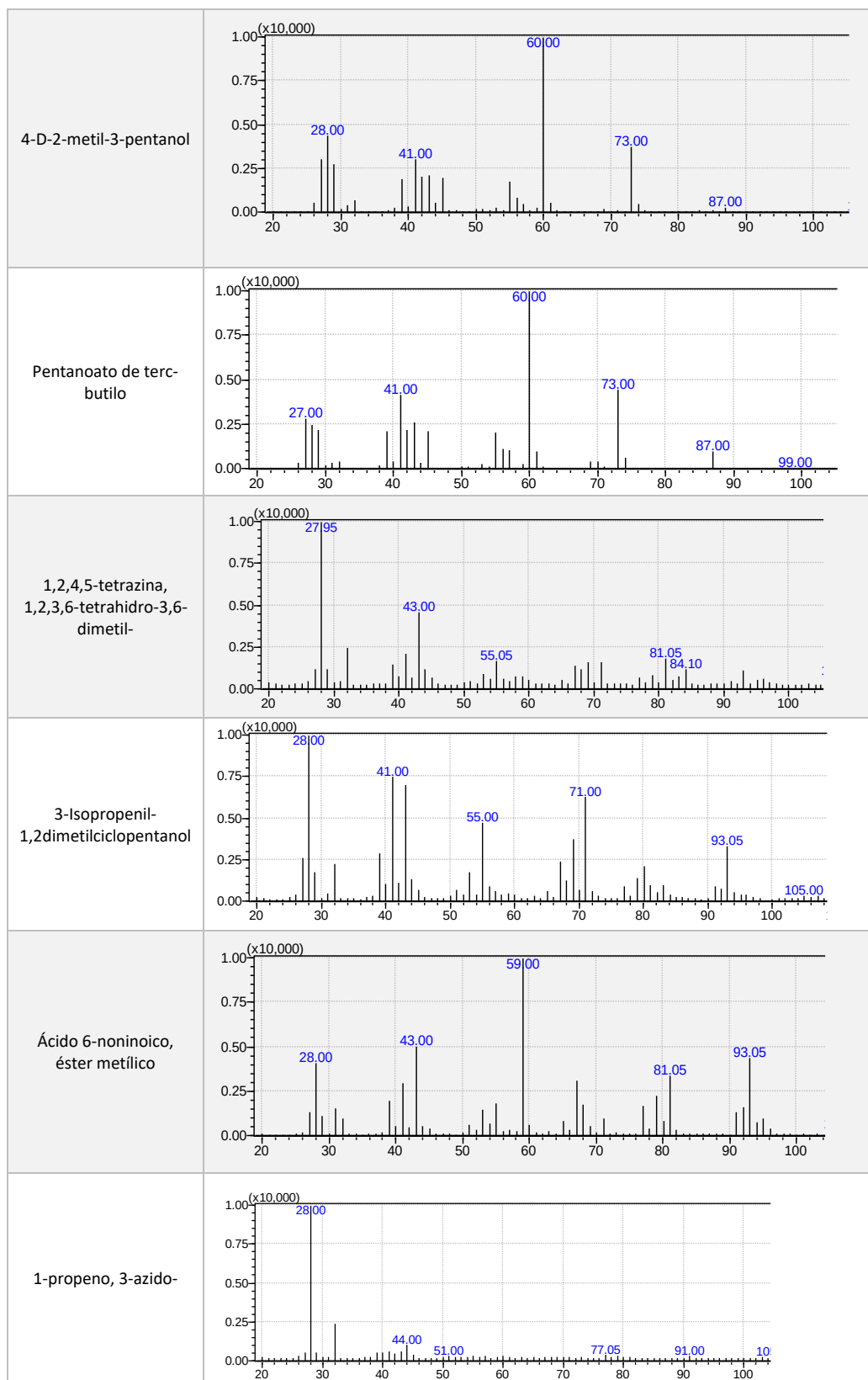
Realizado por: Valencia, 2023.

Anexo C: Espectros de las moléculas obtenidas por GC-MS









Realizado por: Valencia, 2023.