

**CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA CELULAR (SCP) EN
LA BIOMASA DE LA LEVADURA *Saccharomyces Cerevisiae* PRODUCIDA A
PARTIR DE RESIDUOS DE CÁSCARAS DE NARANJA (*Citrus sinensis L var
valencia*) Y PAPA (*Solanum tuberosum*) VARIEDAD DIACOL CAPIRO (R-12)
PARA USO EN LA ALIMENTACIÓN ANIMAL.**

GOLDA MEYER TORRES VARGAS

**UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA –UNAD
ESCUELA DE CIENCIAS AGRARIAS, PECUARIAS Y DEL MEDIO AMBIENTE
DUITAMA
2013.**

**CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE PROTEÍNA CELULAR (SCP) EN
LA BIOMASA DE LA LEVADURA *Saccharomyces Cerevisiae* PRODUCIDA A
PARTIR DE RESIDUOS DE CÁSCARAS DE NARANJA (*Citrus sinensis L var
valencia*) Y PAPA (*Solanum tuberosum*) VARIEDAD DIACOL CAPIRO (R-12)
PARA USO EN LA ALIMENTACIÓN ANIMAL.**

GOLDA MEYER TORRES VARGAS

TRABAJO DE GRADO

**Presentado como requisito para obtener el título de
Especialista en Biotecnología Agraria**

Director

ALBERTO CASTELLANOS RIVEROS

MVZ. Esp. MSc Microbiología.

**UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA –UNAD
ESCUELA DE CIENCIAS AGRARIAS, PECUARIAS Y DEL MEDIO AMBIENTE
DUITAMA
2013.**

NOTA DE ACEPTACIÓN

Presidente del Jurado

Jurado

Jurado

Duitama, _____ de 2013.

“Doy gracias a Dios y a la Virgen María por permitirme culminar este proyecto académico y dedico con todo mi corazón este éxito:

A mi madre Graciela Vargas, que por voluntad divina hoy no me acompaña.

A mi hija Sofía Carolina quien es la luz en mi camino y la razón de mi vida.

A mi esposo Hugo Javier, por su compañía y paciencia.

A mi hermana Constanza, por su infinita colaboración incondicional...

A la Ingeniera Ruth Isabel Ramírez, por su colaboración para la financiación del proyecto.

Y a todas aquellas personas que no menciono, gracias por ayudarme para que esta investigación se llevara a feliz término”.

RESUMEN

El objetivo en esta investigación, se centró en cuantificar el contenido de proteína celular (SCP) en la biomasa de la levadura *Saccharomyces Cerevisiae* producida a partir de residuos de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis L var valencia*) y papa (*Solanum tuberosum*) variedad Diacol Capiro (R-12) para uso en la alimentación animal. Se utilizó los residuos de cáscaras de naranja y papa al 100% (N100 y P100) y combinaciones porcentuales de estos (N25P75, N50P50 y N75P25); se les caracterizó químicamente en cuanto porcentaje de humedad en base húmeda (%H bh) y en base seca (%Hbs), porcentaje de materia seca (% MS), porcentaje de grasa (% extracto etéreo), celulosa (gramos/ 100 gramos de residuo seco), almidón (gramos/ 100 gramos de residuo seco) y azúcares reductores (gramos/100 gramos de residuo seco). Los datos de los contenidos de celulosa, almidón y azúcares reductores, indicaron que se debe realizar una hidrólisis para aumentar la cantidad de azúcares fermentables. Se evaluó el efecto de los tratamientos en la producción de azúcares reductores mediante hidrólisis química; el test de Tukey indicó que entre N100, N75P25 y P100 existen diferencias significativas, P100 es quien genera más azúcares reductores; dentro de las combinaciones porcentuales N25P75 y N50P50 no hay diferencias significativas. Todos los tratamientos se inocularon con células de *Saccharomyces cerevisiae* y se llevaron a fermentación aerobia por 18 horas. Se evaluó la mayor producción de proteína unicelular (SCP): el análisis estadístico indicó que hay diferencia significativa en la producción de proteína unicelular (SCP) entre los sustratos de naranja y papa (N100 y P100), pero en la combinaciones porcentuales no hay diferencias significativas. Se considera a P100 como el mejor sustrato para el crecimiento y adaptación de la levadura y para la producción de proteína unicelular SPC. Adicionalmente se determinó para todos los tratamientos parámetros cinéticos como velocidad específica, μ_x , (h^{-1}) y rendimiento de biomasa $Y_{x/s}$, (g/g), en donde se determinó que P100 registro una $\mu_x=0,48$ y un $Y_{x/s}=0.2371$.

ABSTRACT

The objective of research focused on quantifying the cellular protein content (SCP) in the biomass of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* produced from waste orange peel (*Citrus sinensis L. var valence*) and potato (*Solanum tuberosum*) variety Diacol Capiro (R-12) for use in animal feed. Waste was used orange peels and potato 100% (N100 and P100) and percentage combinations of these (N25P75, N50P50 and N75P25) were chemically characterized as moisture content wet basis (% H bh) and dry basis (% Hbs), percentage of dry matter (% DM), fat percentage (% ether extract), cellulose (grams / 100 grams of dry residue), starch (g / 100 g of dry residue) and reducing sugars (g/100g dry residue). The data of the contents of cellulose, starch and reducing sugars indicated that hydrolysis should be performed to increase the amount of fermentable sugars. There was effect of treatments on reducing sugar production by chemical hydrolysis, the Tukey test indicated that between N100 and P100 N75P25 significant differences exist, P100 is who generates more reducing sugars; within N25P75 and N50P50 percentage combinations no significant differences were found. All treatments were inoculated with *Saccharomyces cerevisiae* cells and aerobic fermentation was carried out 18 hours. Production was assessed as single cell protein (SCP): Statistical analysis indicated that there is significant difference in the production of single cell protein (SCP) between substrates orange and potato (N100 and P100), but the percentage combinations no significant differences. P100 is regarded as the best substrate for the growth and adaptation of yeast for the production of single cell protein SPC. Additionally determined for all treatments specific kinetic parameters such as speed, μ_x , (h^{-1}) and yield biomass $Y_{x/s}$ (g / g), where it is determined that obtained P100 $\mu_x = 0.48$ and $Y_{x/s} = 0.2371$.

INDICE GENERAL

RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCION	16
1. MARCO TEORICO	20
1.1 RESIDUOS VEGETALES ORGÁNICOS	20
1.1.1 Composición química de los residuos orgánicos vegetales	21
1.1.1.1 Residuos lignocelulósicos	21
1.1.1.2 Almidón	27
1.2 RESIDUOS VEGETALES GENERADOS DEL A INDUSTRIA DE LA NARANJA Y PAPA	30
1.3 HIDROLISIS DE POLISACÁRIDOS	36
1.3.1. Hidrólisis enzimática	36
1.3.2 Hidrólisis química	37
1.4 PRODUCCION DE PROTEINA UNICELULAR (SCP	40
1.4.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	46
2. METODOLOGIA	49
2.1 MATERIALES	49
2.1.1 materias primas para la obtención de sustratos fermentables	49
2.1.2 Microorganismo	50

2.2 MÉTODOS	50
2.2.1 Combinaciones porcentuales	50
2.2.2 Caracterización de la materia prima	50
2.2.3 Hidrólisis química de la materia prima	51
2.2.4. Fermentación	52
2.2.4.1 Adaptación del microorganismo y medio de cultivo	54
2.2.4.2 Pie de cuba	55
2.2.4.3 Fermentación aeróbica	55
2.2.4.4 Determinaciones de la biomasa	56
2.2.4.5 Concentración de azúcares reductores residual	57
2.2.4.6 Conteo celular	57
2.2.4.7 Concentración de proteína	58
2.2.4.7 Determinación parámetros cinéticos	58
2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	58
2.3.1 Caracterización de la materia prima	58
2.3.2 Hidrólisis química	59
2.3.2.1 Diseño experimental para la hidrólisis química	59
2.3.2.2 Hipótesis	60
2.3.2.3 Variables	60
2.3.3 Fermentación de sustratos	61

2.3.3.1 Contenido de Proteína Celular (SCP)	61
2.3.3.2 Diseño experimental Contenido de Proteína Celular (SCP):	61
2.3.3.3 Hipótesis	62
2.3.3.4 variables	63
3. RESULTADOS	64
3.1 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LA MATERIA PRIMA	64
3.2 HIDRÓLISIS QUÍMICA	66
3.3 FERMENTACIÓN DE SUSTRATOS	68
3.3.1 Contenido Proteína Unicelular (SCP)	71
3.3.2 Parámetros cinéticos	73
4. DISCUSIÓN	74
4.1 CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA	74
4.2 HIDRÓLISIS QUÍMICA	79
4.3 FERMENTACIÓN DE SUSTRATOS	83
4.4 CONTENIDO PROTEÍNA UNICELULAR (SCP)	86
4.5 PARÁMETROS CINÉTICOS	90
5. CONCLUSIONES	93
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Composición química de los residuos de cáscara de naranja.	32
Tabla 2. Características generales de las levaduras	46
Tabla 3. Composición de la materia seca de la levadura	47
Tabla 4. Caracterización residuos de cáscara de naranja, papa y combinaciones porcentuales	65
Tabla 5. Cantidad de azúcares reductores después de la hidrólisis (g/gramos de residuo seco).	66
Tabla 6. Estadístico (ANOVA) Cantidad de azúcares reductores después de la hidrólisis (g/gramos de residuo seco)	67
Tabla 7. Comparaciones múltiples. Cantidad de azúcares reductores después de la hidrólisis (g/gramos de residuo seco)	67
Tabla 8. Resultados fermentación combinaciones porcentuales de cáscara e naranja y papa.	70
Tabla 9. Cantidad de Proteína unicelular (mg/ml).	71
Tabla 10. Estadístico (ANOVA) Cantidad de Proteína unicelular (mg/ml).	72
Tabla 11. Comparaciones múltiples (prueba de Tukey) Cantidad de Proteína unicelular (mg/ml).	72
Tabla 12. Parámetros cinéticos de la fermentación discontinua (batch).	73

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Etapas de recuperación para componentes de alto valor industrial a partir de residuos de alimentos	22
Figura 2. Posición de los recursos lignocelulósicos en referencia a la organización de la pared celular de los vegetales.	22
Figura 3. Estructura química de la celulosa	23
Figura 4. degradación ácida de la celulosa	24
Figura 5. Degradación de la celulosa por ácidos fuertes.	25
Figura 6. Estructura de una fracción de la hemicelulosa: residuos de Xilano con enlaces β -(1,4), Manosa β -(1,4), Glucosa-glucosa- α (1,3).	26
Figura 7. Hidrolisis de pentosas provenientes de la hemicelulosa	27
Figura 8. Estructura química del almidón	28
Figura 9. Puntos de hidrólisis del almidón	29
Figura 10. Composición del residuo seco de cáscara de naranja.	33
Figura 11. Azúcares reductores presentes en cáscara de naranja	34
Figura 12. Composición residuos cáscara de naranja luego de una destilación a vapor	35
Figura 13. Composición residuos de papa.	36
Figura 14. Etapas posteriores requeridas después de la hidrólisis y antes de una inoculación biológica	38
Figura 15. Microorganismos más importantes en la producción de SCP.	42
Figura 16. Perfil de aminoácidos para la SCP.	43

Figura 17. Parámetros nutricionales de la SCP	44
Figura 18. Crecimiento macroscópico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	48
Figura 19. Materia prima, selección, adecuación y conservación.	49
Figura 20. Combinaciones porcentuales de cáscaras de naranja y papa deshidratadas.	50
Figura 21. Caracterización Química de la materia prima	53
Figura 22. Procedimiento hidrólisis química de la celulosa y almidón de las cáscaras de naranja y papa	54
Figura 23. Inoculación del microorganismo en las combinaciones porcentuales de los hidrolizados.	55
Figura 24. Montaje para la fermentación aeróbica	56
Figura 25. Determinación de azúcares reductores residual técnica DNS.	57
Figura 26. Conteo celular mediante Cámara de Neubauer	57
Figura 27. Cuantificación proteína unicelular (SCP) por la técnica e Bradford.	58
Figura 28. Caracterización de la materia prima para Humedad y Materia seca.	74
Figura 29. Caracterización de la materia prima para celulosa, almidón y grasa.	76
Figura 30. Caracterización de la materia prima para pH y azúcares reductores.	78
Figura 31. Cantidad de azúcares reductores después de la hidrólisis (g/gramos de residuo seco).	80
Figura 32. Producción de azucars reductores antes y después de la hidrólisis química	82
Figura 33. Contenido de azúcares reductores residuales en g/L.	83
Figura 34. Contenido de biomasa (g/l).	84
Figura 35. Conteo de células de levadura (número de células/ml).	86

Figura 36. Contenido de proteína unicelular (SPC) en mg/ml	87
Figura 37. Contenido de proteína (mg/ml) obtenida por le método de Bradford	89
Figura 38. Velocidad de crecimiento microbiano	91

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Ficha técnica levadura <i>saccharomyces cerevisiae</i>	102
Anexo 2. Protocolos de laboratorio para la caracterización materia prima	103
Anexo 3. Protocolo hidrólisis química	110
Anexo 4. Cuantificación de proteínas según Bradford, (Miller, g., 1976).	112
Anexo 5. Matriz y datos del experimento caracterización química	114
Anexo 6. Resumen estadístico caracterización química	115
Anexo 7. Curva patrón de glucosa para la determinación de azúcares reductores (método DNS) antes de la hidrolisis química	118
Anexo 8. Matriz y datos del experimento hidrólisis química	119
Anexo 9. Estudio estadístico hidrólisis química	120
Anexo 10. Curva patrón de glucosa para la determinación de azúcares reductores (método DNS) después de la hidrolisis química.	124
Anexo 11. Curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA) para la determinación de proteína unicelular scp (método Bradford 1976)	125
Anexo 12. Matriz y datos del experimento para la cantidad de proteína unicelular, scp (mg/ml)	126
Anexo 13. Estudio estadístico experimento para la cantidad de proteína unicelular, scp; (mg/ml)	127

INTRODUCCION

A nivel mundial a diario se generan miles de toneladas de residuos sólidos vegetales provenientes de varias fuentes: doméstico, comercial, industrial y cosecha, esto hace que se generen grandes volúmenes que requieren de espacio para su biodegradación natural, así como una tecnología adecuada, máxime cuando no existe una separación o disposición adecuada. En otro contexto se analiza que el agotamiento acelerado de los recursos fósiles, el calentamiento global, y la falta de alternativas para sustituir a los combustibles y productos químicos derivados a partir de recursos fósiles ha impulsado a un creciente interés en la conversión de residuos vegetales en biocombustibles y bioproductos, generando así nuevas tecnologías emergentes que conduzcan a disminuir los grandes volúmenes de estos residuos en los rellenos sanitarios.

En el mundo se producen aproximadamente 1600 millones de toneladas por año de residuos sólidos, los cuales generan graves problemas en relación con el medio ambiente y el manejo económico. En el contexto colombiano, de acuerdo con el Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial (2008), indica que el país produce unas 27300 Ton/día de basura de las cuales el 65% son residuos orgánicos y el 35% son inorgánicos. De estos 65% de residuos orgánicos se estima que 40% pertenecen a residuos orgánicos derivados de frutas, tubérculos, hortalizas, leguminosas. De acuerdo a las estadísticas de indicadores de la Iniciativa Latinoamericana y Caribeña para el desarrollo sostenible, 2007, en Colombia, el sector de mayor generación de residuos sólidos orgánicos de origen vegetal son las plazas de mercado, restaurantes y actividades domésticas. En ese informe, se describe que el destino final de estos residuos se hace por evacuación hacia un relleno sanitario y reciclaje como alimento para ganado porcino. En el contexto de realización del proyecto, Duitama (Boyacá) el panorama no es diferente. Actualmente los residuos son recolectados en la ciudad y llevados al relleno sanitario; en promedio se producen 50 toneladas/día, 1800 ton/mes, de las cuales, aproximadamente 1620 toneladas son recolectadas puerta a puerta, de estas se podría decir que 45 toneladas son residuos orgánicos conformados por; restos de vegetales podas de jardín papeles y cartón etc. En

cuanto a los residuos de origen vegetal, en la ciudad no se realiza una separación adecuada, de forma generalizada, sólo existe en las plazas de mercado (Minorista-Central de Abastos) y supermercados de cadena donde se producen 12 toneladas/semana que llegan al relleno sanitario, allí son recolectados por particulares y sometidos a procesos de compostaje (para abonos) y vermicompostaje (humus), elementos empleados posteriormente en cultivos de la región, esta actividad permite disminuir gradualmente la contaminación ambiental, pero no es suficiente. La actividad comercial (existencia de varias industrias de fritura de papa) y la economía informal (venta de jugo de naranja en vía pública) generan grandes volúmenes de residuos vegetales, los cuales son recolectados como basura, teniendo como disposición final el mismo relleno sanitario.

La industria de alimentos y agrícola quizá son los sectores en donde más se generan este tipo de residuos, y son muy pocas las industrias de procesamiento de alimentos que implementan tecnologías para la reutilización de los residuos generados del procesamiento de frutas y vegetales, ya que los consideran de un bajo valor comercial, lo que hace que sean eliminados en las aguas industriales, como basura y/o encaminados hacia la alimentación animal sin ningún pretratamiento.

Los residuos orgánicos vegetales, en la actualidad son objeto de estudio en todo el mundo para la producción de biogás, compost, proteína, aminoácidos, productos químicos, fibra, almidón, hemicelulosa, poliurónicos, ácidos orgánicos, aldehídos, cetonas, compuestos cíclicos, etc. Los residuos vegetales orgánicos se consideran una nueva fuente de petróleo no convencional, lo que ayuda a mitigar el agotamiento de recursos no renovables, esto considerando la inmensa riqueza de su composición química y energética derivada de las cadenas de carbono de estos residuos. Para esto es necesario trabajar en conjunto con la biotecnología industrial que aporta el conocimiento necesario para aprovechar al máximo estas cadenas carbonadas de polisacáridos representadas en material lignocelulósico y almidón al convertirlos en excelentes sustratos para el crecimiento de microorganismos, los cuales son los responsables del fraccionamiento de estos polisacáridos para la obtención de sustancia de interés industrial.

La composición química de tales residuos es necesario aprovecharla mediante propuestas que conduzcan a la caracterización de residuos para identificar las potencialidades de producción de sustancias de interés industrial por ejemplo para la producción de proteína unicelular (SCP). Este proyecto evaluó la potencialidad de dos residuos orgánicos vegetales (naranja, papa) como sustratos productores de proteína Unicelular, SCP, al favorecer el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, por lo tanto, esta investigación dio respuesta al siguiente interrogante: ¿Es posible la producción de proteína unicelular, SCP, a partir del crecimiento de la levadura *Saccharomyces Cerevisiae* sobre los sustratos fermentables de residuos de naranja (*Citrus sinensis L var valencia*), papa (*Solanum tuberosum*) variedad Diacol Capiro (R-12) y en las combinaciones porcentuales de estos residuos?. Al responder a este interrogante se confirmó la hipótesis de trabajo planteada “El crecimiento de la levadura *Saccharomyces Cerevisiae* sobre los sustratos fermentables de residuos de naranja (*Citrus sinensis L var valencia*), papa (*Solanum tuberosum*) variedad Diacol Capiro (R-12) y las combinaciones porcentuales de estos, producen una alta concentración de proteína unicelular, SCP, (mg/ml).” y se cumple el objetivo general “cuantificar el contenido de proteína celular (SCP) de la biomasa de la levadura *saccharomyces cerevisiae* a partir de residuos de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis L var valencia*) y papa (*Solanum tuberosum*) variedad Diacol Capiro (R-12) para uso en la alimentación animal.

Se realizaron varias etapas en la investigación: la primera una caracterización química de los residuos individuales de naranja, papa y combinaciones porcentuales de estos; la segunda la hidrólisis química de estos residuos para la obtención de azúcares reductores y la tercera el proceso de fermentación para la producción y obtención de proteína Unicelular (SCP).

Teniendo en cuenta lo anterior, este proyecto pretende aprovechar la composición química de los residuos sólidos generados de algunas de las actividades de negocio como es la venta en la vía pública de jugo de naranja y de la industria de fritura de papa de la

ciudad de Duitama. Con esta investigación, se da un valor agregado a estos residuos para contribuir a incentivar la cultura del reciclaje de residuos derivados de actividades de manipulación, producción y transformación de alimentos en la ciudad de Duitama y conducir futuras investigaciones para la producción de otras sustancias de interés industrial que permitan proponer alternativas de manejo y disposición de los residuos sólidos contribuyendo al mejoramiento de la producción de ganadera en la región.

1. MARCO TEORICO

1.1 RESIDUOS VEGETALES ORGÁNICOS

Se consideran desechos orgánicos vegetales a los residuos de cosecha, transformación y manejo industrial de alimentos hortofrutícolas. Por su composición química, generan altos índices de contaminación cuando su disposición final carece de la tecnología adecuada. De acuerdo con la Organización para la Alimentación y la Agricultura (año), aproximadamente un tercio de la parte comestible de los alimentos producidos para el consumo humano se pierde o se desperdicia en todo el mundo; esta cantidad está alrededor de 1,3 millones tn / año y refleja no sólo la residuos de procesamiento de alimentos, sino también las "pérdidas de alimentos", Galankis (2012), explica que los residuos orgánicos que más abundan en el mundo son los de origen alimentario y agrícola. La composición química de estos residuos es compleja, ricos en materia carbonada. Este autor clasifica a los residuos que se generan de la industria de alimentos en dos grupos (de origen animal y de origen vegetal) y 7 categorías. Explica que en países del tercer mundo los residuos orgánicos de origen vegetal se generan de las actividades de agrícolas y durante el manejo postcosecha y almacenamiento, mientras que, en los países industrializados se comparte entre las etapas de consumo y la agricultura.

Lian, et al. (2010), exponen que el agotamiento acelerado de los recursos fósiles, el calentamiento global, y la falta de alternativas para sustituir a los combustibles y productos químicos derivados a partir de recursos fósiles ha impulsado a un creciente interés en la conversión de materiales lignocelulósicos en los biocombustibles y bioproductos. Para Kang, et al. (2012), las reservas de combustibles fósiles son limitadas y el calentamiento global se está convirtiendo en un problema grave. Para resolver estos problemas, los esfuerzos por desarrollar fuentes de energía alternativas están en marcha. Desde hace varios años, la ciencia ha mostrado su interés por el aprovechamiento de los residuos orgánicos vegetales, de acuerdo con Benedict, et al. (2005) recomiendan usar el almidón y residuos de piel de papa para el tratamiento del agua en la bioreducción de contaminantes como el

perclorato. El tema del aprovechamiento de residuos sólidos de origen vegetal ha sido tema innumerables investigaciones, todas basadas en el potencial de convertirse en fuentes de combustibles y productos químicos; Binder, et al. (2010) y Gil, et al. (2008), consideran a los residuos orgánicos vegetales como una fuente renovable energética, una nueva fuente de petróleo no convencional. Otros autores han clasificado los residuos de alimentos como materias primas por considerarlos con un alto valor añadido para obtener ingredientes de tipo aditivos, agentes auxiliares de fabricación (emulsificantes, espesantes, etc.) y funcionales (prebióticos) para la industria de alimentos; Galankis, (2012), adicionalmente presenta las tecnología emergentes (figura 1) y convencionales que se han desarrollado para la recuperación de sustancias de interés industrial y funcional de los residuos de alimentos que varían de acuerdo a la composición química del residuo y del metabolito de interés a utilizar. Dentro de los metabolitos o sustancias recuperados a partir de los residuos de la industria de alimentos y agrícola, están los fenoles, pectinas, fibras, antioxidantes, hidrolizados de proteína, jarabes de azúcar, etanol, sabores, quitosan grado alimenticio, ácidos orgánicos, aminoácidos.

1.1.1 Composición química de los residuos orgánicos vegetales

1.1.1.1 Residuos lignocelulósicos: Los residuos orgánicos vegetales poseen grandes cantidades de residuos lignocelulósicos. Estos residuos están formados por tres polímeros: celulosa (6C), hemicelulosa (5C) y lignina. De los dos primeros, por hidrólisis, se obtiene una mezcla de azúcares de seis y cinco carbonos (6C y 5C).

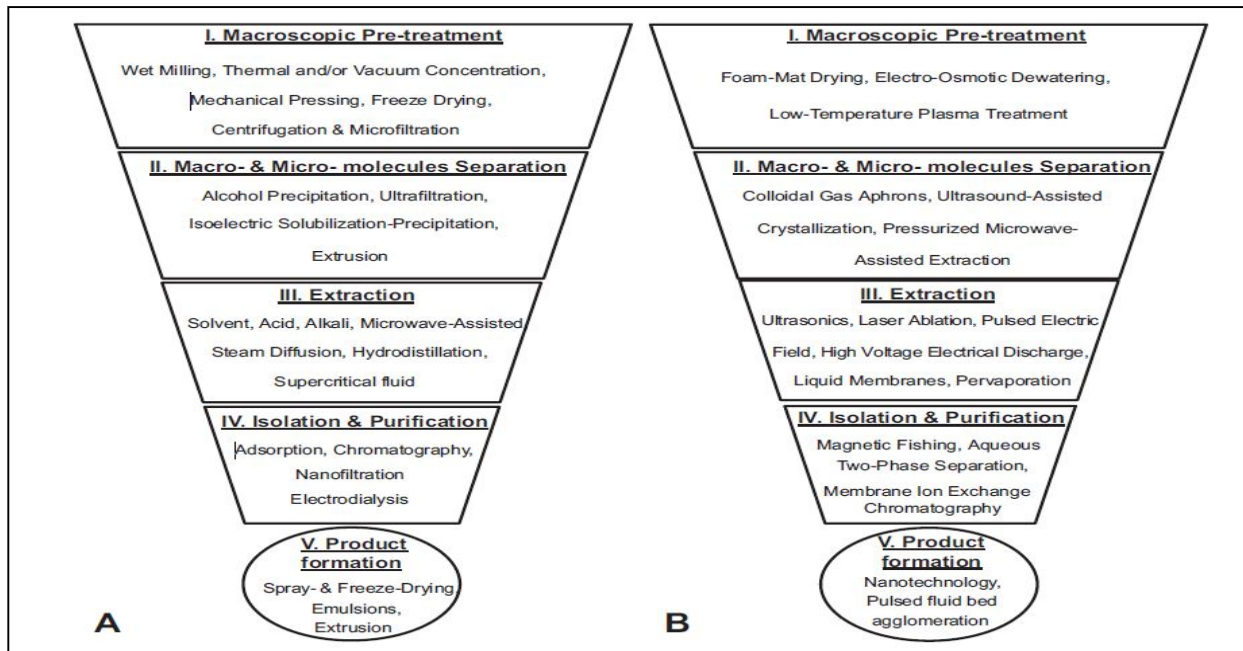


Figura 1. Etapas de recuperación para componentes de alto valor industrial a partir de residuos de alimentos: (A), tecnologías convencionales (B) tecnologías emergentes. Fuente Galankis, 2012.

Estos residuos son ricos en celulosa, tal como lo presentan Cardona, *et al.* (2006), en la caracterización de residuos vegetales provenientes de plazas de mercado, en donde el contenido de celulosa fue 3.16 g/100 g de residuo seco, constituyendo en uno de los mayores componentes de los desechos, lo que justifica su posterior aprovechamiento como fuente de azúcares fermentables, según Bian, *et al.* (2010).

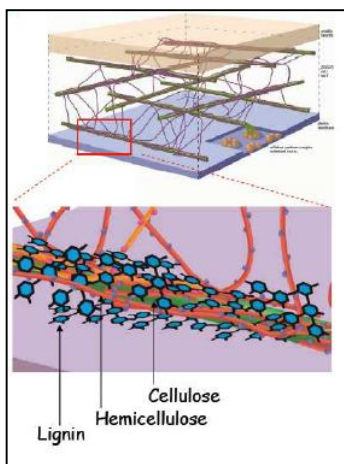


Figura 2. Posición de los recursos lignocelulósicos en referencia a la organización de la pared celular de los vegetales. Fuente. Quintero, J. (2008).

- **Celulosa:**

La celulosa es uno de los constituyentes mayoritarios de la pared celular de las plantas. Es un polisacárido de cadenas lineales sin ramificaciones, en donde la unidad monomérica es la D-glucosa, las cuales están unidas mediante enlaces glucosídico β -(1,4), como se observa en la figura 3. Estos enlaces pueden ser hidrolizados de forma química, enzimática o por microorganismos celulolíticos y hemicelulolíticos, estos últimos residen en el sistema digestivo de algunos insectos y rumiantes cuyo proceso es mediado por enzimas del tipo celulasas.

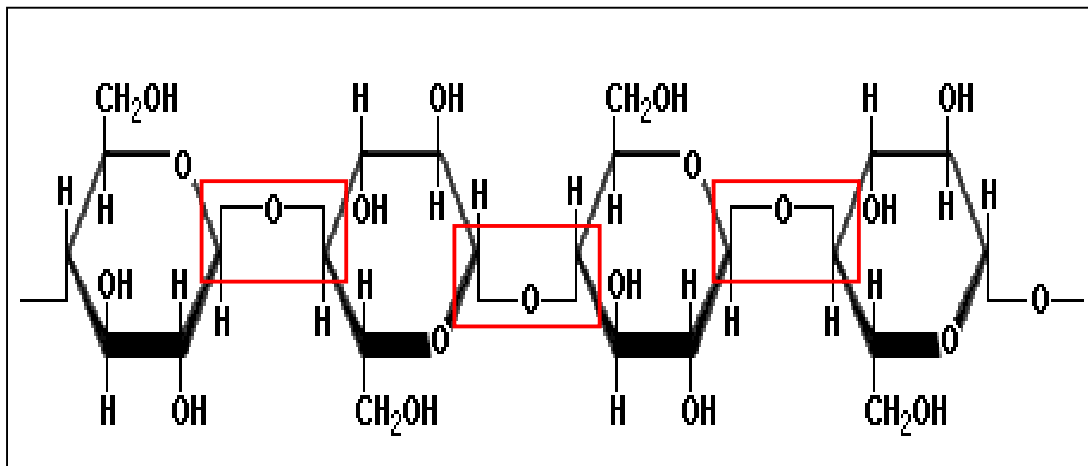


Figura 3: Estructura química de la celulosa. Fuente Zamora, A. (2013).

Quintero (2008), presenta a la hidrólisis de la celulosa como un paso importante para la determinación de celulosa. Considera a la celulosa y hemicelulosa sustratos generadores de grandes cantidades de biomasa, pero deben ser cuantificados e hidrolizados. Este mismo autor, analiza los efectos de los pretratamientos sobre la estructura y composición de los residuos de lignocelulósicos, así, el pretratamiento con ácido diluido presenta los mejores efectos ya que incrementa el área de superficie, remueve

hemicelulosa y altera la estructura de la lignina. El mecanismo químico, que Quintero, (2008), presenta para la degradación de la celulosa esta en la figura 4.

La hidrólisis de celulosa se puede llevar a cabo con ácidos inorgánicos fuertes (HCl, H₂SO₄), pero si esta hidrólisis no es controlada, los monosacáridos de glucosa obtenidos pueden seguir rutas de degradación a furfural y/ hidroximetilfurfural (HMF) debido a que esta reacción prosigue a la deshidratación de azúcares, tal como se observa en la figura 5. Para procesos de crecimiento de microorganismos, estas sustancias pueden actuar como sustancia tóxicas o inhibitoras, de acuerdo al análisis de Binder, *et al.* (2010) y Chiamonti, *et al.* (2012).

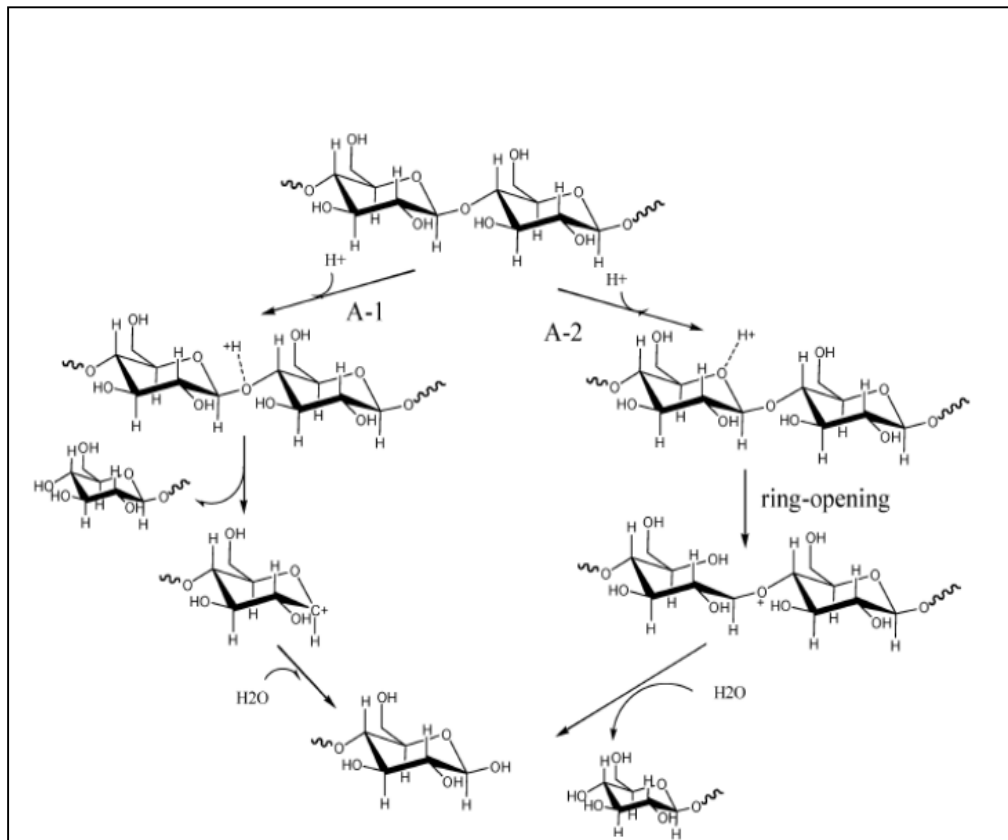


Figura 4. Degradación ácida de la celulosa. Fuente Quintero, 2008.

Para evitar esta degradación, Mussato, et al. (2006), presenta la separación de las fibras de celulosa del bagazo de malta mediante una hidrólisis ácida y alcalina; con este procedimiento, se recomienda un secado en estufa eléctrica a $50 \pm 5^\circ\text{C}$ hasta presentar un contenido de humedad de aproximadamente 10%. Estos autores, ensayaron una hidrólisis ácida + hidrólisis alcalina: con este procedimiento, el contenido de celulosa fue del 90.5% (p/p) de celulosa frente al contenido inicial del material original sin tratamientos, el cual presentó un 16.8% de celulosa. Con este tratamiento se obtuvieron escasas cantidades de sustancias inhibidoras o contaminantes, como el Hidroximetilfurfural (HMF).

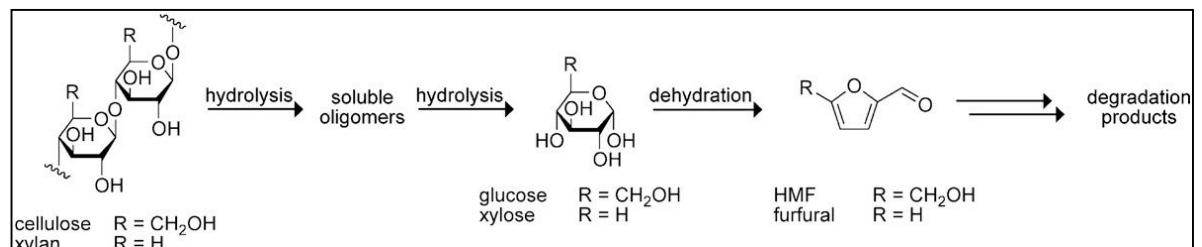


Figura 5. Degradación de la celulosa por ácidos fuertes. Fuente. Binder, *et al.* (2010).

- Hemicelulosa:

Los residuos de hemicelulosa no son químicamente homogéneos, están compuestos por diferentes unidades de azúcar dispuestos en diferentes proporciones y con diferentes sustituyentes; los azúcares principales son la D-xilosa, L-arabinosa, D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, D-glucurónico, ácido 4-O-metil-D-glucurónico ácido, ácido D-galacturónico, y en menor medida, L-ramnosa, L-fucosa, y varias O-metilados azúcares neutros (figura 6).

Las hemicelulosas xilosa ricas en maderas blandas y duras son por lo general denominadas xilanos. La hemicelulosa de maderas duras y los residuos agrícolas suelen ser ricos en xilano, Chander, *et al.* (2011).

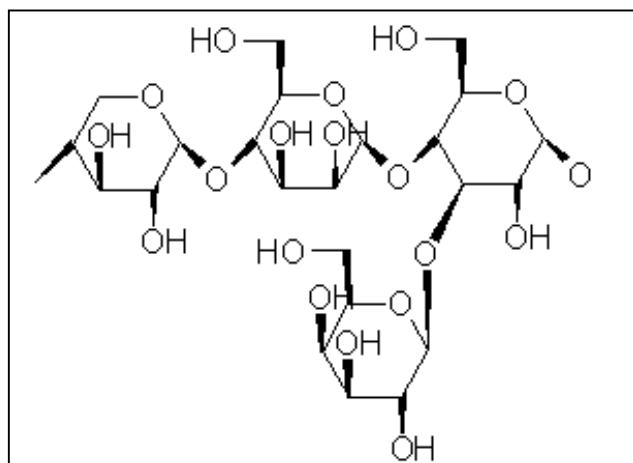


Figura 6. Estructura de una fracción de la hemicelulosa: residuos de Xilano con enlaces β -(1,4), Manosa β -(1,4), Glucosa-glucosa- α (1,3). Fuente Wikipedia (2013).

Aunque las hemicelulosas no son digeribles, pueden ser fermentadas por levaduras y bacterias que producen pentosas, que al desdoblarse se llaman pentosanos, el proceso de hidrólisis de estas sustancias producen compuestos como los que se observan en la figura 7.

- **Lignina:**

La lignina es una macromolécula polifenólica compuesta por diferentes unidades de compuestos fenólicos y aromáticos, y que tiene como función proporcionar rigidez a la pared celular del material. Por esta última razón, la composición de la lignina no se considera un sustrato que proporcione azúcares reductores ni azúcares fermentables, por lo tanto es indispensable eliminarla de los sustratos a fermentar. Por lo tanto Tejada, *et al.* (2010), y Monsalve, *et al.* (2006), sugieren realizar la eliminación de la lignina, de igual manera lo recomienda Chiaramonti, *et al.* (2012); argumentan que el propósito de un tratamiento previo es separar de manera eficiente y facilitar el acceso a los principales componentes del material vegetal (celulosa, hemicelulosa), eventualmente eliminando lignina, se puede preservar la hemicelulosa, se reduce la celulosa cristalina y aumenta la

porosidad del material, facilitando mejor la exposición de estos polisacáridos a la hidrólisis posterior, sea química o enzimática.

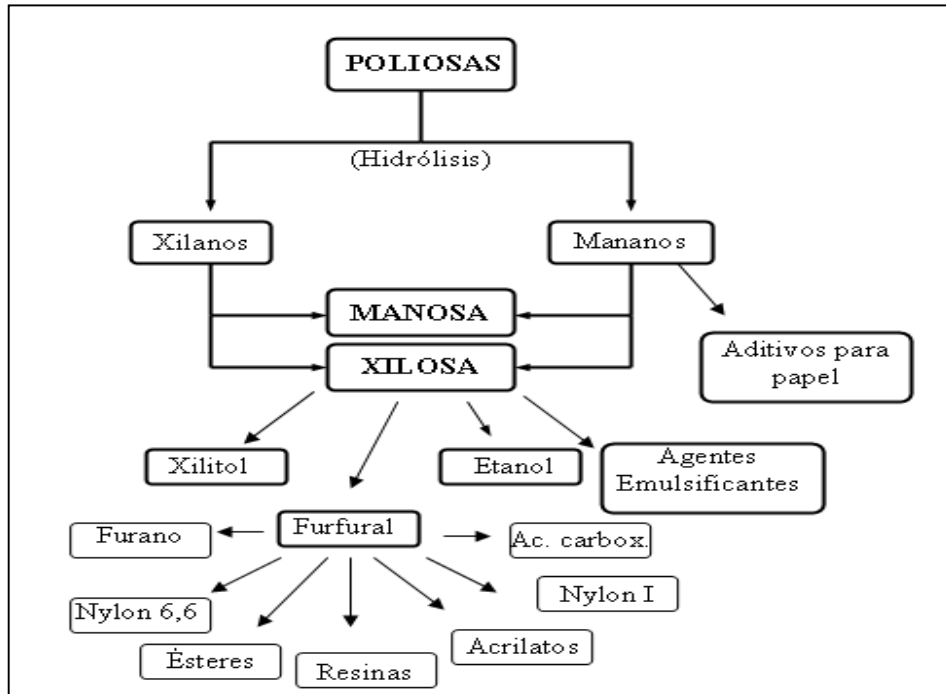


Figura 7. Hidrólisis de pentosas provenientes de la hemicelulosa. Fuente Carballo, *et al.* (1972).

1.1.1.2 Almidón: El almidón es un polisacárido de reserva alimenticia predominante en las plantas, constituido por amilosa y amilopectina. Proporciona el 70-80% de las calorías consumidas por los humanos de todo el mundo. Tanto el almidón como los productos de la hidrólisis del almidón constituyen la mayor parte de los carbohidratos digeribles de la dieta habitual.

El almidón es una mezcla de dos sustancias químicas: amilosa y la amilopectina formadas por unidades de glucosa. En el caso de la amilosa unidas entre ellas por enlaces a α -1,4 lo que da lugar a una cadena lineal. En el caso de la amilopectina, aparecen ramificaciones debidas a enlaces a α -1,6. (Figura 8).

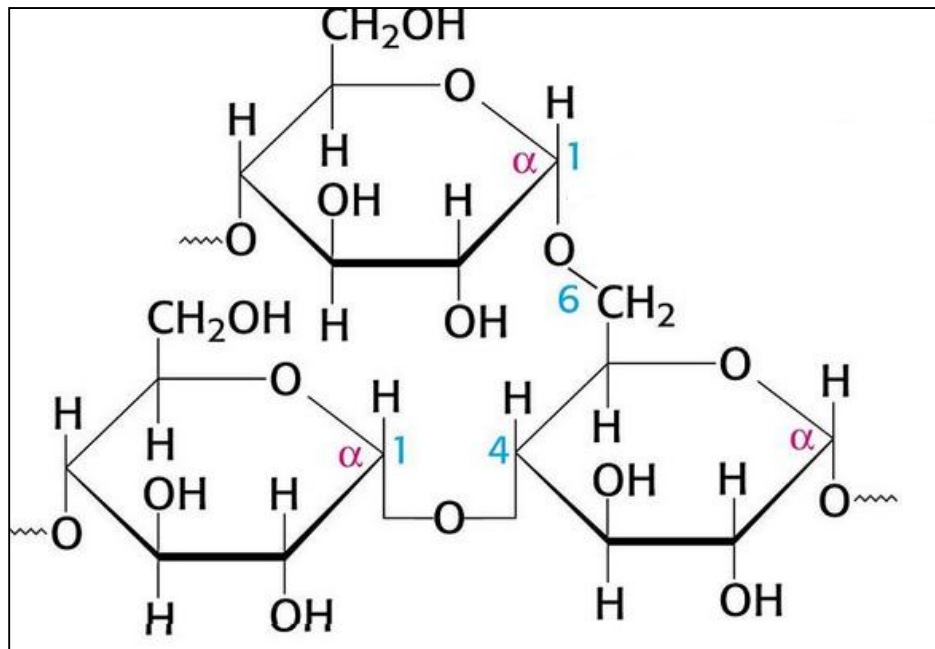


Figura 8. Estructura química del almidón. Fuente Chemicam (2012).

El almidón también hace parte de los residuos de origen vegetal generados de la industria de la papa y tubérculos; Cardona, et al. (2006), han caracterizado residuos vegetales provenientes de plazas de mercado, en donde el almidón fue 10.237 g/100 gramos de residuo seco, al igual que la celulosa, este componente se constituye en el mayor componente de los desechos, lo que justifica su posterior aprovechamiento para la obtención de unidades de glucosa.

De acuerdo con Maldonado, et al. (2013), la hidrólisis ácida del almidón por acción de ácidos (HCl), a 100°C produce una hidrólisis total del almidón y forma glucosa, maltosa e isomaltosa, mientras que la hidrólisis enzimática por acción de la enzima alfa-amilasa, produce una hidrólisis parcial produciendo maltosa, glucosa y dextrina límite, que es una cadena ramificada y para poder romperla se necesita de otra enzima adicional, la α -1,6-glucosidasa. .

En la figura 9, se observa los puntos de rompimiento de los enlaces de las cadenas de amilosa (lineal) y la amilopectina (ramificada) por acción de los ácidos inorgánicos como H_2SO_4 , HCl y H_3PO_4 .

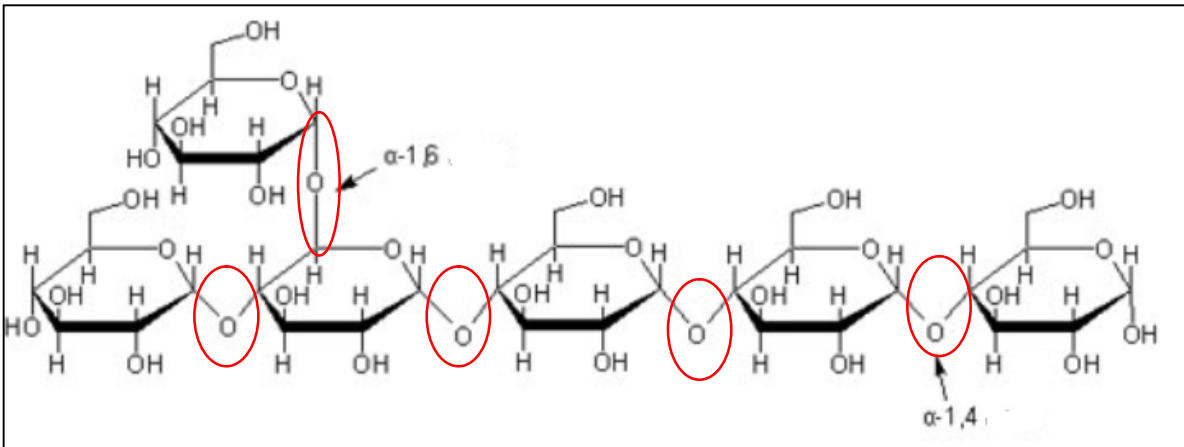


Figura 9. Puntos de hidrólisis del almidón. Fuente Marini, I (2013).

El producto de esta hidrólisis ácida provoca la formación de una mezcla de azúcares de tipo reductores (ejemplo glucosa). Los azúcares reductores poseen un grupo carbonilo libre formando un grupo hemiacetal que le confiere la característica de poder reaccionar con otros compuestos. En solución acuosa, las formas cíclicas hemiacetálicas de los azúcares tiene la potencialidad de generar trazas de la forma abierta (grupos aldehídos libres), por este motivo, en solución acuosa, dicho grupo aldehído libre tiene la capacidad de reducción de agentes oxidantes. Los azúcares con poder reductor pueden ser identificados por técnicas espectrofotométricas como la técnica del ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS). Esta técnica se basa en la reacción de óxido-reducción que se basa en la capacidad de la glucosa para reducir el ácido 3,5- dinitrosalicílico bajo denominadas condiciones; esta reducción produce una coloración que se hace más intensa a medida que aumenta la concentración de azúcares reductores. Se evidencia por medio de la lectura de absorbancia en espectrofotómetro, lo que conlleva a la aplicación de la ley de Beer-Lambert. Esta técnica sirve para cuantificar los azúcares reductores producidos durante una fermentación o para cuantificar los productos de una reacción enzimática

En el presente estudio, los polisacáridos de mayor importancia son los que producen azúcares reductores provenientes de la hidrólisis de la celulosa, hemicelulosa y almidón, ya que son los mejores indicadores de la degradación y conversión del tejido vegetal a azúcares fermentables.

1.2 RESIDUOS VEGETALES GENERADOS DE LA INDUSTRIA DE LA NARANJA Y PAPA

La industria de los cítricos, especialmente la obtención de jugo de naranja es una industria en crecimiento, debido a las propiedades funcionales para la salud humana. Martín, *et al.* (2010), Bicu, *et al.* (2011) y Rezzadori, *et al.* (2012), analizan el contenido de residuos generados de la industria de cítricos, específicamente en la elaboración de zumos y derivados; después de las operaciones de extracción, se obtiene entre 50-60% de residuos constituidos principalmente por cáscara, semillas y membranas. En la actualidad, estos residuos se están vendiendo para la obtención de pectina para la alimentación animal a bajo costo debido a su bajo contenido proteico. Para Rezzadori, *et al.* (2012), la producción de zumo de naranja a nivel industrial genera una cantidad considerable de residuos sólidos y líquidos (alrededor 8-20 millones de toneladas año⁻¹ a nivel mundial); los residuos sólidos continúan siendo utilizados como complemento en la agricultura. Se ha reconocido que el uso potencial de las cáscaras de naranja es la conversión en azúcares fermentables de acuerdo a su alto contenido en pectina, celulosa y hemicelulosa. Cuando se ha hidrolizado en forma enzimática, de las cáscaras de naranja se han extraído glucosa, galactosa, fructosa, arabinosa, xilosa, ramnosa.

La industria de los cítricos seguirá en aumento y en expansión, para el 2010, se esperaba un crecimiento 14 % a nivel global según las estadísticas de la Organización de Alimentación y Agricultura de la Naciones Unidas (FAO/STAT), por lo que los residuos generados en relación a pulpa y piel también está en aumento ocasionando inconvenientes económicos y ambientales para su disposición final que se relacionan con el aumento de problemas ambientales y económicos, tales como altas cargas orgánicas, la falta de zonas

de eliminación disponibles, el aumento de los costos de transporte, etc. Las investigaciones en este campo proponen usar la piel o cáscara de naranja para otros usos como es ser sustratos para inmovilizar células de microorganismo de interés industrial, por ejemplo células de levadura empleadas para proceso de fermentación sumergida. Plessas, *et al.* (2007), Martín, *et al.* (2010) y Tejeda *et al.* (2010), consideran a las cáscara de naranja en un enfoque de biorefinería, actividad que integra la conversión proceso de biomasa para la producción de combustibles, energía eléctrica y productos químicos. Ghorbanpour *et al.* (2012), recomiendan el uso de residuos como la cáscara de la naranja para hacer bioetanol para vehículos, mientras que Bicu, I., *et al.* (2011), recomienda el uso de las cáscaras de naranja desengrasadas y parcialmente libre de pectina (despectinidas), para la obtención de celulosa industrial como material absorbente industrial, por su parte, Rezzadori, *et al.* (2012) presenta las posibles aplicaciones en el consumo humano, en fertilizantes, alimentos para animales, producción de carbón vegetal, la adsorción de compuestos químicos, producción de bio-aceite y en la extracción de aceites esenciales y pectina.

Las anteriores perspectivas de uso de estos residuos ha llevado a la caracterización de los mismos; Rezzadori, *et al.* (2012), presenta la caracterización de los residuos de la industria de zumo de naranja (tabla 1).

Los azúcares solubles presentes en la piel de naranja son: glucosa, fructosa, y sacarosa. Los polisacáridos insolubles de la pared celular de la cáscara de naranja se componen de pectina, celulosa, y hemicelulosa. La pectina y hemicelulosa son ricos en galacturónico ácido, arabinosa y galactosa, y también contienen pequeñas cantidades de xilosa, ramnosa y glucosa. Después de la extracción del jugo de las naranjas, cáscaras, semillas y pulpa generalmente se transforma en salvado en pellets para la alimentación animal.

Tabla No 1. Composición química de los residuos de cáscara de naranja.

Azúcares solubles	16.9 g/100g
celulosa	9,21 g/100 g
hemicelulosa	10.5 g/100 g
pectina	42.5 g/100 g

Fuente: Rezzadori, *et al.*2012

Entre los residuos líquidos derramados en el entorno del residuo conocido como "agua amarilla" es de gran preocupación, ya que tiene un alto contenido de materia orgánica, haciendo de este un agente con un elevado potencial de contaminación. Algunos de los subproductos de la industria de cítricos tienen alto valor comercial y son los aceites esenciales obtenidos de la cáscara de naranja, estos aceites son valiosos como ingredientes en alimentos, bebidas, cosméticos y perfumes, esencias aromáticas, por ejemplo el D-limoneno se utiliza en la producción de tintas y disolventes. El salvado de pulpa de cítrico se emplea en la producción de piensos para animales y la pulpa de naranja es utilizada por las industrias de alimentos y bebidas.

En las figuras 10 y 11, se presenta la caracterización del residuo seco de cáscara de naranjas y caracterización en azúcares reductores. En la figura 12 se presenta la caracterización química de residuos de piel de naranja antes y después de una destilación a vapor.

Contextualizando la revisión bibliográfica sobre las investigaciones de los residuos de cascara de papa, Arapoglou *et al.*(2009), Arapoglou, *et al.*(2010) y Chen, *et al.*(2012), exponen la preocupación por la contaminación ambiental que presenta los residuos de las cáscara o piel de papa provenientes de las industria de este tubérculo en Europa.

	Compuesto	Valor (%)	Método
1	Contenido soluble en agua fría (azúcares simples)	23.6	ASTM D1110-84
2	Contenido Soluble en agua caliente (azúcares, pectina soluble)	52.3*	ASTM D1110-84
3	Pectina soluble	28.7	Por diferencia
4	Proteína	6.62	A partir del contenido de nitrógeno
5	Flavonoides (hesperidina).	5.86	Por precipitación y concentración del extracto frío en agua-alcohol etílico-tolueno.
6	Holocelulosa	27.4	Clonito de sodio
7	celulosa	14.4	Kurschner
8	lignina	1.33	Por diferencia
9	cenizas	2.87	ASTM D1102-84
10	Fracción liposoluble (grasa cruda, aceites esenciales, resinas, colorantes)	5.53	azeotrópico Hexano-triclorometano
11	Fracción soluble en alcohol (azúcares, pectina, flavonoides)	5.16*	azeotrópico Agua- alcohol etílico- tolueno
12	Fracción insoluble en alcohol (homocelulosa, lignina, pectina insoluble, proteína, cenizas)	48.4	Por diferencia.
13	*agua caliente y triple mezcla azeotrópica resultó ser aproximadamente igual en cuanto a su capacidad de extraer los azúcares solubles and pectina		

Figura 10. Composición del residuo seco de cáscara de naranja. Fuente Bicu, *et al.* 2011.

Este residuo tiene un valor cero para las industrias dedicadas a la transformación de papa, pero estos autores exponen en sus investigaciones que a partir de este residuo se puede obtener bioetanol en grandes cantidades, convirtiendo a estos residuos en mercado potencial para la producción de sustratos fermentables. En la industria de la papa, se genera entre el 15-40% de residuos de piel de papa según Arapoglou, et al. (2010) y Carvalho, et al. (2012). El procedimiento de pelado genera aproximadamente 10 toneladas / día, éste residuo rico en almidón, celuloso, hemicelulosa, lignina y azúcares de menor peso molecular, justifica su aplicación y reutilización; por ejemplo Mars, et al. (2010), exponen el uso de cáscara de papa para la obtención de hidrógeno y biocombustibles. Arocha, et al. (2011), Contribuyen a las investigaciones en hidrocoloides presentes en la cáscara de papa y almidón de papa, Chen, et al. (2012) y Zanariah, et al. (2013) presentan el uso de residuos de cáscara de papa como relleno funcional en plásticos con excelentes propiedades mecánicas y de barrera para ser incorporados como material de relleno en plásticos de la línea de empaques de biodegradables. Wijngaard, et al. (2012), en su investigación, describe a las cáscaras de papa como fuente de fibra en

productos horneados y fuente natural de polifenoles como antioxidantes, en donde se encuentran en gran cantidad ya que tiene mecanismo de defensa contra fitopatógenos.

Muestra/ tratamiento	(a) Producción aproximada de azúcares solubles								
	% en peso solidos totales								
	Suc	Glc	Fru	Gal	Ara	Xyl	Rha	Gal A	Total azúcares
Extracto acuoso	2.89 (1.89)*	10.73 (1.03)	8.99 (1.40)	0,199 (0.0075)	0.073 (0,02)	0.044 (0.001)	0	0.30 (0.018)	23.23 (4.41)
Dos etapas hidrólisis ácida	0	22.44 (0.799)	0	3.85 (0.050)	4.69 (0.007)	1.85 (0.148)	0.90 (0.093)	14.08 (0.106)	47.81 (1.20)
Hidrólisis enzimática	0.249 (0.11)	22.77 (2.75)	11.41 (1.73)	3.45 (0.205)	4.50 (0.501)	1.36 (0.243)	1.11 (0.265)	16.86 (2.05)	61.71 (7.76)
(b) Análisis varios									
	Lignina	cenizas	ADF	Celulosa	Proteína				
Piel seca	8.7(0.1) [§] *	4.35 (0.05)	21.8 (0.4)	9.91 (0.14)	6.06 (0.19)				
* Los números entre paréntesis representan a las desviaciones estándar. § determinado en cáscaras originales. ‡ determinada por el procedimiento de fibra en detergente ácido.									

Figura 11. Azúcares reductores presentes en cáscara de naranja. Fuente Grohmann, H., *et al.* (1995).

Un estudio de gran interés y que dio inició a otras investigaciones lo presentó Mahmood, *et al.* (1998), al estudiar en conjunto los residuos de cáscara de naranja y papa para la obtención de enzimas extracelulares con fines industriales. Las anteriores investigaciones han determinado la riqueza química de estos residuos (figura 13).

Composición Química de la piel de naranja antes y después de destilación al vapor (los valores = significan la desviación estándar).			
	Parámetro	Residuo Piel de naranja	Pre-tratamiento piel de naranja
Base Húmeda	pH	3.42 ± 0.02	3.41±0.03
	VA (mg ácido acético Kg suspensión acuosa).	1950 ±27	220 ±12
	Alcalinidad (mg CaCO ₃ Kg suspensión acuosa).	Bajo rango (pH < 4.5)	Bajo rango (pH < 4.5)
	Humedad (%)	79.83 ± 0.08	91.13 ± 0.01
	TS (%)	201.7±0.08	3.85±0.01
	MS (%)	0.87 ± 0.03	0.26±0.03
	VS (%)	19.31 ±0.11	3.58±0.05
Base Seca	MS (%)	4.31±0.15	2.95±0.57
	VS (%)	93.74±0.33	96.95±0.37
	OOD (mg O ₂ g)	1085±55	117±46
	Total N (mg N g)	12.24±0.56	11.14±0.04
	Kjeldahl N (mg N g)	11.67±0.24	9.66±0.56
	N amoniacal (mg N g)	1.63±0.19	1.83±0.20
	Total Proteína (mg P g)	1.13±0.03	2.37±0.03
	Cu (mg Kg)	Bajo rango	13.3 ±1.4
	Cr (mg Kg)	1.6±0.7	3.0±0.1
	Ni (mg Kg)	6.1±1.3	6.2±0.3
	Cd (mg Kg)	4.9±0.8	5.8±1.0
	Pb (mg Kg)	Bajo rango	3.7±1.3
	Zn (mg Kg)	4.5±0.4	12.4 ± 1.1

Figura 12. Composición residuos cáscara de naranja luego de una destilación a vapor.

Fuente Martín, *et al.* (2010).

Dentro de las investigaciones de la composición química de estos residuos, Rezzadori, *et al.* (2009), presentan un análisis detallado de la composición química de la papa y cáscara. De acuerdo a la variedad, se ha establecido que pueden contener sustancias, como glucoalcaloides y alcaloides (calistegina) que no exhiben toxicidad en organismos sanos ya que no se absorben. Dentro de este estudio, se ha dado valor agregado a las cáscaras de papa, al centrarse que poseen antioxidantes de beneficio para la salud más que la parte comestible del tubérculo. En esta investigación, presentan a las antocianinas como sustancias, que además de poseer actividad antioxidante, pueden ser usados en varios campos de la química farmacéutica y alimentaria reemplazando colorantes sintéticos por colorantes orgánicos provenientes de cáscara de papa con pigmentos rojos y púrpuras, además, estos residuos exhiben propiedades de estabilizantes en sistema alimentarios.

Parámetro	Peso Seco (%)
Humedad (%)	85.06
Carbohidratos totales	68.7
Azúcares solubles totales	1
Azúcares reductores	0.61
Almidón	52.14
Nitrógeno	1.3
Proteína (N _{total} 6.25 ^a)	8
grasa	2.6
Cenizas	6.34
^a la lignina no fue estimada.	

Figura 13. Composición residuos de papa. Fuente Arapoglou, *et al.* (2010).

1.3 HIDROLISIS DE POLISACÁRIDOS

1.3.1 Hidrólisis enzimática

Es de conocimiento global que la hidrólisis enzimática frente a una hidrólisis química presenta mejores ventajas técnicas en el trabajo de laboratorio, pero eleva los costos de producción; para aplicar esta técnica se requiere de biorreactores que proporcionan las condiciones óptimas de crecimiento, cantidad de nutrientes y mezcla de enzimas para la hidrólisis de enlaces específicos, tal como se evidencia en la investigación de Patrik, *et al.* (2012) y Grohmann, *et al.* (1995), en donde se requiere cantidad de celulasas, glicosidasas y pectinasas, para hidrolizar los polisacáridos presentes en cáscara de naranja para dar fructosa, galactosa, xilosa, arabinosa, glucosa, siendo aproximadamente el 50% de monosacáridos obtenidos, resultado menor del que se puede obtener por hidrólisis química. Arapoglou, *et al.* (2010), presenta una situación similar para la hidrólisis del almidón vía enzimática, donde tiene que emplear varias enzimas tipo alfa-amilasa termoresistentes, celulasas y enzimas desramificante tipo dextrinas, lo que también

conduce a aumentar el costo de producción. Pero a pesar de esto, la hidrólisis enzimática de almidón es actualmente el método preferido en el uso industrial con rendimientos altos de hidrólisis y condiciones suaves, a pesar de que se incurra en gastos de producción, Orozco, *et al.* (2012).

1.3.2 Hidrólisis química

En el proceso de hidrólisis ácida se emplea por lo general ácido sulfúrico y ácido clorhídrico en concentraciones de 1-10% utilizando una temperatura moderada (en el intervalo de 100-150 ° C); las etapas necesarias para llevar a cabo la hidrólisis química, se observa en la figura 14.

Varios autores recomiendan la hidrólisis química como la manera de convertir los polisacáridos de celulosa y hemicelulosa en monosacáridos tipo glucosa, Grohmann, *et al.* (1995) y Binder, *et al.* (2010), al trataron residuos con altos contenidos de celulosa de maíz; con una solución ácida de HCl se obtiene el 90% de glucosa. La hidrólisis ácida es recomendada por varios autores como la técnica para poder acceder a los polímeros de celulosa y hemicelulosa, los cuales están protegidos por la fuerte estructura de la pared celular, al hidrolizar enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares que protegen a los enlaces glucosídicos de celulosa y hemicelulosa. Esta hidrólisis en condiciones controladas puede ofrecer mejores resultados que una hidrólisis enzimática, ya que esta última puede elevar los costos de producción, producir contaminación y por ende bajas tasas de azúcares fermentables. Una hidrólisis con H₂SO₄ del 70-77% conduce a destruir el 90% de los enlaces de la pared celular seguida de una adición de H₂SO₄ (20-30%) para la liberación de azúcares fermentables de la celulosa. Con este procedimiento se

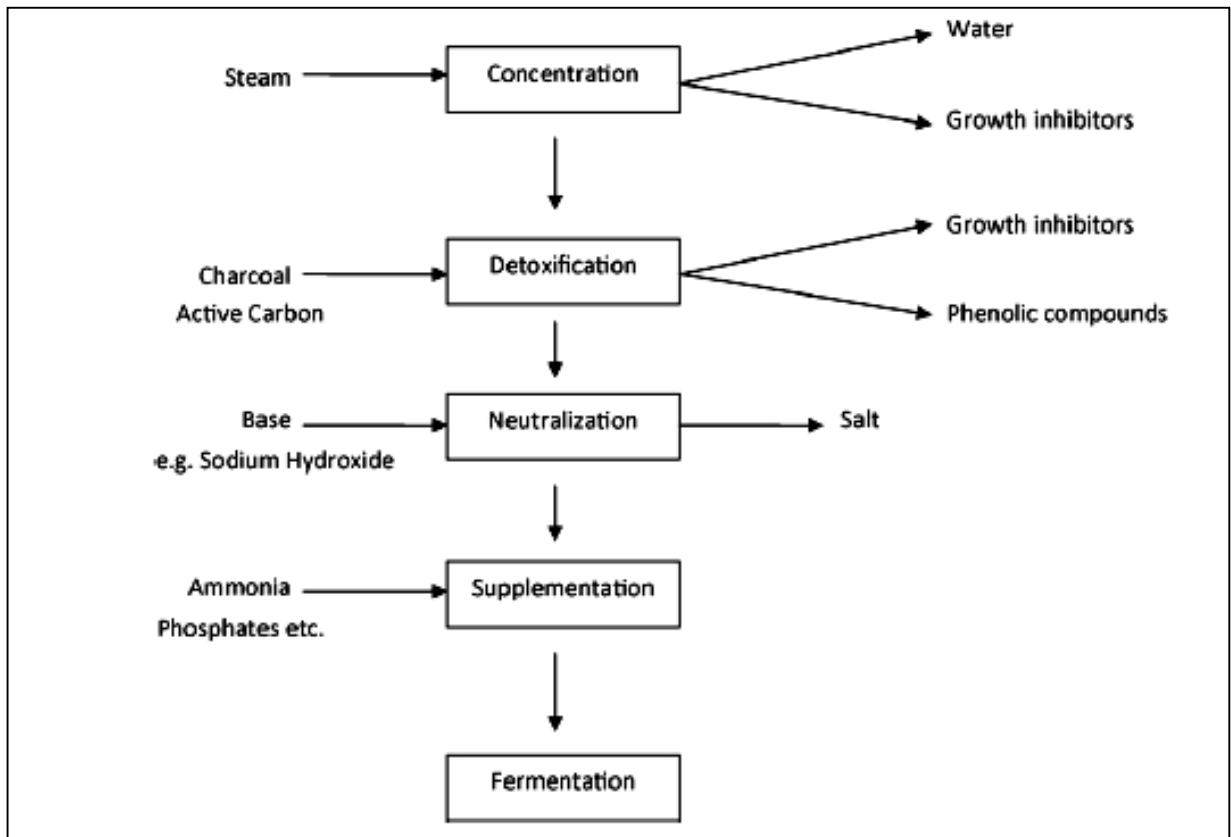


Figura 14. Etapas posteriores requeridas después de la hidrólisis y antes de una inoculación biológica. Fuente Lenihan, *et al.* (2010).

logra en un 90% la formación de azúcares fermentables, pero, Zhou *et al.* (2011) recomienda usar concentraciones de H_2SO_4 más diluidas, ya que de este modo presenta la ventaja de no requerir la recuperación posterior del exceso de ácido, pero la cantidad de azúcares fermentables baja en un 70%. Grohmann, *et al.* (1995), describieron la eficiencia de la hidrólisis al usar H_2SO_4 diluido (0,05 - 0,06%) a 100, 120 y 140 a 20 minutos en la cual se obtuvo una gran cantidad de azúcares de bajo peso molecular provenientes de la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa de cáscara de naranja. Lenihan, *et al.*, (2010), exponen que la hidrólisis química no controlada, puede llegar a degradar los azúcares obtenidos a furfurales y otros productos (ácido acético, furfurales, Hidroximetilfurfural, HMF); estas reacciones secundarias no sólo disminuyen el rendimiento de monosacáridos deseados, sino que producen también toxinas que reducen la idoneidad de estos hidrolizado para posteriores conversiones biológicas. El grado de

hidrólisis catalizada por ácido tiene que ser cuidadosamente monitoreados para optimizar la despolimerización de los polisacáridos y reducir al mínimo la descomposición de los resultantes azúcares.

El producto de la hidrólisis química o enzimática debe ser recuperado y analizado por diferentes técnicas de separación como la cromatografía de intercambio iónico, Binder, *et al.* (2010), por cromatografía de alta resolución, HPLC, Gámez *et al.* (2006) y cromatografía de gases, Kang, *et al.* (2012).

La hidrólisis química con HCl y H₂SO₄ aunque presenta altos rendimiento de hidrólisis, trae consigo inconvenientes como es el de manipular ácidos concentrados, la complejidad de reciclarlos y la descontaminación de los hidrolizados han limitado la adopción de esta tecnología, por lo que las investigaciones de los últimos años ha llevado a evaluar otras técnicas de hidrólisis química como el uso de líquidos iónicos acuosos a altas temperaturas (105°C) y derivatización química, Binder, *et al.* (2010), hidrólisis química moderada con H₃PO₄ a 122°C/300 minutos, Gámez, *et al.* (2006). Otra alternativa la presenta Lenihan, *et al.* (2010) al recomendar una hidrólisis de biomasa vegetales con agua subcrítica (agua caliente a presión), proceso eficiente para la recuperación de productos químicos útiles a partir de los desechos de biomasa; es método renovable, sostenible, eficiente y seguro para el medio ambiente. Zhu, *et al.* (2011), también presenta a la hidrólisis química con HCl al 2% pero en combinación con el MgCl₂ al 2.5%, expone que la glucosa obtenida de la biomasa de algas unicelulares es del 83%. Zhou N, *et al.* (2011), analiza que al combinar la hidrólisis enzimática con pretratamientos termoquímicos (altas temperaturas, cortos tiempos y H₂SO₄ diluido), da mejores resultados de obtención de azúcares fermentables (75-95%), evitando así los inconvenientes técnicos y peligrosidad que se tiene cuando se realiza una hidrólisis ácida H₂SO₄ al 70-77%. Orozco, *et al.* (2012), recomiendan una hidrólisis térmica con dióxido de carbono para reducir los inconvenientes de la hidrólisis ácida y enzimática y Wang, *et al.* (2012) presentan el uso de catalizadores de sílice en combinación de tiempo y temperaturas para la hidrólisis total de celulosa sin usar ácidos ni enzimas.

1.4 PRODUCCION DE PROTEINA UNICELULAR (SCP)

La preocupación por la alta contaminación que causa los desechos de origen vegetal en la agroindustrial ha sido tema de varias décadas y para mitigar el impacto, se tiene un gran número de trabajos de investigación que proponen alternativas y tecnologías para eliminarlos de una forma provechosa al utilizar la riqueza química de la composición de estos residuos para el crecimiento de microorganismo y así reducirlos hasta otros compuestos que pueden ser útiles en otros sectores industriales, por ejemplo Chanda, et al. (1996) propuso usar residuos de vegetales presentes en aguas residuales con altos contenidos de DQO y DBO para estimular el crecimiento de levaduras como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y reducir la carga microbiana produciendo SCP (proteína unicelular). Silva., et al. (2011), han trabajado con residuos de industrias licoreras y de bioetanol en la producción de SCP para alimentación animal, Heerden, et al. (2002), realizaron estudios para comprobar la efectividad de los residuos de cítricos en la formación de compostaje con altos contenido en minerales a partir de inoculación microbiana. Investigaciones más recientes, conducen a utilizar la composición química de los residuos orgánicos vegetales en la producción de biomasa ricas en energía, es el caso concreto de la producción de células de combustible microbianas (MFC's) según lo reporta Pant, et al. (2010). Otra opción es usar el metabolismo de algunos hongos para la producción de aceites únicos celulares (SCO) como materia prima para la producción de combustibles como el biodisel, investigación en fase de experimentación, según lo argumenta Huang, et al. (2013) y Zhan, et al. (2012).

Cuando se usa los residuos vegetales orgánicos como sustratos fermentables, se obtiene una gran cantidad de metabolitos de interés agroindustrial, que conduce a pensar en la puesta en marcha de procesos a gran escala; la producción de proteína unicelular es la línea de investigación que durante dos décadas viene siendo tema central de trabajos de investigación, tal como lo analizó en su momento Ravindra (2000), en donde expuso que la producción de proteína unicelular conocida como SCP a partir de desechos orgánicos agroindustriales ricos en celulosa y almidón son los mejores sustratos, pero además, se

está induciendo a la producción de SCP con énfasis a la alimentación animal y humana, disminuyendo de esta forma los problemas de alimentación por la carencia de alimentos ricos en proteínas.

Se define a la proteína unicelular (SCP sus siglas en inglés single cell protein) como la proteína extraída de la biomasa microbiana, de acuerdo con Ravindra, A. (2000), además de esto, expone el proceso de producción mediante fermentación en estado sumergido o sólido. Después de la fermentación, la biomasa se aísla y se puede someter a etapas de procesamiento de purificación y extracción de proteínas. Según Chalon, et al. (2013), el término "proteína unicelular" (SCP) se refiere a la biomasa microbiana que se utiliza como aditivo alimenticio la cual tiene un alto valor nutricional a causa de su alto contenido de vitaminas, lípidos, y proteínas de alta calidad biológica (la presencia de todos los aminoácidos esenciales: lisina, triptófano, treonina, y también metionina y cisteína). Para Chacón, A. (2004), define a la SCP, a aquella obtenida de la biomasa microbiana de algas, bacterias, levaduras y hongos filamentosos, cultivados en condiciones fermentativas apropiadas y controladas que garanticen una adecuada tasa de crecimiento por medio del aprovechamiento de sustratos de bajo costo y compuestos o enriquecidos con carbono, nitrógeno y fósforo.

De acuerdo con Ravindra, A. (2000), muchas especies de hongos se utilizan como productores de este tipo de proteínas, los más populares son las levaduras, especies como *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*, *Torulopsis* y *Saccharomyces*, (figura 15). Estas levaduras llegan a producir hasta 60% de proteína y un elevado número de aminoácidos esenciales (figura 16). En otras investigaciones, se han empleado levaduras de tipo *Saccharomyces Cerevisiae* para la producción de etanol a partir de pulpa de almidón de papa dando excelentes resultados de acuerdo con Gao, *Et al.* (2012).

Sustrato	Géneros
CO ₂	<i>Spirulina, Scenedesmus, Chlorella.</i>
Celulósicos	<i>Actynomucor, Aspergillus, Bacillus, Brevibacterium, Cellulosomas, Chaetomium, dactylomyces, Gliocidium, Myrothecium, Penicillum, Pleurotus, Phanerochaete, Polyporus, Pseudomonas, Rhizoctonia, Ruminococcus, Sporotrichum, Thermococcus, Trichoderma, Endomycopsis.</i>
Azúcares	<i>Aureobasidium, Candida, Fusarium, Geotrichum, Pachysolen, Paecilomyces, Pichia, Rhodotorula, Torula, Torulopsis, Saccharomyces, Kluyveromyces fragilis, Scytadilium, Endomycopsis</i>
Hidrocarburos	<i>Methylomonas, Methanomonas, Hydrogenomonas</i>

Figura 15. Microorganismos más importantes en la producción de SCP. Fuente Chacón, A (2004).

Los microorganismos útiles para la producción de proteínas celulares (proteína unicelular; SCP) debe tener las siguientes propiedades: crecimiento rápido, pocas necesidades nutricionales, un sistema de fácil procesamiento, no patógenos, no tóxicos, bajos niveles de ácidos nucleicos; por lo tanto, las levaduras (como la *Saccharomyces Cerevisiae*) son los microorganismos más empleadas para este fin. Según Chalon, et al. (2013); Chacón, A. (2004), exponen las condiciones que deben considerarse a la hora de la selección de los microorganismos que pueden ser usados para la producción de SCP, la cual depende del sustrato, el proceso y la misma calidad deseada de la biomasa. La bioseguridad, la disponibilidad técnica y la estabilidad biológica son aspectos a tener en cuenta para la selección de determinada fuente de SCP.

Composition of SCP from the representative types			
Component	Percentage composition of weight		
	Algae	Fungi	Bacteria
True proteins	40–60 ^a	30–70 ^a	50–83 ^a
Total nitrogen (Protein + nucleic acids)	45–65 ^a	35–50 ^a	60–80 ^a
Lysine	4.6–7.0 ^a	6.5–7.8 ^a	4.3–5.8 ^a
Methionine	1.4–2.6 ^a	1.5–1.8 ^a	2.2–3.0 ^a
Fats/Lipids	5–10 ^a	5–13 ^a	8–10 ^a
Carbohydrate	9	NA	NA
Bile pigment and Chlorophyll	6	NA	NA
Nucleic acids	4–6 ^a	9.70	15–16 ^a
Mineral salts	7	6.6	8.6
Amino acids	NA	54	65
Ash	3	NA	NA
Moisture	6.0	4.5–6.0 ^a	2.8
Fiber	3	NA	NA

Figura 16. Perfil de aminoácidos para la SCP. Fuente Ravindra, A. (2000).

El metabolismo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* produce altos porcentajes de proteína, por ejemplo Chanda, *et al.* (1996) reporta el 45.6% sobre desechos de vegetales de rábano y coliflor, Choi, *et al.* (2002) en residuos de repollo y coles reporta el 35%, Stabnikova, *et al.* (2005) afirma que cuando la levadura crece en mezclas de sustratos de vegetales enriquecidos con selenio produce 49% de y sobre residuos de frutas (como el melón) produce el 44%, Gélinas, *et al.* (2007), analizó la capacidad de producción de proteína en un medio enriquecido con glucosa, dando el 42% en 8.3 horas de fermentación, Silva., *et al.* (2011), el 56.25% sobre desechos de vinazas de industrias licoreras y Chalon, *et al.* (2013), afirma que la producción de SCP partir de residuos orgánicos de alimentos se puede elaborar, a bajo costo, en cualquier parte del mundo, no requiere alta tecnología ya que sus ingredientes son los desechos generados por los seres humanos.

En la producción de SCP es importante la calidad proteica en relación al perfil de aminoácidos esenciales y al contenido en nitrógeno proteico. Por lo tanto, antes de su utilización en la alimentación animal y humana debe hacerse un análisis en estos parámetros, Ravindra, A. (2000) y procesos de desintoxicación. La calidad de una proteína, no solamente depende del perfil de aminoácidos; aspectos tan importantes como la digestibilidad, el valor biológico, la utilización de proteína y el coeficiente de eficacia proteína denominada PER deben tomarse en cuenta, Chacón, A (2004). En la

figura 17, se presenta los valores de digestibilidad, utilización neta de proteína y valor biológico de diferentes fuentes de proteína unicelular.

De acuerdo con Chacón, A (2004), el uso de la proteína unicelular en piensos es el uso más inmediato y menos tecnificado. Generalmente implica un secado de la biomasa previamente a la ingesta. En el caso del consumo por parte de humanos, el proceso es dispendioso, implicando no sólo la remoción de riesgos nutricionales (presencia de sustancias tóxicas o antinutricionales) como un exceso de ácidos nucleicos, sino también el garantizar la calidad y seguridad del producto. Este último autor analiza que la SCP tiene aplicaciones en el campo de la salud, como por ejemplo, ser nutriente de control inmunitario en pacientes quirúrgicos con hipoproteïnemia.

Aspecto nutricional	Hongos filamentosos	Algas	Levaduras	Bacterias
Valor biológico (BV)	70-75	54-72	32-88	70-78
Utilización Neta de Proteína (NTU)	—	35-60	64-82	47-64
Digestibilidad (D)	—	65-84	71-90	67-84

Figura 17. Parámetros nutricionales de la SCP. Fuente Chacón, A (2004).

Varios autores, como Chacón, A (2004), presentan las ventajas y desventajas que tiene la SCP:

Entre las ventajas, puede mencionarse brevemente: requerimientos de crecimiento fáciles de implementar y que originan rápidas tasas de crecimiento y alta productividad; las bacterias presentan una eficiencia de alimentación (gramos de proteína producida por Kg de alimentos consumido) un millón de veces más alta que en cerdos o reses (para obtener 1 Kg de células de levadura se emplea alrededor de 2Kg de glucosa contra los 18 Kg de cereales necesarios para obtener 1 Kg de carne de res). Las SCP puede hacerse crecer en sustratos baratos; las instalaciones de producción suelen tener áreas reducidas y

son muy eficientes; la SCP posee un elevado contenido de vitaminas y proteína de apreciable valor nutricional (entre 44% a 88% de proteína en peso seco y hasta un 15% de ácidos nucleicos en base seco). En otros estudios se ha demostrado la eficiencia en la producción de leche, la cual aumenta cuando cabras han sido alimentadas con SCP.

Dentro de las desventajas se tiene: culturalmente, este SCP es rechazado por la sociedad, rechazan la idea de alimentarse de microorganismos, a pesar que desde siglos la humanidad lo viene haciendo al consumir productos lácteos fermentados. La SCP no tiene características organolépticas adecuadas; la SCP posee sustancias tóxicas o carcinogénicas en el organismo humano; la SCP tiene un alto contenido de ácidos nucleicos (4-6% en algas, 10-16% en bacterias, 6-10% en levadura y 2,5-6% en hongos), podrían eventualmente representar riesgos para la salud de algunos monogástricos. La digestión lenta o nula de la pared celular en el tracto digestivo humano y otros animales, especialmente en cuanto a las algas puede ser causa de indigestión y reacciones alérgicas.

Hasta el momento, se ha analizado que los sustratos para SCP pueden ser los residuos orgánicos vegetales, pero Chacón, A (2004), presenta que también se pueden usar los hidrocarburos y combustibles (n-alcános como la parafina) y la proteína generada de estos sustratos se conoce como “toprina”; también se obtiene SCP del metano a partir de bacterias que oxidan este gas, las cuales se conocen como “metilóforos obligados”; el metanol también es un sustrato empleado para la producción SCP al igual que el etanol: los residuos industriales también son sustratos como aguas residuales de industriales como de papel, procesamiento de alimentos, grasas, gases de desecho industrial, melazas de la industria azucarera, vinazas de la industria licorera, hidrolizados de cuernos y pezuñas, excretas de animales de granja, .

1.4.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae es la especie de levaduras utilizada por excelencia para la obtención de proteína Unicelular (SCP) y etanol a nivel industrial, debido a que es un microorganismo de fácil manipulación y recuperación, no es exigente en cuanto a su cultivo, no presentan alto costo, tolera altas concentraciones de etanol, en la fermentación produce bajo niveles de subproductos, es osmotolerante, capaz de utilizar altas concentraciones de azúcares.

Las levaduras son organismo eucarióticos unicelulares, por lo tanto sus estructuras se encuentran formadas por paredes celular, núcleo diferenciado y organelos, como ribosomas y mitocondrias. La formación de una cápsula de polisacáridos, la ausencia o presencia de vacuolas y el desarrollo de las mitocondrias depende de las condiciones físicas y de la edad del cultivo. Las características generales de las levaduras se presentan en la tabla 2.

Tabla No 2. Características generales de las levaduras

Características	Levaduras
Dimensiones (micras)	4-8
Tiempo de duplicación (h)	1-3
pH (rango óptimo)	4,5-5,5
Nitrógeno (%)	7,5-8,5
Proteína (%)	35-45
Ácidos Nucleicos (%)	6-12
Carbohidratos	30-45

Fuente: Fajardo, *et al.* (2007).

Las levaduras contienen un 75% de agua y un 25% de materia seca aproximadamente. La composición de la materia seca de la levadura se presenta en la tabla 3.

Tabla No 3. Composición de la materia seca de la levadura

Componentes	Porcentaje (%)
Ceniza	7
Carbohidratos	43
Proteína	48
Grasa	3

Fuente. Fajardo, *et al.*, (2007).

Las sustancias minerales de las levaduras representan por lo general un 5-9% del peso seco. Los componentes principales son ácido fosfórico, alrededor del 50% y potasio del 30%.

Las sustancias nitrogenadas de la levadura representan unas dos terceras partes de su peso seco (30- 75%), contiene entre 5 y 12% de nitrógeno. Estas sustancias se reparten en un 64% de proteína, 10% de peptonas y aminoácidos. 8% de amonio, 10% de purina y el resto consiste en pirimidina y vitaminas. El contenido normal de aminoácidos depende de la alimentación, de la cantidad de oxígeno, de la temperatura del cultivo, Fajardo, *et al.* (2007).

Saccharomyces cerevisiae es una levadura cuya colonia es de color crema o blanco, apariencia húmeda y brillante, de bordes irregulares (figura 18). La temperatura óptima de crecimiento es de 25 a 30°C. El nombre de *Saccharomyces cerevisiae* significa azúcar de hongos, producen una fermentación vigorosa y es conocida como la levadura de la cerveza, sirve como fuente de enzimas (invertasa), como extracto de levadura autolisado para sustituir los sabores naturales de extracto de carne, hace fermentar la

masa del pan, interviene en la fabricación del vino y como fuente de proteína, vacunas, ácidos grasos y aceites.



Figura 18. Crecimiento macroscópico de *Saccharomyces cerevisiae*. Fuente: www.uwyo.edu

Saccharomyces cerevisiae requiere ciertos nutrientes y condiciones ambientales para su propio crecimiento y reproducción. Algunos elementos son básicamente necesarios como por ejemplo carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y fósforo. El crecimiento se favorece a pH entre 4.0-5.0 y no se desarrollan bien en medios alcalinos a menos que se hayan adaptado al mismo, Fajardo, *et al.* (2007).

2. METODOLOGIA

Los procedimientos experimentales se llevaron a cabo en los laboratorios de química y biología de la Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD, CEAD Duitama.

2.1 MATERIALES

2.1.1 Materias primas para la obtención de sustratos fermentables: Se obtuvieron de manera comercial, directamente de la fuente de origen: Las cáscaras de naranja (*Citrus sinensis L var valencia*), se tomaron al azar de un punto de venta de jugos en la vía pública en la Ciudad de Duitama (Boyacá), entre las 6 a.m -8:00 a.m durante dos días. Luego de la recolección, se llevaron de forma inmediata al laboratorio donde se procedió a la selección y adecuación (figura 19); se congelaron en bolsas ziploc de un 1 gk.



Figura 19. Materia prima, selección, adecuación y conservación.

Las cáscaras de papa (*Solanum tuberosum*), variedad Diacol Capiro (R-12), se obtuvieron directamente de la fábrica de productos Fritos “La libertad “de la ciudad de Duitama (Boyacá), inmediatamente después del pelado por abrasión de los tubérculos. En el

laboratorio se procedió a la selección y adecuación (figura 19); se congelaron en bolsas ziploc de un 1 gk.

2.1.2 Microorganismo: La cepa utilizada para la fermentación y obtención de biomasa fue obtenida en un supermercado de la Ciudad de Duitama (Boyacá), con la siguiente especificación comercial “Levadura Seca Activa, *Saccharomyces Cerevisiae*”, en el anexo 1, se presenta la ficha técnica del producto.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Combinaciones porcentuales: La materia prima fue deshidratada a una temperatura de $110^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por un periodo de 20 horas. Las muestras fueron trituradas en un molino convencional y luego se realizaron las siguientes combinaciones porcentuales cada una con cuatro replicas, (figura 20):

N100= Cáscara de naranja al 100%

P100= Cáscara de papa al 100%

N25P75=Cáscara de naranja al 25% y papa al 75%

N50P50= Cáscara de naranja al 50% y papa al 50%

N75P25= Cáscara de naranja al 75% y papa al 25%

2.2.2 Caracterización de la materia prima: Para cada combinación, se realizó la caracterización química en cuanto a:



Figura 20. Combinaciones porcentuales de cáscaras de naranja y papa deshidratadas.

Porcentaje de humedad: expresado como %H en base húmeda (%H bh) y %H en base seca (%Hbs): método AOAC 1990/964.22.

Porcentaje materia seca: expresado como % MS: método AOAC 1990/924.22.

Porcentaje de grasa: expresado como % extracto etéreo: método Soxhlet AOAC 1990/920.39.

Porcentaje de almidón: (gramos/ 100 gramos de residuo seco): Método Von Asboth, de acuerdo a Quintero, J., (2008).

Porcentaje de celulosa: (gramos/ 100 gramos de residuo seco), de acuerdo a Mussatto *et al.* (2006).

Porcentaje de azúcares reductores (gramos/100 gramos de residuo seco): método Miller, (1959) y recomendaciones de Zor, *et al.* (1996) y Wood, *et al.* (2012).

pH: método pHmetro.

En el anexo 2, se presenta los protocolos de laboratorio para cada determinación y en la figura 21, se presenta el correspondiente el registro fotográfico.

2.2.3 Hidrólisis química de la materia prima: A las combinaciones porcentuales se les realizó un pretratamiento químico, con el objeto de hidrolizar los polisacáridos como el almidón proveniente de las cáscaras de papa (*Solanum tuberosum*) variedad diacol Capiro R-12 y cáscaras de naranja (*Citrus sinensis L var valencia*), siguiendo la metodología de Monsalve, *et al* (2006) y lo recomendado por Sun, *et al.*, (2002), hasta azúcares fermentables y así poder ser degradados fácilmente por la levadura *Saccharomyces Cerevisiae*. El procedimiento se desarrolló con cuatro replicas para cada combinación porcentual. En el anexo 3, se presenta el protocolo aplicado.

De acuerdo al protocolo, para las combinaciones N100, N25P75 y N75P25, se realizó varias etapas de hidrólisis básica (sumergir totalmente la muestra con NaOH 0.1N, 15 minutos luego, adición de sulfato de calcio por tres horas), para la eliminación de lignina de las cáscaras de naranja; la combinación P100 no se le realizó este procedimiento. La

hidrólisis de la celulosa, se llevó a cabo mediante hidrólisis ácida (por cada 100 gramos de residuos se adicionó 50 ml de H_2SO_4 a $125^\circ C$ por 15 minutos), la hidrólisis del almidón se llevó a cabo en los tratamientos P100, N25P75 y N75P25(Adición de H_2SO_4 diluida 20%) llevar a baño María a $94^\circ C$ por 6 horas con agitación constante; la combinación N100 no se le realizó este procedimiento.

Antes de los procesos de fermentación se llevó a cabo la purificación de los mismos mediante filtración carbón activado, esto con el fin de eliminar impurezas que puedan inhibir el crecimiento de la levadura, para esto cada sustrato se mezclaron con carbón activado a $30^\circ C$. Posteriormente se sometieron a filtración con una bomba de vacío y se guardaron en refrigeración en frascos de vidrio con tapa.

2.2.4. Fermentación: El tipo de fermentación discontinúa o en batch de acuerdo con Ortiz, 2012.

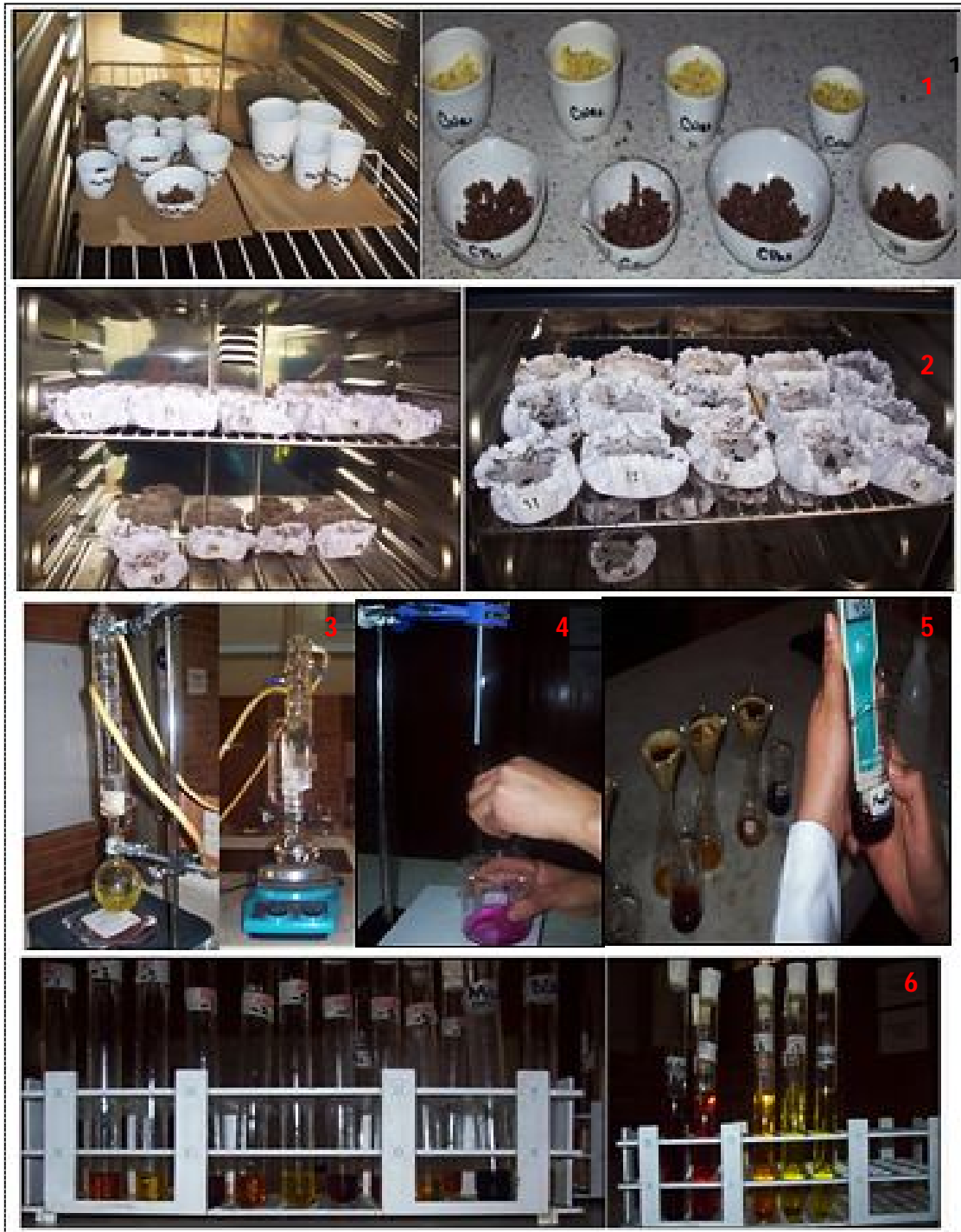


Figura 21. Caracterización Química de la materia prima: (1) Determinación Húmeda (%H bh y %Hbs) y materia seca (%MS). (2) Determinación de celulosa. (3) Extracción de grasa método Soxhlet (4) Determinación de almidón. (5) Determinación de pH. (6) Determinación azúcares reductores método DNS.

2.2.4.1 Adaptación del microorganismo y medio de cultivo: Este ensayo se llevó a cabo para adaptar la levadura a los diferentes sustratos. Previamente se realizó el proceso de activación de la levadura con el siguiente procedimiento: se prepararon 100 ml de caldo nutritivo, se esterilizó y se adicionó 0,5 gramos Levadura Seca Activa, *Saccharomyces Cerevisiae*. Se dejó en agitación mecánica por 24 horas a una temperatura de 32°C.



Figura 22. Procedimiento hidrólisis química de la celulosa y almidón de las cáscaras de naranja y papa.

Se tomaron 10 ml de cada una de los hidrolizados (N100, P100, N25P75, N50P50, N75P25), se les ajustó pH a 4.5 con buffer fosfato y se procedió a la adición de los siguientes nutrientes, según Diaz, *et al.* (2003): sulfato de amonio 1g/L, urea 1 g/L, extracto de malta 1g/L. Se ajustó nuevamente pH a 4.5. Se esterilizó y se inoculó con 1 ml de levadura activa, en condiciones de asepsia. Se dejaron en agitación mecánica por 24 horas a una temperatura de 32°C. Se verificó el crecimiento por la turbidez del medio y las observaciones microscópicas del microorganismo, verificando así la viabilidad de crecimiento en cada uno de los hidrolizados. El procedimiento se realizó por triplicado para cada hidrolizado (figura 23).



Figura 23. Inoculación del microorganismo en las combinaciones porcentuales de los hidrolizados.

2.2.4.2 Pie de cuba: Es necesario que antes de la fermentación aeróbica se realice un pie de cuba para adaptar la levadura al medio, Diaz, *et al.* (2003); para esto se tomaron 150 ml de cada una de los sustratos hidrolizados (N100, P100, N25P75, N50P50, N75P25), se les adicionó para cada uno de los nutrientes: sulfato de amonio 1g/L, urea 1 g/L, extracto de malta 1g/L. Se ajustó nuevamente pH a 4.5 con buffer fosfato. Luego se repartieron en porciones así: 75% del volumen del hidrolizado en un erlenmeyer de 250 ml y 25 % del volumen del hidrolizado en un erlenmeyer de 150 ml, esto con el fin de poseer mayor espacio para el crecimiento y mayor cantidad de oxígeno disuelto. Posteriormente se esterilizó cada recipiente con tapón de gaza. Se inocularon con 1 ml del microorganismo proveniente del medio de adaptación. Se dejaron en agitación mecánica por 24 horas a una temperatura de 32°C. El procedimiento se realizó por triplicado para cada sustrato hidrolizado.

2.2.4.3 Fermentación aeróbica: Luego de preparado el pie de cuba para cada sustrato, se procedió a realizar el montaje para la fermentación aeróbica, tal como se observa en la figura 24.

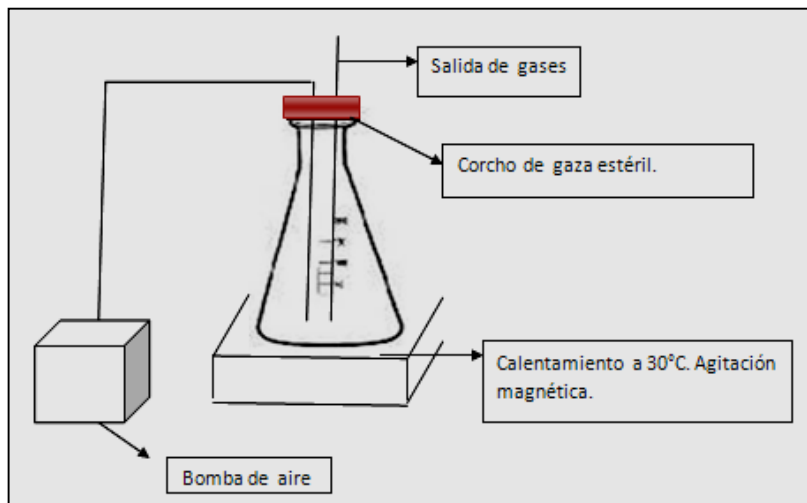


Figura 24. Montaje para la fermentación aeróbica

Se mezcló el contenido de los erlenmeyers para obtener un total de 150 ml y se colocó en un erlenmeyer de 250 ml previamente esterilizado, se elaboró un tapón de gaza estéril y se adecuó con dos mangueras estériles. Una de ellas estaba conectada a una bomba de aire de pecera y llegaba hasta el fondo del erlenmeyer, para así garantizar una buena distribución en la mezcla. La otra manguera, correspondía a la salida de gases. Se encendió la bomba de aire y se dejó burbujear por espacio de 18 horas, tomando muestras de 20 ml cada tres horas para el conteo celular (No de células/ml), concentración de azúcares reductores (g/L) biomasa (g/L) y concentración de proteína (mg/ml). El procedimiento se realizó por triplicado para cada hidrolizado. La temperatura de trabajo osciló entre 28-30°C y el pH inicial fue de 4.5.

2.2.4.4 Determinaciones de la biomasa: Se determinó mediante la técnica de peso seco. De los 20 ml, se tomaron alícuotas de 10 ml por triplicado de cada uno de los cultivos en crecimiento, las cuales se centrifugaron (3000 rpm/5min). Los sedimentos se colocaron en papel filtro previamente pesados y se secaron a 105°C hasta obtener peso constante. Los sobrenadantes se utilizaron para determinar el consumo del sustrato (azúcares reductores residuales).

2.2.4.5 Concentración de azúcares reductores residual: Con los sobrenadantes obtenidos, se procedió a la determinación del sustrato residual, mediante la técnica de azúcares reductores por el método DNS, Miller, (1959) ; los ensayos se realizaron por triplicado (figura 25) y en algunos casos se debió realizar diluciones de la muestras (10^{-1} hasta 10^{-2}).



Figura 25: Determinación de azúcares reductores residual técnica DNS.

2.2.4.6 Conteo celular: Para determinar el crecimiento de la levadura en cada uno de los medios de cultivo, se empleó la técnica del conteo de células en Cámara de Neubauer (figura 26), , tomando alícuotas de 1 ml cada tres horas por triplicado.



Figura 26. Conteo celular mediante Cámara de Neubauer

2.2.4.7 Concentración de proteína: La determinación de proteína se realizó tomando alícuotas de 9 ml cada tres horas por triplicado (figura 27); se centrifugaron y con el sedimento se aplicó el protocolo para la cuantificación de proteínas con azul de coomassie G -250, siguiendo la metodología de Bradford, (1976) y las recomendaciones de Kruger (n.d) y Zor *et al.* (1996). En el anexo 4, se presenta el respectivo protocolo de laboratorio.



Figura 27. Cuantificación proteína unicelular (SCP) por la técnica de Bradford.

5.2.4.7 Determinación parámetros cinéticos: Con los datos obtenidos del conteo celular (No de células/ml) de cada uno de los medios de fermentación, se determinó para cada combinación porcentual la velocidad específica de crecimiento $\mu_x(h^{-1})$, siguiendo la metodología de Ortiz, (2012). Con los resultados de azúcares reductores (g/L) y biomasa (g/L) se determinó el rendimiento de biomasa a partir de sustrato $Y_{x/s}$ (g/g), según metodología de Moreno, S., *et al.* (1996).

2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

2.3.1 Caracterización de la materia prima: Para la presentación e interpretación de resultados, se utilizaron las medias estadísticas de rigor como la media aritmética, desviación estándar, coeficiente de variación y presentaciones gráficas.

2.3.2 Hidrólisis química: Para la presentación e interpretación de resultados, se utilizaron las medias estadísticas de rigor como la media aritmética, desviación estándar y el coeficiente de variación.

La verificación del modelo estadístico (diseño del experimento), se realizó mediante un análisis exploratorio. Para la discusión de resultados obtenidos, los datos se tabularon mediante el programa estadístico SPSS para observar la dispersión de los datos y así verificar la confiabilidad de la investigación (ANOVA). Se utilizó la prueba de Tukey para establecer la comparación entre medias por pares y establecer cuál de las combinaciones porcentuales estudiadas genera más azúcares reductores después de la hidrólisis química.

2.3.2.1 Diseño experimental para la hidrólisis química: Para evaluar el efecto de las combinaciones porcentuales de los residuos orgánicos de cáscara de naranja y papa en la producción de azúcares reductores mediante hidrólisis química, se plantea un diseño experimental de un factor completamente aleatorizado con efectos fijos, Montgomery, (2000) con cinco niveles y cuatro replicas por nivel para un total de 20 réplicas.

El experimento presenta un modelo de efectos representado por:

$$Y_{ij} = u + \tau_i + \varepsilon_{ij} \quad \left\{ \begin{array}{l} i= 1,2,\dots, a \\ j= 1,2,\dots, n \end{array} \right.$$

Donde u es la media global, τ_i efecto de las combinaciones porcentuales en la producción de jarabes edulcorados (azúcares reductores), ε_{ij} error aleatorio del modelo y Y_{ij} es la observación o variable de respuesta (concentración de azúcares reductores después de la hidrólisis química).

2.3.2.2 Hipótesis

- **Hipótesis de trabajo:** La hidrólisis química de los residuos de cáscara de naranja (*Citrus sinensis L var valencia*), papa (*Solanum tuberosum*) variedad Diacol Capiro (R-12) y las combinaciones porcentuales de estos, produce una alta concentración de azúcares reductores (gramos AR/ gramos de residuo seco) que pueden ser usados como sustratos fermentables en el crecimiento de la levadura *Saccharomyces Cerevisiae*.

- Hipótesis estadísticas

Ho: $\tau_1 = \tau_2 = \tau_3 = \tau_4 = \tau_5$

Ho: el contenido de azúcares reductores (gramos AR/ gramos de residuo seco) derivado de la hidrólisis química de los residuos de cáscara de naranja, papa y de las combinaciones porcentuales de estos, no difieren entre sí (no presentan diferencias significativas).

Ha: $\tau_1 \neq \tau_2 \neq \tau_3 \neq \tau_4 \neq \tau_5$

Ha: el contenido de azúcares reductores (gramos AR/ gramos de residuo seco) derivado de la hidrólisis química de los residuos de cáscara de naranja, papa y las combinaciones porcentuales de estos, difieren entre sí (presentan diferencias significativas), o por lo menos una de ellas difiere de las demás.

2.3.2.3 Variables: Variables Independientes: cantidad de residuos sólidos de naranja (*Citrus sinensis L var valencia*) y papa (*Solanum tuberosum*) variedad Diacol Capiro (R-12) y combinaciones porcentuales de estos.

Variables Dependientes: contenido de azúcares reductores (gramos AR/ gramos de residuo seco).

Variables de Ruido: origen vegetal de los residuos sólidos orgánicos de cáscara de naranja y papa.

Variables controlables

Temperatura y Tiempo de hidrólisis celulosa: 3 horas en hidrólisis química y 15 minutos a 125°C para la hidrólisis ácida.

Temperatura y Tiempo de hidrólisis de almidón: 94°C por 6 horas en ebullición a reflujo.

Adición de reactivos químicos (hidróxido de sodio y ácido sulfúrico): volúmenes constantes de acuerdo a los protocolos ajustados previamente.

Concentración de reactivos químicos: NaOH al 0.1 N y ácido sulfúrico 20%.

2.3.3 Fermentación de sustratos : Los resultados obtenidos en cada uno de los medios de fermentación (conteo celular (No de células/ml), concentración de azúcares reductores (g/L) biomasa (g/L)) y concentración de proteína (mg/ml)), se interpretarán utilizando las medidas estadísticas de rigor como la media aritmética, desviación estándar, coeficiente de variación y presentaciones gráficas.

2.3.3.1 Contenido de Proteína Celular (SCP): De igual forma que para la hidrólisis química, la verificación del modelo estadístico (diseño del experimento), se realizará mediante un análisis exploratorio. Para la discusión de resultados obtenidos, los datos se tabulan mediante el programa estadístico SPSS para observar la dispersión de los datos y así verificar la confiabilidad de la investigación (ANOVA). Se utilizará la prueba de Tukey para establecer la comparación entre medias por pares y establecer cuál de las combinaciones porcentuales estudiadas genera mayor concentración de proteína (mg/ml) proveniente de la biomasa de la levadura *Saccharomyces Cerevisiae*.

2.3.3.2 Diseño experimental Contenido de Proteína Celular (SCP): Para evaluar la mayor producción de proteína Unicelular (SCP) a partir de los residuos de naranja (*Citrus sinensis L var valencia*) , papa (*Solanum tuberosum*) variedad Diacol Capiro (R-12) y las combinaciones porcentuales de estos, durante las 18 horas de fermentación, se aplicará el análisis de covarianza.

Para un modelo de un solo factor con una variable, se asume que existe una relación lineal entre la variable de respuesta y la covariable, Montgomery, (2000); el modelo estadístico apropiado es:

$$y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta(x_{ij} - \bar{x}_{..}) + \varepsilon_{ij} \quad \left\{ \begin{array}{l} i= 1,2,\dots, a \\ j= 1,2,\dots, n \end{array} \right.$$

Donde y_{ij} es la j -ésima observación bajo el i -ésimo nivel del tratamiento o variable de respuesta (concentración de proteína mg/ml). x_{ij} es la medida de la covariable (Tiempo en horas) que se hace para y_{ij} . $\bar{x}_{..}$ es la media de los valores de x_{ij} . μ es el valor medio global. α_i es el efecto del nivel i -ésimo del tratamiento. β coeficiente de regresión que relaciona y_{ij} con la covariable x_{ij} . ε_{ij} error aleatorio.

2.3.3.3 Hipótesis

Hipótesis de trabajo: El crecimiento de la levadura *Saccharomyces Cerevisiae* sobre los sustratos fermentables de residuos de naranja (*Citrus sinensis L var valencia*), papa (*Solanum tuberosum*) variedad Diacol Capiro (R-12) y las combinaciones porcentuales de estos, producen una alta concentración de proteína unicelular, SCP, (mg/ml).

- Hipótesis estadísticas

Ho: $\tau_1 = \tau_2 = \tau_3 = \tau_4 = \tau_5$

Ho: La producción de proteína unicelular, SCP, (mg/ml) obtenida a partir del crecimiento de la levadura *Saccharomyces Cerevisiae* sobre los sustratos fermentables de residuos de naranja (*Citrus sinensis L var valencia*), papa (*Solanum tuberosum*)

variedad Diacol Capiro (r-12) y las combinaciones porcentuales de estos, no difieren entre sí (no presentan diferencias significativas).

Ha: $\tau_1 \neq \tau_2 \neq \tau_3 \neq \tau_4 \neq \tau_5$

Ha: La producción de proteína unicelular, SCP, (mg/ml) obtenida a partir del crecimiento de la levadura *Saccharomyces Cerevisiae* sobre los sustratos fermentables de los residuos de naranja (*Citrus sinensis L var valencia*), papa (*Solanum tuberosum*) variedad Diacol Capiro (r-12) y las combinaciones porcentuales de estos, difieren entre sí (presentan diferencias significativas), o por lo menos una de ellas difiere de las demás.

2.3.3.4 variables : Variable Independiente : sustratos fermentables (contenido de azúcares reductores (gramos AR/ gramos de residuo seco)) provenientes de los residuos sólidos de naranja (*Citrus sinensis L var valencia*) y papa (*Solanum tuberosum*) variedad Diacol Capiro (r-12) y combinaciones porcentuales de estos.

Variable Dependiente: proteína unicelular, SCP, expresada en mg/ml.

Covariable: Tiempo de fermentación (18 horas).

Variabes de Ruido: composición química de los azúcares provenientes de la hidrólisis química.

Variabes controlables: Temperatura de fermentación (28-30 °C). Tiempo de fermentación (18 horas). Tipo de fermentación.

3. RESULTADOS

3.1 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LA MATERIA PRIMA

Los resultados obtenidos de la caracterización de los residuos de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis L var valencia*), papa (*Solanum tuberosum*) variedad Diacol Capiro (R-12) y combinaciones porcentuales de estos, se presenta en la tabla 4. En el anexo 5 se presentan la matriz del diseño con los datos según número de réplicas y en el anexo 6, se presenta el resumen estadístico de los datos.

Dentro de los parámetros de caracterización química, la cantidad de azúcares reductores (gramos/100 gramos de residuo seco) aporta información relevante para los resultados de la hidrólisis química y fermentación. Con la técnica de DNS, se procedió al cálculo de la cantidad de azúcares presentes en cada combinación porcentual de residuos (porcentuales N100, P100, N25P75, N50P50, N75P25). Los datos obtenidos se encuentran en el anexo 7. La ecuación usada fue:

$$\begin{aligned} Y &= mx + b \\ Y &= 0,332x + 0,0102 \\ R^2 &= 0,9924 \end{aligned}$$

Ecuación (1)

Los cálculos obtenidos directamente de la ecuación fueron transformados matemáticamente hasta gramos de azúcares reductores/gramos de residuo seco, teniendo en cuenta las diluciones, volúmenes y cantidad de las muestras al aplicar el protocolo de DNS.

Tabla 4. Caracterización residuos de cáscara de naranja, papa y combinaciones porcentuales

Componente	Humedad en base húmeda (%H bh)	Humedad en base seca (%H bs)	Materia Seca (%MS)	Grasa (% extracto etéreo)	Almidón (gramos/ 100 gramos de residuo seco)	Celulosa (gramos/ 100 gramos de residuo seco)	Azúcares reductores (gramos/100 gramos de residuo seco)	pH
Tratamientos								
N100	74,278 ^a (0,252)	5,733 ^a (0,449)	24,726 ^a (0,253)	0,902 ^a (0,612)	1,5700 ^a (0,2965)	11,635 ^a (0,621)	19,277 ^a (2,920)	4.5 ^a
P100	82,228 ^a (0,883)	1,984 ^a (0,315)	17,575 ^a (0,841)	0,780 ^a (0,4006)	60,107 ^a (1,3349)	1,444 ^a (0,355)	0,757 ^a (0,302)	5.6 ^a
N25P75	79,477 ^a (0,659)	1,633 ^a (0,1863)	20,302 ^a (0,639)	0,800 ^a (0,4501)	45,080 ^a (1,001)	3,881 ^a (1,486)	6,199 ^a (1,514)	5.1 ^a
N50P50	76,395 ^a (0,399)	1,521 ^a (0,127)	23,414 ^a (0,389)	1,230 ^a (0,330)	30,053 ^a (0,667)	9,545 ^a (0,586)	6,522 ^a (1,292)	4.8 ^a
N75P25	72,910 ^a (0,535)	2,086 ^a (0,112)	26,719 ^a (0,529)	0,845 ^a (0,166)	15,026 ^a (0,333)	11,216 ^a (0,254)	16,876 ^a (1,7867)	4.6 ^a
^a media aritmética.. Los números entre paréntesis corresponden a la desviación estándar. (n=4).								

3.2 HIDRÓLISIS QUÍMICA

Después de la hidrólisis química, se procedió a realizar la técnica de DNS para conocer la concentración de azúcares reductores, empleando la ecuación (1).

Los cálculos obtenidos directamente de la ecuación fueron transformados matemáticamente hasta gramos de azúcares reductores/gramos de residuo seco, teniendo en cuenta las diluciones, volúmenes y cantidad de las muestras al aplicar el protocolo de DNS. Los resultados de la hidrólisis química (básica y química) se presentan en la tabla 5 y el estadístico del experimento (ANOVA) en la tabla 6. En el anexo 8, se presentan la matriz del diseño con los datos según número de réplicas

Tabla 5. Cantidad de azúcares reductores después de la hidrólisis (g/100 gramos de residuo seco).

Tratamiento	Media^a	Desviación estándar	Mínimo	máximo
N100	21,666	2,194	19,003	24,244
P100	67,259	22,299	47,445	97,277
N25P75	46,738	11,929	34,921	58,777
N50P50	57,037	18,798	36,180	80,180
N75P25	23,497	1,229	22,265	24,723

^a indica que hay Diferencias significativas $p \leq 0.05$, (n=3).

Tabla 6. Estadístico (ANOVA) Cantidad de azúcares reductores después de la hidrólisis (g/100gramos de residuo seco)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	6122,191	4	1530,548	6,971	0,003
Intra-grupos	2854,111	13	219,547		
Total	8976,302	17			

La diferencia significativa entre las medias de las combinaciones porcentuales N100, P100, N25P75, N50P50, N75P25, se presenta en la tabla 7. En el anexo 9, se presenta el estudio estadístico completo.

Tabla 7. Comparaciones múltiples Cantidad de azúcares reductores después de la hidrólisis (g/gramos de residuo seco)

(I) Materia prima (Naranja y Papa)	(J) Materia prima (Naranja y Papa)	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
N100	P100	,006	-78,582218	-12,602982
	N25P75	,234	-60,705402	10,560318
	N50P50	,033	-68,360843	-2,381607
	N75P25	1,000	-37,464035	33,801685
P100	N100	,006	12,602982	78,582218
	N25P75	,407	-15,112802	56,152918
	N50P50	,861	-22,768243	43,210993
	N75P25	,014	8,128565	79,394285

N25P75	N100	,234	-10,560318	60,705402
	P100	,407	-56,152918	15,112802
	N50P50	,888	-45,931543	25,334177
	N75P25	,354	-14,851763	61,334496
N50P50	N100	,033	2,381607	68,360843
	P100	,861	-43,210993	22,768243
	N25P75	,888	-25,334177	45,931543
	N75P25	,069	-2,092810	69,172910
N75P25	N100	1,000	-33,801685	37,464035
	P100	,014	-79,394285	-8,128565
	N25P75	,354	-61,334496	14,851763
	N50P50	,069	-69,172910	2,092810

3.3 FERMENTACIÓN DE SUSTRATOS

Al realizar las fermentaciones de las combinaciones porcentuales de los tratamientos (N100, P100, N25P75, N50P50, N75P25), se obtuvieron datos que se presenta en la tabla 8. Los resultados obtenidos para azúcares reductores residuales (g/L) fueron procesados con la siguiente ecuación:

$Y = mx + b$ $Y = 1.47283x + 0,0053$ $R^2 = 0,9977$

Ecuación (2).

En el anexo 10, se encuentran los resultados de la curva patrón. Los cálculos obtenidos directamente de la ecuación fueron transformados matemáticamente hasta gramos por Litro, teniendo en cuenta las diluciones, volúmenes y cantidad de las muestras al aplicar el protocolo del anexo 3. Los resultados de biomasa fueron convertidos a concentración (g/L), teniendo en cuenta la pérdida de peso y el volumen de fermentación. Los valores de conteo de microorganismos (NC/ml) se procesaron aplicando la fórmula matemática de la ecuación 3, teniendo en cuenta los factores de dilución.

$$\text{No de células/ml} = (\text{No de células}/25) * (400/0.1) * (1000/FD) \quad \text{Ecuación (3).}$$

Tabla 8. Resultados fermentación combinaciones porcentuales de cáscara de naranja y papa.

Tiempo (h)	N100				P100				N25P75				N50P50				N75P25			
	ARR (g/L)	B (g/L)	NC / ml	PS (mg/ml)	ARR (g/L)	B (g/L)	NC / ml	PS (mg/ml)	ARR (g/L)	B (g/L)	NC / ml	PS (mg/ml)	ARR (g/L)	B (g/L)	NC / ml	PS (mg/ml)	ARR (g/L)	B (g/L)	NC / ml	PS (mg/ml)
0	6,9357	ND	3,09E+06	ND	26,0241	ND	1,60E+06	ND	21,2450	ND	3,25E+06	ND	22,4197	ND	3,41E+06	ND	10,6807	ND	3,11E+06	ND
3	1,7017	0,0282	3,84E+07	0,2895	7,1552	0,0354	3,09E+07	0,0409	5,9352	0,0231	7,25E+07	0,0266	15,6085	0,0205	5,07E+07	0,0041	4,1119	0,0528	6,11E+07	0,0000
6	1,5244	0,0338	7,20E+07	0,3047	6,5419	0,0492	3,63E+07	0,2005	6,3952	0,1169	1,30E+08	0,0584	5,1819	0,0974	8,00E+07	0,0940	4,1385	0,0615	8,00E+07	0,0878
9	1,3850	0,0482	3,09E+08	2,4514	7,0219	0,1559	8,64E+08	3,5440	4,6719	0,1400	6,72E+08	2,8973	3,4752	0,1292	6,03E+08	1,8164	2,8519	0,0872	8,94E+08	0,2714
12	1,1117	0,0621	7,84E+08	2,5962	6,4852	0,1990	1,69E+09	3,7215	2,9252	0,1646	1,09E+09	4,4429	2,6785	0,1605	1,22E+09	3,9456	2,7319	0,1179	1,47E+09	3,5884
15	1,2352	0,0916	1,27E+09	2,9207	4,4719	0,2380	2,58E+09	8,2367	3,0052	0,2187	1,49E+09	5,9371	2,5319	0,2005	1,63E+09	5,5682	2,2619	0,1738	1,73E+09	4,2981
18	1,0719	0,0979	1,61E+09	4,1744	3,3019	0,3421	5,22E+09	9,7683	1,7597	0,2533	2,20E+09	8,7550	2,4585	0,2152	1,89E+09	6,8686	2,0219	0,3118	2,19E+09	6,0772

ARR: Azúcares Reductores Residuales (g/L). **B:** Biomasa (g/L). **NC:** Número de células / ml. **PS:** proteína sedimento (mg/ml). **ND:** no determinado.

3.3.1 Contenido Proteína Unicelular (SCP): Los resultados del contenido de proteína unicelular (SCP) se presentan en la tabla 8; con la siguiente ecuación, los datos fueron convertidos en mg/ml:

$Y=mx+b$ $Y= 0.5711+0.7266$ $R^2= 0,9912$	Ecuación (4)
---	---------------------

En el anexo 11 se presenta los datos de la curva patrón al aplicar el protocolo de Bradford, 1976. En la tabla 9, se presenta el contenido promedio de proteína unicelular SCP (mg/ml) y en la tabla 10, se presenta el estadístico del experimento; el análisis de datos se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA) y la comparación de medias para identificar el mejor o los mejores sustratos para la producción de proteína unicelular SCP mediante la prueba de Tukey (tabla 11.). En el anexo 12 presentan la matriz del diseño con los datos según número de réplicas y en el anexo 13, se presenta el resumen estadístico de los datos

Tabla 9. Cantidad de Proteína unicelular (mg/ml).

Combinaciones de naranja y papa	Media	Desviación típica	N
N100	2,122806 ^a	1,8147506	18
P100	4,251978 ^a	3,8848319	18
N25P75	3,686211	3,3469076	18
N50P50	3,049478	2,7907857	18
N75P25	3,839328	3,3131108	18
Total	3,389960	3,1293581	90

^a indica que hay Diferencias significativas $p \leq 0.05$, (n=3).

Tabla 10. Estadístico (ANOVA) Cantidad de Proteína unicelular (mg/ml).

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	708,644 ^a	5	141,729	73,073	,000
Intersección	1034,265	1	1034,265	533,247	,000
xcentr	659,065	1	659,065	339,801	,000
trat	49,579	4	12,395	6,390	,000
Error	162,923	84	1,940		
Total	1905,831	90			
Total corregida	871,567	89			

^a R cuadrado = ,813 (R cuadrado corregida = ,802)

Tabla 11. Comparaciones múltiples (prueba de Tukey) Cantidad de Proteína unicelular (mg/ml).

Tratamientos	Promedio de los tratamientos	Diferencias de promedios ^a			
Y1= N100	2,122806	Y1-Y2	-2,13	2,13 ^b	Rech H0 Diferencia significativa
Y2= P100	4,251978	Y1-Y3	-1,56	1,56 ^b	Rech H0 Diferencia significativa
Y3= N25P75	3,686211	Y1-Y4	2,12	2,12 ^b	Rech H0 Diferencia significativa
Y4= N50P50	3,049478	Y1-Y5	-1,72	1,72 ^b	Rech H0 Diferencia significativa
Y5= N75P25	3,839328	Y2-Y3	0,57	0,57	No Rech H0 Diferencia n.s
		Y2-Y4	1,20	1,20	No Rech H0 Diferencia n.s
		Y2-Y5	0,41	0,41	No Rech H0 Diferencia n.s

		Y3-Y4	0,64	0,64	No Rech H0 Diferencia n.s
		Y3-Y5	-0,15	0,15	No Rech H0 Diferencia n.s
		Y4-Y5	-0,79	0,79	No Rech H0 Diferencia n.s
<p>^a. con $\alpha=0.05$ y $f=84$ grados de libertad para el error. $q=(5,84)=3.82$. $T=1.30$</p> <p>^b La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.</p>					

3.3.2 Parámetros cinéticos: Se calcularon los parámetros cinéticos que se presentan en la tabla 12. Estos parámetros son importantes para evaluar la importancia industrial del proceso de obtención de proteína unicelular PSC. La velocidad de crecimiento específico se calculó matemáticamente con los datos de conteo celular, calculando el número de generaciones (n), el tiempo de duplicación (td) y aplicando la siguiente expresión

$$\mu_x = \ln 2 / t_d \quad \text{Ecuación (5)}$$

El rendimiento de biomas se determinó en (g/g) con la expresión matemática:

$$Y_{x/s} = - \Delta x / \Delta S \quad \text{Ecuación (6)}$$

Tabla 12: parámetros cinéticos de la fermentación discontinua (batch).

	P100	N100	N25P75	N50P50	N75P25
μ_x (h ⁻¹)	0,48	0,51	0,58	0,54	0,58
$Y_{x/s}$ (g/g)	0.2371	0.0195	0.0451	0.0253	0.0336

4. DISCUSIÓN

4.1 CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

Se considera una etapa de importancia en la investigación; se debe conocer sus características químicas iniciales por la naturaleza y fuente del residuo. La literatura consultada reporta datos de caracterización, pero ésta sirve de base de comparación y de punto de referencia para el posterior análisis y posibles recomendaciones. La caracterización de la materia prima es útil para considerar aspectos relacionados como almacenamiento, pretratamiento para la posterior determinación del contenido de almidón, selección del método de hidrólisis tanto de almidón como de celulosa, por citar algunos ejemplos.

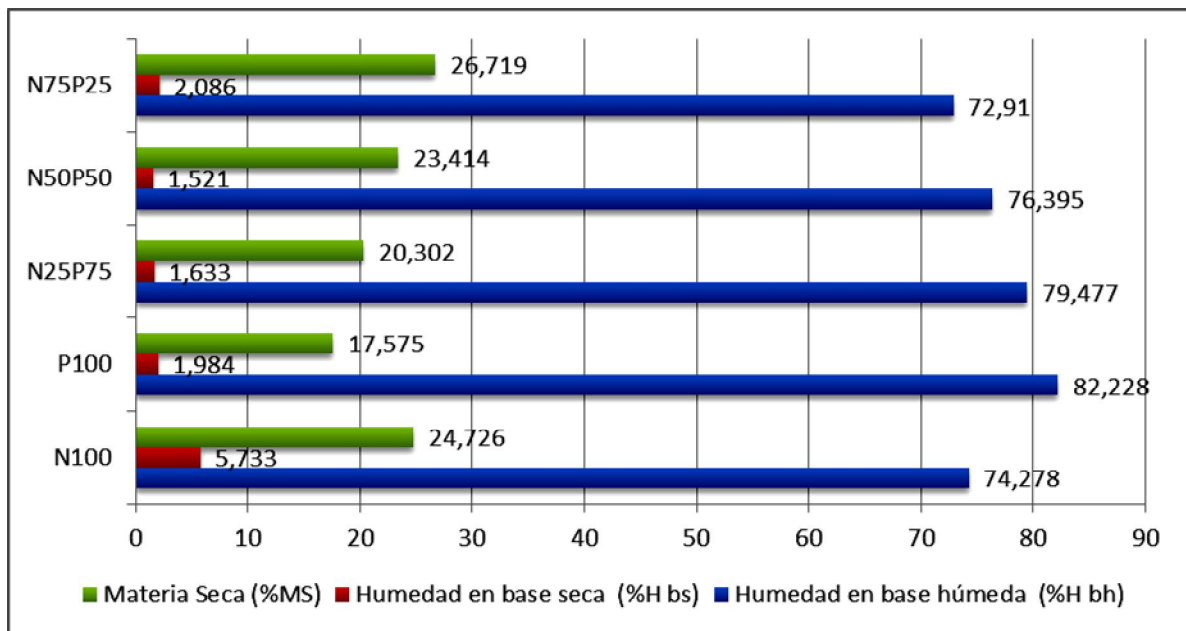


Figura 28. Caracterización de la materia prima para Humedad y Materia seca.

Durante esta caracterización, para el porcentaje de humedad en base húmeda (%Hbh) (figura 28, tabla 4), se observó un comportamiento altamente homogéneo entre los datos, los coeficientes de variación fueron menores de 1.08 (anexo 6), lo que indica que: la

humedad inicial para las muestras N100 de la variedad valencia es del 74.3, es decir, en cualquier muestra de naranja de la variedad usada, presenta este porcentaje de humedad en promedio, otros autores, reportan valores inferiores (69.36%) como Tejeda *et al.* (2010), pero esto va de acuerdo a la variedad, y manejo postcosecha; para P100, es del 82.2%, la humedad en cualquier muestra de papa de la variedad Diacol Capiro (R-12), presenta este porcentaje de humedad en promedio, resultado semejante al reportado por Arapoglou, *et al.* 2009 y Arapoglou *et al.* (2010); para las combinación porcentuales (N75P25,N50P50,N75P25), los valores promedios 79,5%, 76.4%, 73.0% respectivamente son similares y van decreciendo a medida que el porcentaje de residuos de cáscara de papa variedad Diacol Capiro (R-12) disminuye; en promedio todos los residuos presentan un porcentaje de humedad entre el 77%, valor semejante al que reportan para residuos vegetales Cardona, *et al.* (2004). Para los valores de humedad en base seca (%H bs), los coeficientes de variación muestran que los datos son homogéneos (anexo 6), indicando que las muestras tras someterlas a un proceso de deshidratación a las condiciones establecidas retienen el 2.6% de agua aproximadamente. Los residuos N100 y N75P25 retiene la mayor cantidad de agua (5.7% y 2,08%), esto se puede atribuir a la composición química de las cáscaras de naranja (*Citrus sinensis L var valencia*) en relación a moléculas polares que establecen uniones químicas con moléculas de agua, como pectina, celulosa y hemicelulosa, esto se verifica si se observa los resultados de celulosa (figura 29 y tabla 4) para estas dos muestras (11,63% y 11,21%), estos valores conducen a deducir que a las muestras con mayores contenidos de residuo de cáscara de naranja se les debe dar más tiempo de secado o considerar otro método como por ejemplo el sacado de estufa al vacío. La materia seca o extracto seco es la parte que resta de las muestras, tras extraer toda el agua posible, y de acuerdo a los resultados, se observa que sigue un comportamiento similar al descrito para los anteriores parámetros; presentan un coeficiente de variación en promedio de 1.98, representando datos homogéneos (anexo 6). En general, los mayores porcentajes de materia seca los registra N100 (24.72%) y el menor valor P100 (17.6%), estos resultados son similares con lo expuesto en Mahmood, *et al.* (1998) en donde se tiene un 20,98% para la piel de cáscaras de naranja y el 17.82% para piel de papa. La combinación porcentual que

mayor residuo seco presenta es donde hay mayor cantidad de naranja (N75P25, 26,8%); estos resultados van de acuerdo, a la composición química de los residuos, observándose que los de naranja (*Citrus sinensis L var valencia*) presentan la mayor solidos que los residuos de cáscara de papa (*Solanum tuberosum*) variedad Diacol Capiro (R-12,).

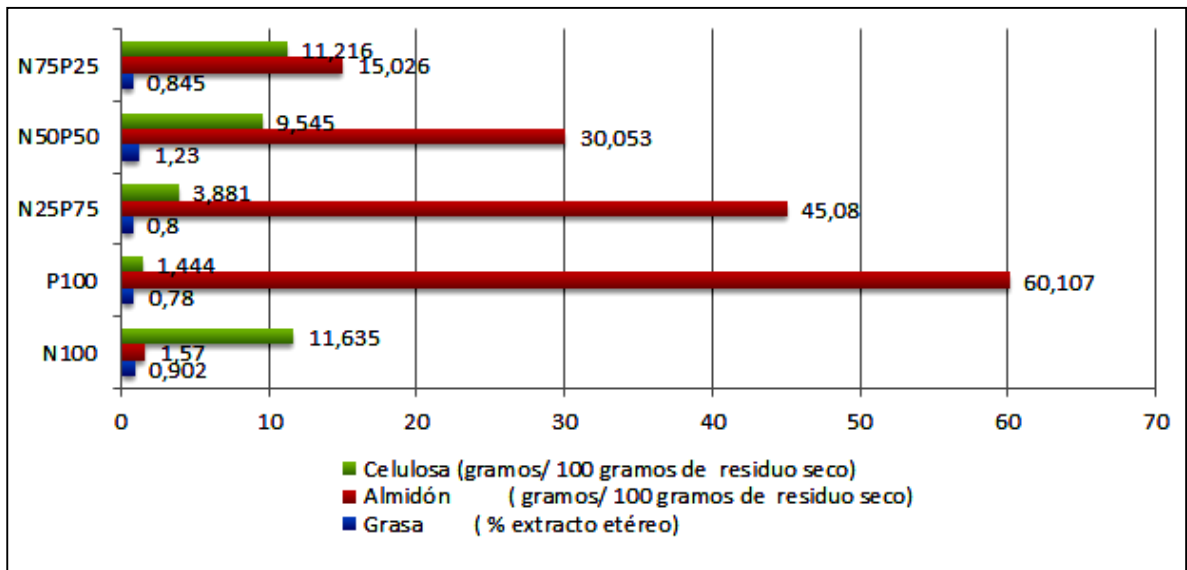


Figura 29. Caracterización de la materia prima para celulosa, almidón y grasa.

Observando los resultados de la figura 29, los valores para el parámetro de grasa como extracto etéreo, el análisis estadístico (anexo 6) indica que los datos presentan un coeficiente de variación del 19.6%, indicando que los datos son altamente heterogéneos, esto indica que los residuos de N100 y P100, presentan contenidos de grasa diferentes, además al hacer las combinaciones no siguen un comportamiento homogéneo como el que se hubiese esperado; se observa que el mayor porcentaje de grasa lo tiene N100 (0.9%) y de las combinaciones N50P50 (1,2%) y no N75P25 (0.84%), eso se puede atribuir a errores de experimentación en la aplicación del protocolo.

Los valores de celulosa y almidón aportan información valiosa para la continuidad de la investigación, si bien como lo indica Mahmood, *et al.* (1998), Arapoglou *et al.* (2009) y Arapoglou *et al.* (2010) estos residuos son ricos en polisacáridos como celulosa para el

caso de los residuos de cáscara de naranja (*Citrus sinensis L var valencia*) y almidón para los residuos de cáscara de papa (*Solanum tuberosum*) variedad Diacol Capiro (R-12), cuya composición química mayoritaria son uniones químicas de glucosa, sustancia química requerida para la nutrición de muchos microorganismos como la levadura *Saccharomyces Cerevisiae*. Los resultados del contenido de almidón (figura 29, tabla 14), se aprecia claramente que éste varía según la cantidad de residuo de cáscara de papa. Los datos del contenido de almidón entre los tratamientos para las muestras N100 resultó ser muy diferente (coeficiente de variación 32,8%) con respecto a las demás muestras (coeficiente de variación en promedio 2,2%), este comportamiento se explica porque las cáscaras de naranja no poseen almidón o por lo menos no es el polisacárido que abunde en este residuo en comparación con los contenidos encontrados en las muestras al N25P75, N50P50 y N75P25, donde el aporte de almidón es atribuido a los residuos de cáscara de papa. Sí se observa que el tratamiento o muestra P100 posee un porcentaje de almidón del 60.1% en promedio. Para los resultados de celulosa, se observa un comportamiento inverso al de almidón, el tratamiento P100, posee los menores porcentajes de celulosa (1.44%) frente a N100 (11,6%), en los tratamientos N25P75, N50P50 y N75P25 el contenido de celulosa aumenta a medida que aumenta la cantidad de residuos de cáscara de naranja; los datos para P100 y N25P75 frente a los demás exhiben un comportamiento diferente (coeficientes de variación 24,6% y 38.8%), pero los demás tratamientos N100, N50P50 y N75P25, exhiben un comportamiento altísimamente homogéneos (coeficientes de variación 5.33%, 6.14% y 2,2% respectivamente), esto indica que en estas muestras influye la cantidad de residuos de cáscara de naranja adicionada y que condiciona el contenido de celulosa entre los tratamientos. De acuerdo a este análisis, se puede inferir que los resultados de celulosa y almidón proporcionan una buena fuente de polisacáridos a hidrolizar, ya sea química o enzimáticamente: los resultados de celulosa N100 N50P50 y N75P25 presentan resultados superiores y semejantes a los reportados por Grohmann, *et al.* (1995), Mahmood, *et al.* (1998), con un 9,91% y 9,16% y de igual forma para almidón, los residuos P100 y N25P75 presentan resultados semejantes a los presentados por Mahmood, *et al.*(1998), Arapoglou *et al.*

(2010) y con contenidos de almidón en piel de papa del 66% y 52% y superiores a lo reportado por Mars, A. *et al.* (2010) con un 39% .

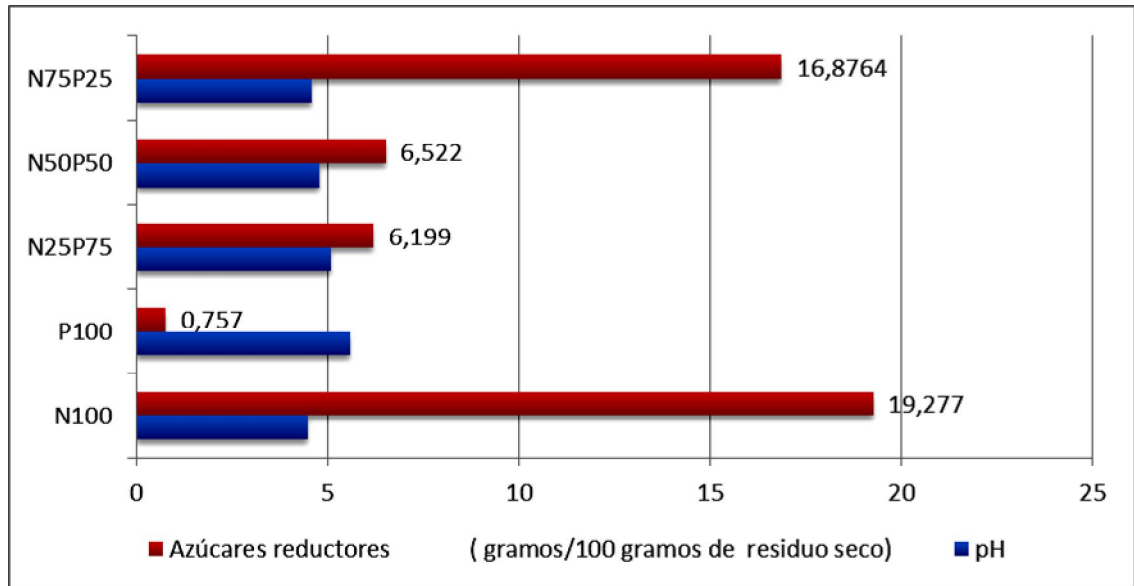


Figura 30. Caracterización de la materia prima para pH y azúcares reductores.

Los azúcares reductores se determinaron como glucosa mediante el uso de ácido dinitrosalicílico (DNS); estos resultados indican la cantidad de azúcares de bajo peso molecular y con poder reductor que poseen las muestras, generalmente son monosacáridos que se expresa como glucosa. Los resultado obtenidos (tabla 4, figura 30), indican que los residuos de P100 tiene un coeficiente de variación del 39,9% ,es decir, altamente diferente a los demás tratamientos, esto indica que no poseen azucares reductores (0,7%), por lo tanto, este residuo, sin aplicarle ningún tratamiento previo no es útil como sustrato fermentable, por lo que requiere de una hidrolisis del almidón para liberar glucosa y aumentar este porcentaje, este análisis concuerda con el estudio reportado por Mahmood, *et al.*(1998), y Arapoglou *et al.* (2010) en donde reportan un contenido del 0.61% en azúcares reductores. Para los tratamientos N100 y N75P25 la cantidad de azúcares reductores es similar (19,2% y 16,8%) y poseen los más altos valores en comparación con las combinaciones N25P75, N50P50, en donde se observa que este contenido disminuye a

medida que la cantidad de residuos de papa aumenta. Se observa que el resultado de azúcares reductores para N100 bajo las mismas condiciones de experimentación con un valor de 19.2% es superior al reportado por Tejeda *et al* (2010), el cual es de 2,788%, pero en el estudio de Grohmann, *et al.* (1995) reporta un contenido mayor (23,2%) , aún así se deduce que el tipo de residuos empleados en este trabajo ofrece mejores resultados para la producción de sustratos fermentables . El pH de las muestras estuvo entre los rangos de 4.5-5.6 semejantes a los reportados en Mahmood, *et al.*, (1998).

Los datos de los contenidos de celulosa, almidón y azúcares reductores, indica que se debe realizar una hidrólisis en todos los tratamientos para aumentar la cantidad de azúcares fermentables, además, la levadura *Sacharomyces cerevisiae* no sintetiza enzimas tipo celulasas, y amilasas requeridas para la hidrólisis de los polisacaridos en mención, lo que justifica el paso siguiente, la hidrólisis, que para esta investigación fue química. En términos generales, al comparar los resultados con estudios similares (Monsalve, *et al.* 2006 y Tejeda, *et al.* 2010) se observa que en este trabajo, las combinaciones N100, N25P75, N50P50 y N75P25 tienen altos contenidos de azúcares reductores para ser empleados como sustratos fermentables.

4.2 HIDRÓLISIS QUÍMICA

Constituye en uno de los análisis base para la posterior comparación del sustrato residual durante el proceso de fermentación en la producción de biomasa. El análisis estadístico indica que la media de los datos obtenidos (tablas 5 ,6 y figura 31) presentan diferencias significativas (P value = 0.003 a un nivel de significancia del 5%), por lo que podemos afirmar que en esta investigación, la hipótesis estadística, H_a , es verdadera cuando se afirma que “el contenido de azúcares reductores (gramos AR/ gramos de residuo seco) derivado de la hidrólisis química de los residuos de cáscara ad naranja, papa y las combinaciones porcentuales de estos, difieren entre sí (presentan diferencias significativas), o por lo menos una de ellas difiere de las demás”

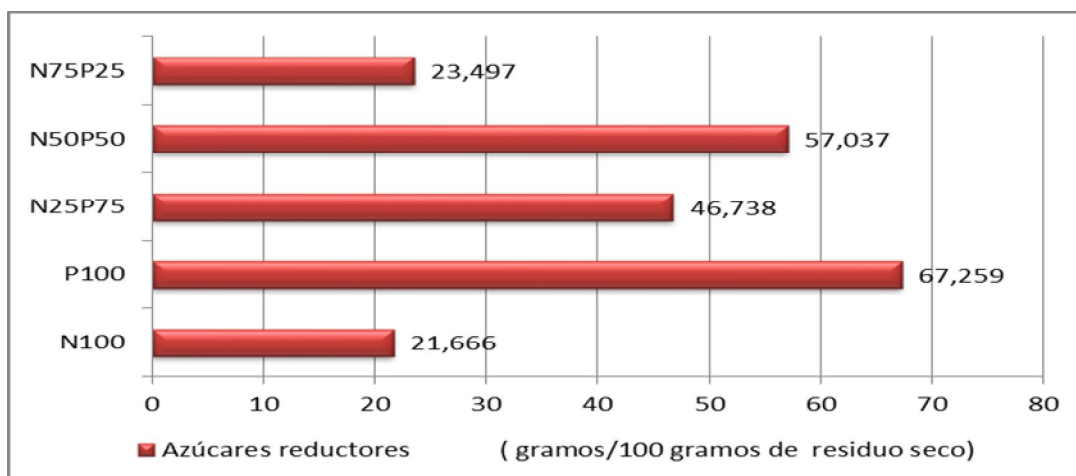


Figura 31. Cantidad de azúcares reductores después de la hidrólisis (g/gramos de residuo seco).

La hidrólisis química generó el aumento de azúcares reductores en cada una de los tratamientos (figura 32) así: En los residuos de N100 y N75P25, la hidrólisis química, no fue tan efectiva como en los otros tratamientos, ya que sólo aumentó aproximadamente un 10% y 28% respectivamente el contenido de azúcares reductores; resultado que pudo verse afectado por varias razones, por ejemplo, Giraldo, *et al.* (2008) analiza que una hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa (0,5% de ácidos, 80°C, 1h) puede continuar hasta la formación de ácidos orgánicos y furfural, disminuyendo el contenido de azúcares fermentables, Lenihan, *et al.* (2010), identifica que el contenido de azúcares reductores también puede disminuir debido a que la glucosa proveniente de una hidrólisis al 100% de la celulosa se puede degradar a hidroximetilfurfural, HMF, por proseguir una deshidratación; cuando esto se presenta, se debe hacer lo que recomienda Gámez *et al.* (2006), desintoxicar los hidrolizados antes de inocular con un carbón activado (adsorción) para limpiar de sustancias como el hidroximetilfurfural (HMF), ácido acético, fufural y compuestos fenólicos provenientes de la lignina. Estos autores recomiendan los siguientes pasos: concentración por evaporización, la desintoxicación, neutralización y la suplementación con nutrientes, sin embargo, la información sobre cómo separar, hidrolizar, desintoxicar estos azúcares sigue siendo escasa Lian, *et al.* (2010), pero aún así recomiendan que pueden ser desintoxicados si los ácidos se neutralizan a pH entre 5.0 y 7.0.

Continuando con el análisis del contenido de azúcares reductores para N100 y N75P25, también pudo verse modificado por una hidrólisis parcial, es decir, el protocolo de hidrólisis aplicado no generó la hidrólisis total de las cadenas carbonadas de celulosa y hemicelulosa, tal como analiza Gámez *et al.* (2006), cuando usa HCl o H₂SO₄ en concentraciones 1-10% usando temperaturas entre 100-150°C por lo tanto el contenido de azúcares reductores puede ser bajo; para Zhou N, *et al.* (2011), cuando se trabaja con ácidos diluidos como el H₂SO₄, el rendimiento de conversión es bajo (50-70%); se ha logrado aumentar la cantidad de azúcares hidrolizados de residuos de celulosa al usar una hidrólisis química moderada con H₃PO₄ a 122°C/300 minutos obteniéndose 4.46 g azúcares/ gramos de inhibidores relacionado un 55% de azúcares fermentables Gámez, *et al.* (2006), otros autores coinciden que al hidrolizar glucosa (rompimiento químico de enlaces glucosídicos) con H₂SO₄ a 0.05M / 240 min a 110 y 150°C, en estas condiciones la conversión de este polisacárido es completa, así se observa que para la hidrólisis total se debe aumentar el tiempo de hidrólisis, si se tiene en cuenta que en esta investigación el tiempo para la degradación química de la celulosa fue de 15 minutos, tiempo dado de acuerdo con lo recomendado en los protocolos ajustados. Para P100, se observa que es el tratamiento que más azúcares reductores registra, presentando una hidrólisis aproximada del 100%; para los residuos de N25P75 y N50P50 presentaron un contenido de azúcares reductores muy semejantes, en promedio 88%. Se observa que los contenidos de azúcares reductores de estos residuos(P100, N25P75 y N50P50), tras la hidrólisis generan sustratos con capacidad fermentable, con altos contenidos de azúcares reductores, tal como lo presenta Monsalve, *et al.* (2006). Estos resultados son superiores a los trabajos de Kang, *et al.* (2012), cuando tratan una solución de glucosa con H₂SO₄ a concentraciones de 0.5 N, 1.0 N y 2N, produciendo el 59.6% de glucosa a 80°C y 6 horas a partir de la biomasa de alga; Arapoglou, D *et al.* (2010) con hidrólisis ácida de almidón de residuos de cáscara de papa a 0.5M de HCl a 121°C durante 15 min obtuvo 18.15 g/L de azúcares fermentables que corresponde a 0,36 g de azúcar liberada/gramo de residuos seco crudo.

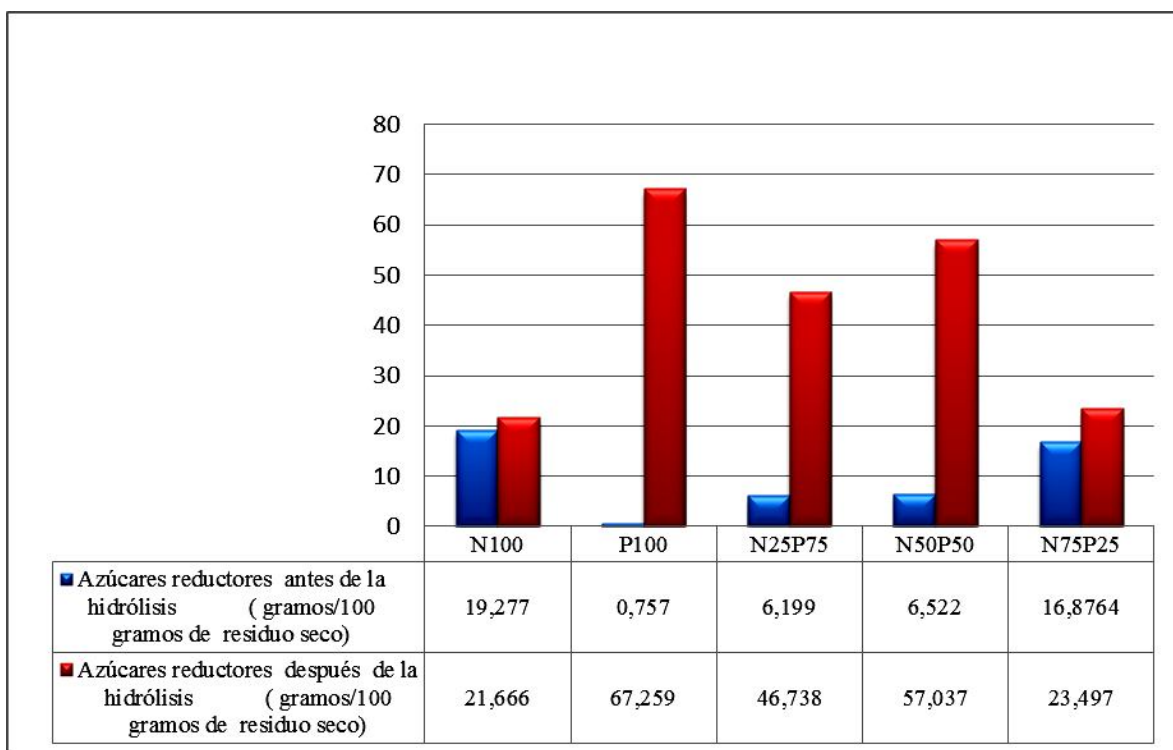


Figura 32. Producción de azúcares reductores antes y después de la hidrólisis química.

Al hacer el test de Tukey (tabla 7), se puede deducir: entre N100, N75P25 y P100 existe diferencias significativas, P100 es quien genera más azúcares reductores; dentro de las combinaciones porcentuales N25P75 y N50P50 no hay diferencias significativas, esto indica que la cantidad de azúcares reductores que se genera es similar entre ellos y exhiben un comportamiento igual que hidrolizar P100, es decir, que tomar residuos de cáscara al 100% , N50P50 o N25P75, en las mismas condiciones de experimentación pueden generar igual cantidad de azúcares reductores, por lo tanto, en esta investigación, se espera que los mejores resultados de fermentación este en P100, N25P75 y N50P50.

4.3 FERMENTACIÓN DE SUSTRATOS

De acuerdo a la tabla 8, al realizar las fermentaciones de las combinaciones porcentuales de los tratamientos, se obtienen los resultados del consumo de los azúcares reductores y se expresan en azúcares reductores residuales (g/L). Al analizar el comportamiento de la figura 33 y los datos de la tabla 8, se observó que en todos los sustratos quedaron cantidades significativas de azúcares reductores sin consumir por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, así; los medios P100, N100, N25P75, N50P50 y N75P25 dejaron aproximadamente entre 5-20% de azúcares sin ser degradados por el microorganismo, este comportamiento se atribuye a: al tiempo de fermentación empleado (18 horas), por lo que se considera aumentar a 24 horas para así promover todo el consumo de estos azúcares y aumentar la producción de proteína SPC; a la existencia de azúcares dentro de la composición de los sustratos que no pueden ser metabolizados por la levadura provenientes de la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa, tal como lo analiza Chander, *et al.*(2011).

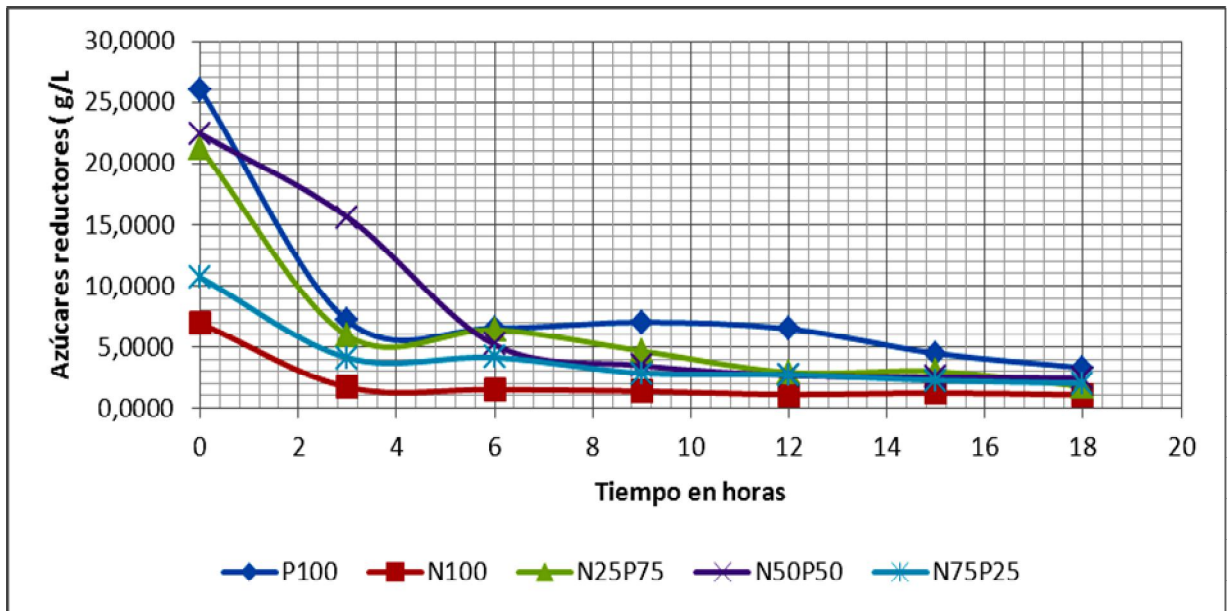


Figura 33. Contenido de azúcares reductores residuales en g/L.

Al evaluar la producción de biomasa (tabla 8, figura 34), en los cinco sustratos, se observó al final de la fermentación una alta producción de biomasa en P100 y N75P25 en N100 se observó la menor producción de biomasa, estos resultados son proporcionales a los observados en la tabla 8 y gráfica 35, en donde en P100 registra los mayores conteos celulares y el menor registro es para N100.

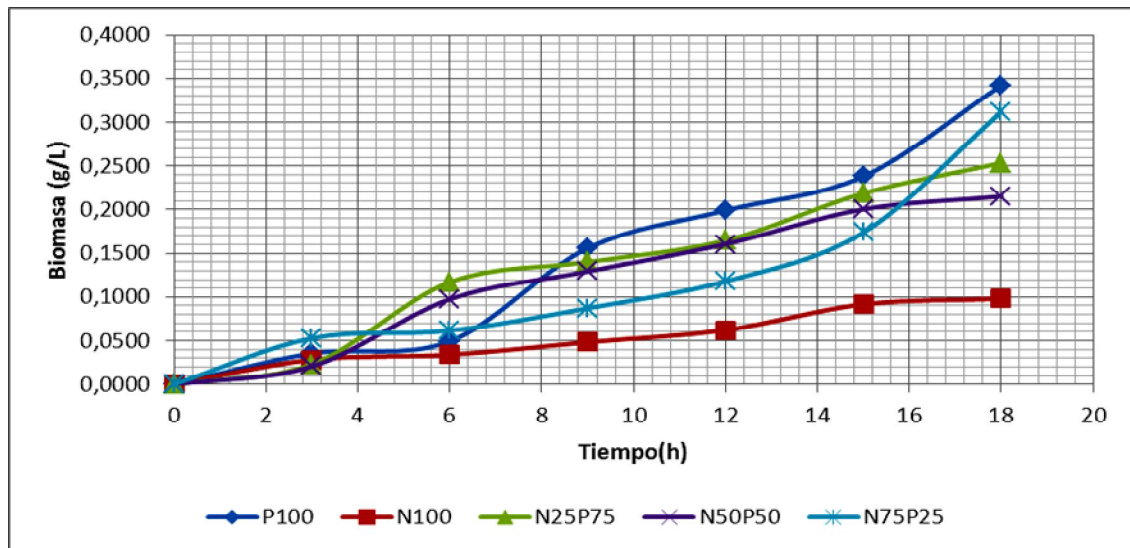


Figura 34. Contenido de biomasa (g/l).

Los resultados para P100 son satisfactorios ya que indica que la levadura se acopló mejor este medio indicando que los residuos de papa hidrolizados previamente es un excelente sustrato para el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Para N100, el crecimiento celular es el más bajo, este comportamiento viene condicionado por el contenido de azúcares reductores obtenidos desde la hidrólisis química por las razones ya expuestas pero además en la producción de biomasa en sustratos derivados de cáscara de naranja, la biomasa obtenida puede ser baja debido a la no eliminación de sustancias inhibidoras como el limoneno, componente mayoritario del aceite de las cáscara de naranja, ya que presenta actividad antimicrobiana, tal como lo expone Patrik, et al. (2012); posiblemente la levadura *Saccharomyces Cerevisiae* es susceptible a esta sustancia, ya que no se eliminó la grasa del residuo pudiendo afectar el crecimiento durante la fermentación, si se tiene en cuenta que en la caracterización de la materia prima, el porcentaje de grasa como extracto etéreo fue de 0,902 %.

La biomasa para la combinación porcentual N75P25 presentó un alto valor al igual que el conteo celular, comportamiento que no era el esperado de acuerdo a la prueba de Tukey; se deduce entonces que la levadura debió consumir hasta agotar todos los azúcares reductores existentes en el medio de fermentación principalmente los provenientes de la hidrólisis de almidón, promoviendo el aumento celular. Para las combinaciones N25P75 y N50P50, los resultados de biomasa y conteo celular son concordantes indicando ser medios aptos para el crecimiento de la levadura. Aunque los resultados de conteo celular y biomasa, se consideran satisfactorios (excepto para N100), se concluye que el tiempo de fermentación (18 h), no fue suficiente para obtener mejores resultados, algunos autores como Chalon, *et al.* (2013), recomiendan un tiempo de 24 horas para obtener un peso seco (g/L) de levadura *saccharomyces cerevisiae* de 1.23 g/L a partir de residuos de alimentos, 1.68 g/L en medios rico en glucosa y en medios de melaza 1.42 g/L. Un análisis adicional de la figura 35, indica que el crecimiento celular fue constante en las seis primeras horas de fermentación, relacionando este comportamiento con la fase de adaptación del microorganismo, después de este tiempo se observa un incremento en el número de células de levadura, lo que indica el comienzo de la fase Log o de crecimiento exponencial que se prolonga hasta la hora 18, también se observa que no hay declive de las curvas de crecimiento, asumiendo que el crecimiento de la levadura durante el tiempo total de fermentación (18 horas) aun prosigue en la fase Log.

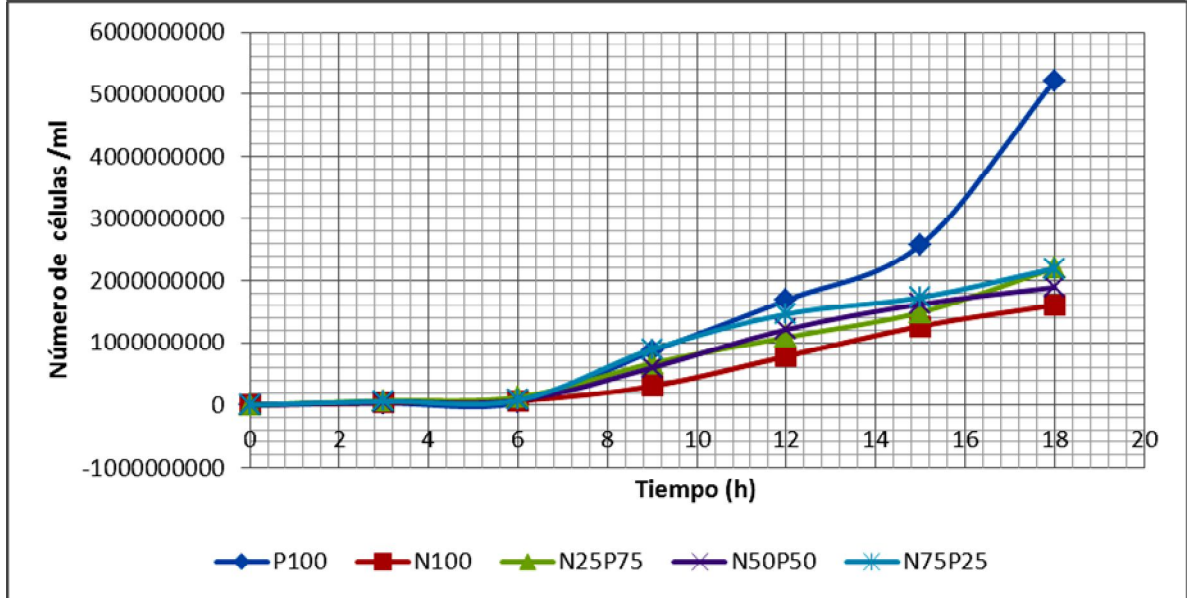


Figura 35: Conteo de células de levadura (número de células/ml). Fuente: autor del proyecto.

4.4 CONTENIDO PROTEÍNA UNICELULAR (SCP)

Las tablas 8-9 y la figura 36 se observan los resultados para el contenido de proteína unicelular (SPC) en mg/ml a partir del método de Bradford. De acuerdo al comportamiento de la gráfica 9, se observa una producción progresiva del contenido de proteína en los sustratos que tienen residuos de papa (P100, N25P75, N50P50, N75P25), este comportamiento no se observa para N100. Si se hace una comparación entre las figuras 33, 34, 35 se observa que la producción de proteína guarda relación proporcional.

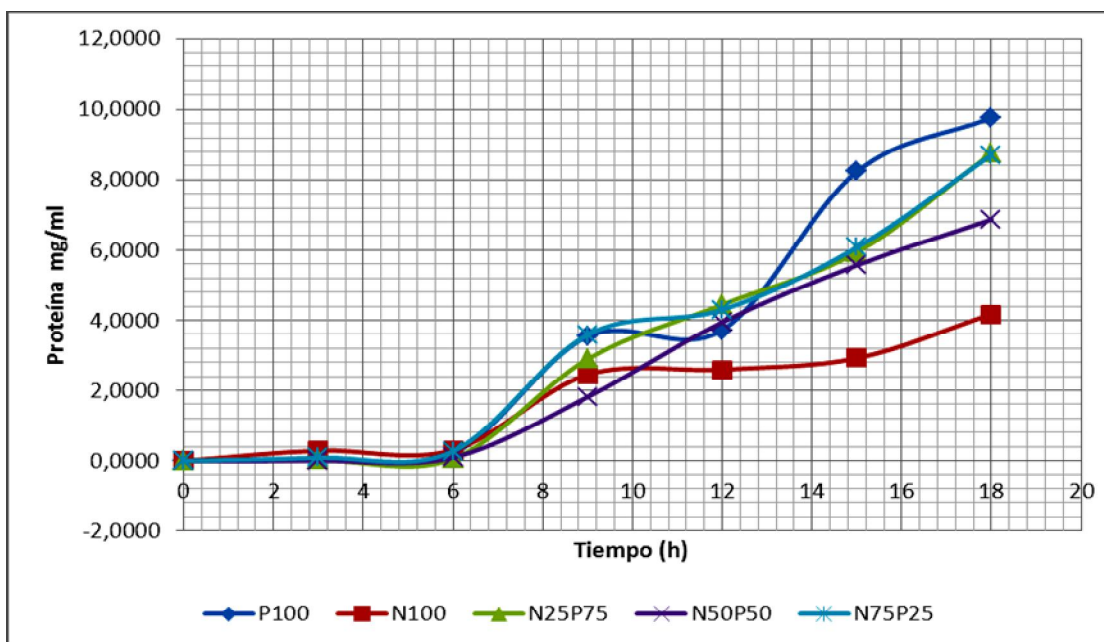


Figura 36. Contenido de proteína unicelular (SPC) en mg/ml. Fuente: autor del proyecto.

El análisis estadístico (tabla 10), confirma lo expuesto anteriormente, al hacer el análisis ANOVA, se observa que hay diferencia significativa entre naranja y papa (N100 Y P100), pero en las combinaciones porcentuales no hay diferencias significativas (N25P75, N50P50, N75P25), para un valor $P = 0.000$ a un nivel de significancia del 5% ($n=3$); en otros términos, estos sustratos producen la misma cantidad de proteína a excepción de N100, esto conlleva a confirmar la hipótesis H_a : "La producción de proteína unicelular, SCP, (mg/ml) obtenida a partir del crecimiento de la levadura *Saccharomyces Cerevisiae* sobre los sustratos fermentables de los residuos de naranja (*Citrus sinensis L var valencia*), papa (*Solanum tuberosum*) variedad Diacol Capiro (R-12) y las combinaciones porcentuales de estos, difieren entre sí (presentan diferencias significativas), o por lo menos una de ellas difiere de las demás".

Los resultados de la prueba de Tukey de la tabla 11 (valores marcados con asterisco indican pares de medias que son significativamente diferentes), indicó que el crecimiento de levadura sobre sustrato N100 produce una cantidad de proteína unicelular diferente comparada con los sustratos P100, N25P75, N50P50 y N75P25. Cuando la

levadura crece sobre sustratos P100, N25P75, N50P50 y N75P25, la cantidad de proteína unicelular no difiere significativamente, es decir, estos sustratos pueden producir la misma cantidad de proteína a las condiciones del experimento. Por lo tanto, se determina que los mejores sustratos para la producción de proteína unicelular SPC a partir de residuos de residuos de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis L var valencia*) y papa (*Solanum tuberosum*) variedad Diacol Capiro (R-12) es cuando se toma residuos de papa al 100% (P100) y combinaciones porcentuales de N25P75, N50P50 y N75P25, pero a la luz de los resultados obtenidos, se considera a P100 como el mejor sustrato para el crecimiento y adaptación de la levadura y para la producción de SPC.

Para futuras investigaciones con residuos de cáscara de naranja y papa, se recomienda verificar la hidrólisis completa de los polisacáridos, ya que cuando se inocula sustratos ricos en sustancias de celulosa y almidón, la producción de proteína puede ser bajo, debido a la carencia de enzimas como celulasas y amilasas por parte de la levadura *Sacharomyces cerevisiae*, que le ayuden a hidrolizar estos polisacáridos y así favorecer su crecimiento, este hecho lo expone Gélinas, *et al.* (2007), quien obtuvo un 42% de proteína en 8.3 horas de fermentación en un medio de glucosa, pero cuando en las mismas condiciones fermentó residuos de papa ricos en almidón y celulosa, la producción de proteína bajó considerablemente 8.7%.

Es importante, en este apartado del trabajo, decir que existen diferentes metodologías que pueden utilizarse para la cuantificación de las proteínas, tal como lo expone Silverico, *et al.* (2012): existen métodos espectroscópicos (para determinar aminoácidos aromáticos como triptófano, tirosina y fenilalanina porque absorben la luz en el ultravioleta a 275-280 nm; métodos químicos por ejemplo el método de Kjeldahl, el cual se basa en la determinación del total contenido de nitrógeno y los métodos colorimétrico (basado en la reacción entre algunos grupos funcionales de las proteínas y reactivos cromogénicos que producen complejos de color). Entre estas metodologías, el método colorimétrico propuesto por Bradford, es el más actualmente utilizado para la cuantificación de proteínas, debido a su sensibilidad, rapidez y sencillez. Este ensayo implica la unión del colorante azul de

Coomassie G-250 y los enlaces peptídicos de las proteínas. En la práctica, una solución ácida de Coomassie se añade a una solución de proteína, y la absorbancia de la mezcla resultante se mide a 595 nm y se comparó con la absorbancia de la solución colorante libre (sin proteína).

De acuerdo a la literatura consultada, no se encontró resultados de investigaciones semejantes para presentar una comparación de resultados, esto debido a que las investigaciones sobre el tema de este trabajo, la determinación de proteína se realiza, en la mayoría de los casos por el método de Kjeldahl, el cual expresa su resultado en porcentaje (%) y no en mg/ml. En esta investigación se seleccionó trabajar el método colorimétrico de Bradford, debido a que este método se ha aplicado en diferentes áreas en estudios ambientales y alimentario, composición de proteínas, en la investigación médica y en otras aplicaciones, el cual presentan ventajas tales como una buena selectividad, estabilidad del reactivo, y lineal útil rango dinámico, tal como lo expone Oseas Da Silva, *et al.* (2006). Los resultados de la investigación de este autor, conllevan a realizar una comparación de los resultados obtenidos en este trabajo, al decir que los resultados de la tabla 5 para proteína (mg/ml), son superiores (incluso N100) a los obtenidos al estudiar el contenido de proteína en semillas de leguminosas, tal como se observa en la figura 37.

Resultados Obtenidos sistema de flujo propuesto y procedimiento Bach (método original de Bradford) para muestras diferentes (n=3)		
Muestra	Concentración de Proteína	
	sistema de flujo (mg/ml)	procedimiento Bach (mg/ml)
Senna alexandrina leaves	1.8±0.1	1,9±0.1
castaño de indias en polvo	2.24±0.05	2.24±0.07
Plasma sanguíneo humano	43±1	45±1

Figura 37. Contenido de proteína (mg/ml) obtenida por el método de Bradford, según Oseas, *et al.*, (2006). Mechanization of the Bradford Reaction for the spectrophotometric Mechanization of the Bradford Reaction for the spectrophotometric. Analytical Biochemistry, 351, 155-157..

El método de Bradford se seleccionó en esta investigación, por su alta sensibilidad, rapidez y sencillez pero también porque cuantifica el número de enlaces peptídico; éste método, por ser espectrofotométrico, cuantifica las transiciones electrónicas del enlace peptídico y transiciones electrónicas del complejo de cobre / uniones peptídica, dando así una medida directa del número de uniones de aminoácidos y un valor real del contenido de proteína de la muestra, Kamizake, *et al.*(2003), en esta misma investigación, en estudios con leche en entera en polvo y leche descremada en polvo, se determinó el contenido de proteínas totales mediante este método dando resultados similares pero más precisos al compararlos por el método Kjeldahl, pero argumentaron que al emplear el método de Bradford se evita las desventajas que presenta el método oficial. Para estos mismos autores el método de Kjeldahl, presenta dos principales desventajas al emplear largos periodos de tiempo para su desarrollo y la necesidad de llevar a cabo dos análisis para determinar la diferencia entre el nitrógeno no proteico (NPN) y la proteína total (nitrógeno total, TPN).

4.5 PARÁMETROS CINÉTICOS

De acuerdo a los resultados de la tabla 12, se obtuvieron los valores promedios de velocidad específica ($\mu\text{x h}^{-1}$) de los cinco tratamientos de forma independiente.

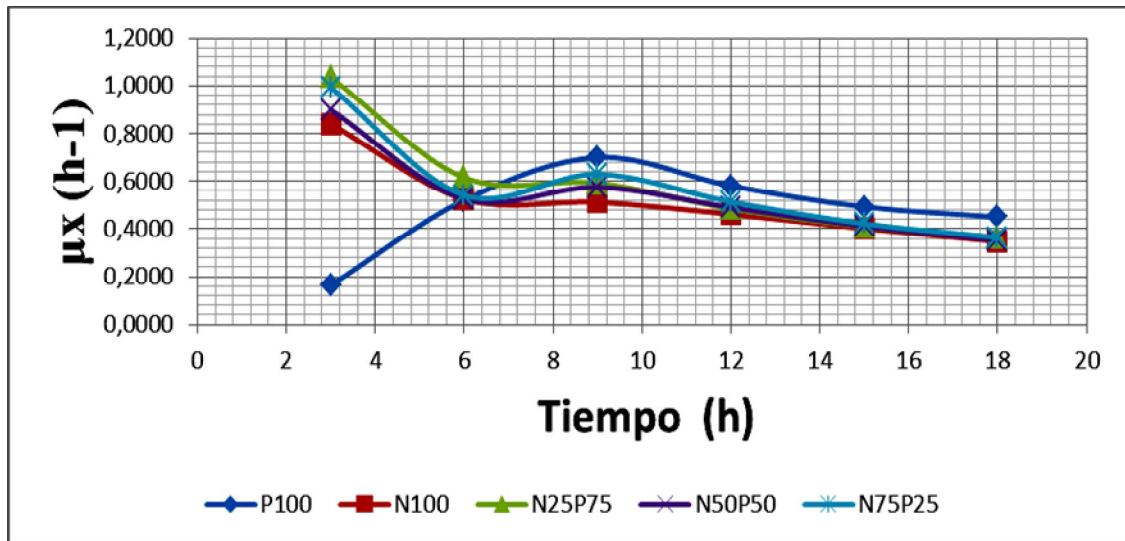


Figura 38. Velocidad de crecimiento microbiano. Fuente: autor del proyecto.

En la gráfica 38, se presenta el comportamiento del número de células de *saccharomyces Cerevisiae* en las 18 horas de fermentación. La tabla 12 y gráfica 38, indica que P100 proporciona una velocidad en promedio de 0,48 siendo el valor más bajo frente a los demás tratamientos, resultado que no es el esperado, ya que aquí se debió obtener una velocidad específica superior de acuerdo a los resultados de fermentación ya analizados, mientras que los demás tratamientos presentaron velocidades semejantes; estos valores guardan similitud a los presentados por Kasavi, *et al.* (2012), en donde relaciona una velocidad específica, μ_x , (h^{-1}) de 0.55 para varias cepas de levadura sobre un medio de glucosa, peptona y extracto de levadura (YDP), deduciendo que estos sustratos ofrecen condiciones favorables de crecimiento; este mismo autor comparó la velocidad cuando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* crece sobre piel de papa dando una velocidad específica, μ_x (h^{-1}), de 0.74, valor muy superior al obtenido en esta investigación (0.48), valor que se atribuye a errores experimentales durante el proceso de fermentación y toma de datos. Pero otros autores han presentado en investigaciones más recientes velocidades de crecimiento específico, μ_x (h^{-1}), de 0.31 para la levadura en mención en residuos de alimentos, Chalon, *et al.*, (2013), lo que

conduce a deducir que el valor obtenido en P100 es satisfactorio eliminando las variables de ruido y errores humanos que pudieron influir en la toma de datos.

La factibilidad económica de algunos procesos biotecnológicos depende básicamente del costo de la materia prima. En la práctica, la selección de un microorganismo con elevado rendimiento de sustrato en biomasa favorece la productividad del proceso. Generalmente, cuando el sustrato es el factor limitante del crecimiento, la cantidad de biomasa producida es proporcional a la cantidad de fuente de carbono consumida (Fajardo, *et al.* 2007). En relación al rendimiento de biomasa $Y_{x/s}$, (g/g), los datos obtenidos en rendimiento de biomasa en cada uno de los sustratos (N100, P100, N75P25, N50P50 Y N25P75) que se presentan en la tabla 9, se observa claramente que el sustrato P100 presentó el mejor rendimiento en comparación que los demás. Por lo tanto, para este cultivo, el rendimiento de biomasa a partir de sustrato se define como el valor que representa la cantidad de biomasa producida por unidad de sustrato consumido, por lo tanto, para P100, un gramo de este sustrato podría producir en promedio 0,23 gramo de biomasa en 0.48 horas (28.8 minutos), confirmando para esta investigación que el mejor sustrato para la producción de SPC es P100.

5. CONCLUSIONES

Los residuos cáscaras de naranja (*Citrus sinensis L var valencia*) y papa (*Solanum tuberosum*) variedad Diacol Capiro (R-12) son sustratos potencialmente ricos en metabolitos fermentables, ya que poseen un alto contenido de polisacáridos representados en almidón y celulosa.

Los sustratos usados poseen una alta cantidad de polisacáridos en términos de almidón y celulosa, la hidrólisis de estos aumenta el contenido de azúcares reductores convirtiéndoles en excelentes sustratos ricos en azúcares fermentables para procesos biotecnológicos.

Para mayor aprovechamiento de los residuos de cáscara de naranja, en una hidrólisis química, se debe ajustar el tiempo del proceso, el cual se considera que no fue el suficiente, lo que contribuyó a que los residuos N100 y N75P25, presentaran una baja concentración de azúcares reductores, frente a los demás tratamientos.

De acuerdo a los resultados de la hidrólisis química, los mejores sustratos para la producción de azúcares reductores son P100, N25P75 y N50P50, estos sustratos tienen en común una alta cantidad de residuos de papa Diacol Capiro (R-12), lo que significa que la hidrólisis química aplicada fue efectiva para hidrolizar el almidón presente en estos residuos.

De acuerdo a los resultados de la hidrólisis química, los sustratos N100 y N75P25 son los sustratos que menos azúcares reductores poseen (21,66 % y 23.49% respectivamente); estos valores pueden ser superiores si se diseña un buen protocolo de hidrólisis de celulosa, hemicelulosa y lignina.

El tiempo de fermentación aplicado no fue suficiente para el consumo total de los azúcares reductores presentes en los cada uno de los sustratos, esto afectó la producción de biomasa y crecimiento celular, los cuales pudieron ser mayores.

Los mayores resultados de biomasa y conteo celular se obtuvieron para los tratamientos P100, N25P75, N50P50, N75P25. Para N100 este resultado fue menor, atribuyéndose a la baja cantidad de azúcares reductores y la posible existencia de sustancias inhibidoras de crecimiento celular como el limoneno; si bien se tiene en cuenta que a los residuos de cáscara de naranja en fresco, no se les realizó inicialmente la eliminación de este tipo de compuestos.

La producción de proteína unicelular SPC guarda una relación directa con el contenido de azúcares reductores presentes al inicio de la fermentación. En los sustratos que tuvieron contenidos altos de azúcares reductores (P100, N25P75, N50P50, N25P75), el crecimiento celular fue alto y así mismo la producción de proteína.

El análisis de los parámetros cinéticos afirma que el sustrato P100 es el mejor sustrato para la producción de SPC porque puede producir en promedio 0,23 gramo de biomasa en 0.48 horas (28.8 minutos) y 9.8 mg/ml de proteína, frente a N25P75, N50P50, N25P75, que aunque dieron resultados satisfactorios para la producción de proteína, tuvieron un coeficiente de $Y_{x/s}$ inferior.

6. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

- Arapoglou, D., Varzakas, Th., Vlyssides, A., Israilides, C., (2010). Ethanol production from potato peel waste (PPW). *Waste Management*, 30, 1898-1902.
- Arapoglou, D., Vlyssides, A., Varzakas, Th., Haidemenaki, K., Malli, V., Marchant, R., Israilides, C. (2009). Alternatives ways for potato industries waste utilisation. *International Conference on Environmental Science and Technology*, , 54-61.
- Arocha, M., Rosell, C (2011). Physicochemical properties and enzymatic hydrolysis of different starches in the presence of hydrocolloids. *Carbohydrate Polymers*, 85, 237-244.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72, 248–254.
- Benedict, C., Okeke, W., Frankenberger, Jr (2005). Use of starch and potato peel waste for perchlorate. *Science of the Total Environment*, 347, 35-45.
- Bian, J., Peng, F., Xu, F., Sun, R., Kennedy, J (2010). Fractional isolation and structural characterization of hemicelluloses from *Caragana korshinskii*.
- Bicu, I., Mustata, F. (2011). Cellulose extraction from orange peel using sulfite digestion reagents. *Bioresource Technology*, 102, 10013-10019.
- Binder, J., Raines, R. (2010). Fermentable sugars by chemical. *PNAS*, 107 (10), 4516-4521), Tejada, et al., (2011).
- Carballo, L., Arteaga, Y. (1972). Hemicelulosas de Madera. Consultado en 04-22-2013 en <http://www.monografias.com/trabajos46/hemicelulosas-maderas/hemicelulosas-maderas2.shtml>.
- Carvalho, T., Palma, D., Ferreira, R, Franci, M. (2012). Optimization of solid state fermentation of potato peel for the production of cellulolytic enzymes. *Food Chemistry*, 133, 1299-1304.
- Cardona, C. Sánchez, O. Ramirez, J. Alzate, R. (2004). Biodegradación de residuos orgánicos en plazas de mercado. *Revista colombiana de biotecnología*, Vol VI. No 2. 2004, 78-89.
- Chacón, A (2004). Perspectivas actuales de la proteína unicelular (SCP) en la agricultura y la industria. *Agronomía Mesoamericana*, 15, 93-106.

- Chanda, S., Chakrabarti, S (1996). Plant origin liquid waste: A resource for single cell protein production by yeast. *Bioresource Technology*, 57, 51-54.
- Chander, R., Gupta, R., Pal, Y., Singh, A., Percival, Y (2011). Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects . *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15, 4950-4962.
- Chen,D., Lawton, D., Thompson, M., Liu, Q (2012). Biocomposites reinforced with cellulose nanocrystals derived. *Carbohydrate Polymers*, 90, 709-716.
- Chiaromonti, D. Prusii, M., Ferrero, S., Oriani, L., Ottonello, P., Torres, P., Cherchi, F. (2012). Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. *Biomass & Bioenergy*, 1 (11), 1-11.
- Chimicam (2012). Polisacáridos. Consultado en 04-22-2013 en <http://www.chimicamo.org/chimica-organica/polisaccharidi.html>.
- Chalon, M., Terán, V., Arena, M., Oliszewki, R., González, S. (2013). Microbiological culture broth designed from food waste. *Journal of Environmental Management*, 115, 1-4.
- Choi, M., Ji, G., Hee, K., Ryu, Y., Hyun, Do., Park, Y (2002). Use of waste Chinese cabbage as a substrate for yeast biomass production. *Bioresource Technology*, 83, 251-253.
- Choi, M., Park, Y. (2003). Production of yeast biomass using waste Chinese cabbage. *Biomass and Bioenergy*, 25, 221-226.
- Diaz, M. Semprun, A. Gualteri, M (2003). Producción de proteína unicelular a partir de desechos de vinaza. *Revista de la Facultad de Farmacia ULA*, 45(2), 23-26.
- Fajardo, E., Sarmiento, S. (2007). Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae* (Tesis de Trabajo de grado, Pontificia Universidad Javeriana).
- Galankis, C. (2012). Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology*, 68 87.
- Gámez, S., González, J., Ramírez., Gil, M (2006). Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. *Journal of Food Engineering*, 74, 78-88).

- Gao, M., Yano, S., Inoue, H., Sakanishi, K (2012). Production of ethanol from potato pulp: Investigation of the role of the enzyme from *Acremonium cellulolyticus* in conversion of potato pulp into ethanol. *Process Biochemistry*, 47, 2110-2115.
- Gélinas, P., Barrette, J. (2007). Protein enrichment of potato processing waste through yeast fermentation. *Bioresource Technology*, 98, 1138-1143.
- Ghorbanpour, A., Miccio, M (2012). Comparison of batch, fed-batch and continuous well-mixed reactors for enzymatic hydrolysis of orange peel wastes. *Process Biochemistry*, 37, 1588-1594.
- Giraldo, M., López. (2008). Producción de proteína unicelular a partir de desechos agroindustriales. *Virtual Pro*. Consultado en 10-10-2011 en http://www.revistavirtualpro.com/files/TI07_200811.pdf.
- Gil, R., Domínguez, R., Pacho, J (2008). Bioproducción de ácido láctico a partir de residuos de cáscara de naranja: Procesos de separación y purificación. *Tecnol Ciencia*, 23 (2), 79-90.
- Grohmann, K., Cameron, R., Buslig, B (1995). Fractionation and pretreatment of orange peel by diluted acid hydrolysis. *Bioresource Technology*, 95, 129-141.
- Huang, C., Chen, X., Xiong, L., Chen, X., Che, Y. (2013). Single cell oil production from low-cost substrates: The possibility and potential of its industrialization. *Biotechnology Advances*, 31, 129-139.
- Heerden, I., Cronje, C., Swart, S., Kotzé, J (2002). Microbial, Chemical and physical aspects of citrus waste composting. *Bioresource Technology*, 81, 71-76.
- Kang, E., Min, B., Hwang, H., Kim, J (2012). Analysis of mono-sugars obtained by acid hydrolysis of algae-based polysaccharides. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 18, 1366-1369.
- Kamizake, N., Goncalves, M., Zaia, C., Zaia, D (2003). Determination of total proteins in cow milk powder samples: a comparative study between the Kjeldahl method and spectrophotometric methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16, 507-516.
- Kasavi, C., Finore, I., Lama, L., Nicolaus, B., Oliver, S., Toksoy, E., Kirdar, B. (2012). Evaluation of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol production from biomass. *Biomass and Bioenergy*, 45, 230-238.
- Kruger (n.d). The Bradford Method for Protein Quantitation. *The Protein Protocols Handbook*, 2nd Edition, 15-21.

- Lian., J. Chen, S., Zhou, S., Fallon, J., Li, C., Garcias, M. (2010). Separation, hydrolysis and fermentation of pyrolytic sugars to produce ethanol and lipids. *Bioresource Technology*, 101, 9688-9699.
- Lenihan, P., Neill, E., Rooney, D. Walker, G. (2010). Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Chemical Engineering Journal*, 156, 395-403.
- Maldonado, N., Toala, L., Guerrero, G., Valdez, J., Murillo, J (2013). Laboratorios de Bioquímica. Consultado en 04-22-2013 en <http://es.scribd.com/doc/19046859/hidrolisis-acida-y-enzimatica-del-almidon>.
- Marini, I (2013). Dos enzimas hidrolíticas y un enfoque epistemológico e histórico. Consultado en 04-21-2013 en <http://www.scienceinschool.org/print/2887>.
- Martín, M, Siles, J., Chica, A., Martín, A (2010). Biomethanization of orange peel waste. *Bioresource Technology*, 101, 8993-8999.
- Mars, A., Veuskens, T., Budde, M., Doeveren, P., Lips, S., Bakker, R., Vrije, T., Claaseen, P (2010). Biohydrogen production from untreated and hydrolyzed potato steam peels by the extreme thermophiles *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermotoga neapolitana*. *International Journal of hydrogen energy*, 35, 7730-7737.
- Mahmood, A., Greenman, J., Scragg, H (1998). Orange and potato peel extracts: Analysis and use as *Bacillus* substrates for the production of extracellular enzymes in continuous culture . *Enzyme and Microbial Technology*, 22, 130-137.
- Miller, G. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31 (3), 426-429.
- Monsalve, J. Et al. (2006). Producción de etanol a partir de la cáscara de banano y de almidón de yuca. *Revista de la Facultad de minas DYNA. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Vol 73. No 150, 21-27.*
- Montgomery, D (2002). *Diseño y Análisis de experimentos*. México: Limusa Wiley.
- Moreno, s., Bernal, B., (1996). *Diseño de Birreactores y enzimología*. Universidad de Murcia.
- Mussatto S., Dragone, G., Fernandes, M. Rocha, I. (2006). Efecto de los tratamientos de hidrólisis ácida e hidrólisis alcalina en la estructura del bagazo de malta para liberación de fibras de celulosa. XXXII IA C ChE (CIIQ), V CAIQ, 1-10.
- Official Methods of Analysis AOAC, 1990, Método 964.22: Determinación de

humedad y materia seca.

Official Methods of Analysis AOAC, 1990, Método AOAC 920.39: Determinación porcentaje de grasa método Soxhlet.

Orozco, R., Redwood, D., Leeke, G., Bahari, A., Santos, R., Macaskie, L (2012). Hydrothermal hydrolysis of starch with CO₂ and detoxification of the hydrolysates with activated carbon for bio-hydrogen fermentation. International journal of hydrogen energy, 37, 6545-6553.

Ortiz, F. (2012). Módulo de Biotecnología alimentaria. Universidad Nacional Abierta y a Distancias UNAD.

Oseas Da Silva, M., Zezzi, M., (2006). Mechanization of the Bradford Reaction for the spectrophotometric. Analytical Biochemistry, 351, 155-157.

Pant, D., Van Bogaert, G., Diels, L., Vanbroekhoven, K (2010). A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) . Bioresource Technology, 101, 1533-1543

Plessas, S. Bekatorou, A. Koutinas, A. Soupioni, M. Banat, I., Marchant, R. (2007). Use of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized on orange peel. Bioresource Technology, 98, 860-865.

Quintero, J. (2008). Deshidratación de etanol con materiales adsorbentes de origen amiláceo y celulósico (Tesis de Maestría en Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia, Sede Manizales.

Quintero, R. (2008). Uso de Biomasa: hidrólisis paso fundamental. Campinas, Sao Pablo. Unidad Cuajimalpa.

Ravindra, A (2000). Value-added Food: Single Cell Protein. Biotechnology Advances, 18, 459-479.

Rezzadori, K., Benedetti, S., Amante, E. (2012). Proposals for the residues recovery: Orange waste as raw material for new products. Food and Bioproducts Processing, 90, 606-614.

Patrik, R., Ylittervo, P., Larsson, C., Edebo, L., Taherzadeh, M. (2012). Growth tolerance of Zygomycetes *Mucor indicus* in orange peel hydrolysate without detoxification. Process Biochemistry, 47, 836-842.

Silva, C., Arcuri, S., Campos, C., Vilela, D., Alves, J., Schwan, F. (2011). Using the residue

- of spirit production and bio-ethanol for protein production by yeasts. *Waste Management*, 31, 108-114.
- Silverico, S., Moreira, S., Milagres, A., Macedo, E., Teixeira, J., Mussatto, S. (2012). Interference of some aqueous two-phase system phase-forming components in protein determination by the Bradford method. *Analytical Biochemistry*, 421, 719-724.
- Stabnikova, O., Wang, J., Ding, H., Tay, J (2005). Biotransformation of vegetable and fruit processing wastes into yeast biomass enriched with selenium. *Bioresource Technology*, 96, 747-751.
- Sun, Y., Cheg, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83, 1-11.
- Tejeda, L. Quintana, J. Pérez, J. Young, H.: (2011). Obtención de etanol a partir de residuos de poda. *U.D.C.A Act. & Div. Cient.*, 14 (1), 111- 116
- Tejeda, L., Tejeda, C., Villabona, A., Alvear, M., Castillo, C., Henao, D., Marimón, W., Madariaga, N., Taron, A (2010). Producción de etanol a partir de la fermentación alcohólica de jarabes glucosados derivados de cáscaras de naranja y piña. *Revista Educación en Ingeniería*, 10, 120-125.
- Wang, H., Zhang, Ch., He, H., Wang, L (2012). Glucose production from hydrolysis of cellulose over a novel silica catalyst under hydrothermal conditions . *Journal of Environmental Sciences*, 24, 473-478.
- Wijngaard, H., Ballay, M., Brunton, N. (2012). The optimization of extraction of antioxidants from potato peel by pressurised liquids. *Food Chemistry*, 133, 2012-1130.
- Wikipedia (2013). Hemicelulosa. Consultado en 04-21-2013 en <http://es.wikipedia.org/wiki/Hemicelulosa>.
- Wood, I., Adam Elñiston A., Ryden, P., Bancroft, I., Roberts, I., Waldron, K. (2012). Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay . *Biomass and Bioenergy*, 44, 117-121.
- Zamora, A. (2013). Carbohidratos o Glúcidos - Estructura Química. Consultado en 04-22-2013 en <http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohidratos2.html>.

- Zanariah, S., Ahmad, I., Kargarzadeh, H., Abdullah, I., Dufresne, A. (2013). Potential of using multiscale kenaf fibers as reinforcing filler in cassava starch-kenaf biocomposites. *Carbohydrate Polymers*,
- Zhan, J., Lin, H., Shen, Q., Zhou, Q., Zhao, Y (2012). Potential utilization of waste sweetpotato vines hydrolysate as a new source for single cell oils production by *Trichosporon fermentans* . *Bioresource Technology*, 1-8.
- Zhu, G., Zhu, X., Fan, Q., Wan, X (2011). Recovery of biomass wastes by hydrolysis in sub-critical water. *Resources, Conservation and Recycling*, 55, 409-41.
- Zhou, N., Zhang, Y., Wu, X., Gong, X., Wang, Q. (2011). Hydrolysis of *Chlorella* biomass for fermentable sugars in the presence of HCl and MgCl₂. *Bioresource Technology*, 102, 10150-10161.
- Zor, T., Selinger, Z. (1996). Linearization of the Bradford Protein Assay Increases Its. *Analytical Biochemistry*, Vol 236, 302-308.

11. ANEXOS

ANEXO 1. FICHA TÉCNICA LEVADURA *Saccharomyces Cerevisiae*



PRODUCTO	CONTENIDO	EMBALAJE
levadura seca	500g	50
levadura seca	12 x 175 g	144
levadura seca (display)	25 x 7 g	1000
levadura seca	12.5 Kg	1

DEFINICIÓN: Es un microorganismo vivo que es reproducido en forma industrial, mediante un proceso de fermentación.

COMPONENTES: *Saccharomyces Cerevisiae* y agua.

ASPECTO: Gránulos de color café.

PRESENTACIÓN: sachet de 12.5 Kg, 500 g, 175 g y 7 g

USO: Para productos de panadería, bollería y pizzas.

DOSIFICACIÓN: Según formulación.

VENTAJAS:

- No necesita refrigeración.
- Mayor tiempo de vida útil.

CONSERVACIÓN: En un lugar fresco y seco. Tiempo de vida 1 año.

DILUCIÓN: Agua a una temperatura de 30°C. Dejar reposar hasta que esponje completamente.

ANEXO 2. PROTOCOLOS DE LABORATORIO PARA LA CARACTERIZACIÓN MATERIA PRIMA

2.1 DETERMINACION DE HUMEDAD Y MATERIA SECA (AOAC, 1990)/ 964.22.

Materiales: Crisoles o cápsulas de porcelana: se deben desecar a 100°C x2h, tomar con pinzas de crisol y registrar el peso vacío.

Procedimiento: Para la determinación de la humedad se pesan aproximadamente 5.0 g de muestra en una balanza de precisión dentro de una cápsula previamente tarada, desecándose a 110°C en estufa, hasta alcanzar un peso constante. La pérdida de peso se considerada como el contenido de humedad y el residuo desecado del alimento se considera la materia seca. Los resultados obtenidos se expresan porcentualmente.

Cálculos:

$$\%H = (\text{gramos de agua}/b)*100$$

Donde b la masa (g) de la muestra tomada para el análisis

$$\text{Gramos de agua} = m(\text{alimentos})_{\text{inicial}} - m(\text{alimentos})_{\text{seco}}$$

Porcentaje de Materia Seca:

$$\%MS = m(\text{alimentos})_{\text{seco}} * 100/b$$

2.2 DETERMINACION DE GRASA (AOAC 1990/ 920.39)

Materiales

- Equipo de extracción soxhlet
- N-hexano
- Papel filtro
- balanza
- horno

Procedimiento: Para la determinación de grasa, por este método, se debe usar muestras deshidratadas. El solvente orgánico, por ebullición, asciende a la parte superior del extractor del equipo soxhlet. Allí se condensa por refrigeración con agua y cae sobre la muestra, regresando posteriormente al matraz por sifón, arrastrando consigo la grasa.

- Pesar el papel filtro, pesar 5 gramos de muestra, colocarlas en el papel filtro.
- Colocar la muestra en el extractor del equipo soxhlet.
- En el balón agregar 250 ml de n-hexano, previamente se ha pesado.

- Calentar suavemente hasta 68-70°C
- El solvente se evapora y luego se condensa y cae sobre la muestra
- Cuando el extractor se llene de n-hexano, retronará al balón, es un primer ciclo o sifón.
- Realizar 4 ciclos, aproximadamente 4 horas.
- Realizar una destilación simple para separar el solvente de la grasa
- Evaporar el residuo de n-hexano en estufa y pesar el balón.

Cálculos:

$$\% \text{grasa} = \frac{\text{peso del matraz con grasa} - \text{peso del matraz vacío}}{\text{Gramos de muestra}} * 100$$

2.3 DETERMINACIÓN DE ALMIDÓN MÉTODO VON ASBOTH (Quintero, J., 2008).

Materiales: Balones aforados de 125 ml, Estufas, Morteros, Probetas, Agitadores, Vasos de precipitado de 100 ml, Buretas

Reactivos

Hidróxido de bario libre de carbonatos.

HCl 0.1 Valorado

Fenolftaleína

Etanol al 45%

Procedimiento

1. Preparar una solución de hidróxido de bario así: 0.05 M 60 ml en agua destilada hervida y fría. Pesar el soluto a la mayor brevedad, para evitar contaminación por carbonatos. Pesar para 60 ml 0.945 gramos y diluirlos en 60 ml.
2. Tomar 25 ml de hidróxido de bario y valorarla con HCL 0.1N (verificado). Este será el volumen del blanco: tomar los 25 ml de hidróxido de bario en un vaso de precipitado y adicionarles 5 gotas de fenolftaleína. en una bureta, colocar HCl 0.1 N, y titular gota a gota a hasta que desaparezca el color. Anotar le volumen de ácido gastado.
3. En un mortero pesar 1.5 gramos de muestra desengrasada , triturar con la adición de pequeñas porciones sucesivas de agua hirviente hasta completar un volumen de 50 ml.
4. Calentar durante 30 minutos en un baño María hirviente con agitación intermitente toda la solución anterior.
5. Dejar enfriar, añadir 25 ml de solución valorada de hidróxido de bario y agitar durante dos minutos.
6. Dejar en reposo 10 minutos hasta obtener sedimentación,
7. Adicionar 50 ml etanol al 45% hasta para un volumen total 125 ml

8. Si el líquido sobrenadante no es claro se debe filtrar con lana de vidrio contenida en un tubo.
9. Tomar 25 ml de filtrado claro y titular el exceso de hidróxido de bario con ácido clorhídrico 0.1 N y fenolftaleína como indicador; el volumen de ácido consumido será el volumen requerido para la muestra. Realizar cálculo para determinar el porcentaje de almidón.

➤ CÁLCULOS

Cálculo para determinar el porcentaje de almidón en la muestra analizada.

$$\% \text{ Almidón} = \frac{(V \text{ Blanco} - V \text{ Muestra}) \times N \text{ Acido} \times 401,16}{M \text{ Muestra} \times 10}$$

El resultado se da en gramos de almidón por cada 100 gramos de residuo seco.

2.4 DETERMINACIÓN DE CELULOSA (Mussatto *et al.* 2006).

Materiales:, Vasos de precipitado, Agitadores de vidrio, Probetas, Autoclave, Centrifuga, pHmetro, bomba al vacío, estufa, balanza.

Reactivos

- H₂SO₄ concentrado
- NaOH al 2%

Procedimiento: Este procedimiento tiene como objetivo la liberación de la celulosa del material vegetal.

Hidrólisis ácida:

- 100 mg de ácido/g de material seco; una relación sólido: líquido de 1:8 g:g,
- Prepara una solución de H₂SO₄ así: para 5 gramos de muestra: 0.27 ml y llevarlos 40 ml de agua por muestra.
- Tomar 5 grs de material vegetal deshidratado en polvo.
- Agitar hasta total impregnación
- Colocar en autoclave por 120°C durante 17 minutos.
- Centrifugar para separar el material sólido
- Reservar el material sólido.

Hidrólisis Básica:

- Adicionar sobre la muestra de la hidrólisis ácida 100 ml de NaOH al 2%
- Agitar hasta total impregnación
- Colocar en autoclave por 120°C durante 90 minutos.
- Elaborar filtros en lana de vidrio, desecarlos y pesarlos (se prefiere filtros tejido 100% poliéster).

- Filtrar en lana de vidrio en bomba al vacío
- Tomar pH del sólido
- Lavar con agua destilada hasta pH neutro.
- Secar en estufa hasta 50°C hasta alcanzar 50% de humedad.
- Determinar el contenido de celulosa por pérdida de peso.

2.5 DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES POR EL MÉTODO DE DNS 3,5-ÁCIDO DINITROSALISILICO (Miller, G. 1959).

Reactivos

- 100 ml de solución de hidróxido de calcio 5%.
- 1000 ml de agua destilada hirviendo
- 1.25 grs de DNS
- 37.5 grs de tartrato de sodio y potasio
- 2 gramos de NaOH y disolverlos en 125 ml de agua destilada
- 100 ml Patrón de glucosa 1.0 g/L
- Muestras problema
- Papel milimetrado

Preparación de reactivos:

Preparación reactivo DNS (hacerlo en la oscuridad): Preparar una solución de NaOH (2 gramos de NaOH y disolverlos en 125 ml de agua destilada) y adicionar 1.25 grs de DNS + 37.5 grs de tartrato de sodio y potasio, disolver delicadamente hasta completa disolución.

En un balón aforado de 250 ml, verter lentamente y con agua destilada aforar hasta la marca. Mezclar bien y envasar el reactivo en un frasco oscuro ámbar. Marcar con el nombre, fecha de elaboración. Dejar almacenado en la oscuridad.

Preparación patrón de glucosa: En un balón aforado, preparar 100 ml de un patrón de glucosa 1g/L. Pesar la cantidad requerida y almacenar en refrigeración, Marcar con el nombre, fecha de elaboración.

Procedimiento:

➤ Elaboración de la curva patrón

A partir de la solución de 1 g/L de glucosa se preparan 7 tubos con diferentes concentraciones, tal como se indica en la tabla 1: Previamente se debe tener agua en ebullición para el baño maría.

Se debe presentar de la siguiente forma:

Tubo	Abs 1	Abs 2	Promedio de Abs	Concentración de glucosa (mg/L)*
0 (blanco)				
1...				

tubo	ml de solución de glucosa 1 g/L	ml agua destilada	Volumen final (ml)	De cada tubo del Volumen final tomar: Se recomienda hacerlo por duplicado	ml de DNS	Tapar los tubos con papel aluminio. Calentamiento a 100°C * 5 min+ baño de hielo.	10 ml Agua destilada +agitar completamente.	Dejar en reposo 15 min y leer a 540 nm como longitud de onda.
0 (blanco)	0	10	10	1 ml	1 ml +agitar completamente.			
1	1.5	8.5	10	1 ml	1 ml +agitar completamente.			
2	2	8	10	1 ml	1 ml +agitar completamente.			
3	3	7	10	1 ml	1 ml +agitar completamente.			
4	5	5	10	1 ml	1 ml +agitar completamente.			
5	7	3	10	1 ml	1 ml +agitar completamente.			
6	8	2	10	1 ml	1 ml +agitar completamente.			
7	10	0	10	1 ml	1 ml +agitar completamente.			

Concentración de glucosa (mg/L): Se debe calcular la concentración de glucosa que hay en los tubos 1 al 6, teniendo en cuenta que parte de 100 ml a 1g/L d glucosa, además se debe tener en cuenta que los tubos del 1-6 se diluyen a 10 ml con agua destilada .

Una vez determinada la concentración de glucosa en cada tubo, se debe graficar en Excel usando el gráfico de dispersión (y la ecuación de la recta) , los siguientes valores:

tubo	Concentración de glucosa (mg/L)* Eje X	Promedio de Abs Eje y.

La ecuación generada es la que se usa para determinar la concentración de azúcares reductores en las muestras problema, así:

$$Y = a \cdot x + b$$

Dónde:

Y= las absorbancias de la muestra problema.

a= pendiente de la recta, se obtiene de la recta (3,2255)

b= es el corte en el eje y, se obtiene de la recta (0,00209)

x= es la concentración de azúcares reductores e la muestra expresada en mg/L.

➤ **Determinación de azúcares reductores en la materia prima:**

Preparación de la muestra: Determinar el tamaño de la partícula de la muestra.

En frascos limpios, secos y bien identificados pesar 100 grs de material deshidratado y molido: N100%, P100%, N25P75, N50P50, N75P25, mezclar bien, tapar y almacenar en un lugar fresco y libre de la luz.

Extracción de azúcares: Alistar la siguiente secuencia de Erlenmeyers de 100 o 150 ml y adicionar en cada uno de ellos 5 gramos de muestra:

Replica	N100%,	P100%,	P100%,	N25P75	N50P50,	N75P25,
R1	5 gramos	5 gramos	5 gramos	5 gramos	5 gramos	5 gramos
R2	5 gramos	5 gramos	5 gramos	5 gramos	5 gramos	5 gramos
R3	5 gramos	5 gramos	5 gramos	5 gramos	5 gramos	5 gramos
R4	5 gramos	5 gramos	5 gramos	5 gramos	5 gramos	5 gramos

A cada uno de los Erlenmeyers

- gregar a cada Erlenmeyer poco a poco agua destilada hirviendo. Agitar y volver a adicionar agua hirviendo.
- Filtrar en tela
- Clarificar y purificar el filtrado: adicionar lentamente una solución fresca de Hidróxido de calcio hasta obtener un pH de 8-8.5.

- Calentar a ebullición con suave y continúa agitación
- Dejar enfriar, sedimentar y filtrar al vacío. Al residuo final lavar con 10 ml de agua destilada caliente.
- El filtrado obtenido de cada replica, se le determinará la cantidad de azúcares reductores así:

Recuerde que se debe realizar un blanco (1 ml de agua destilada + 1 ml de DNS) y se somete a lo demás tratamientos.

reposito 15 min y leer a 540 nm como longitud	Tomar del filtrado	ml de DNS	Tapar los tubos con papel aluminio. Calentamiento a 100°C * 5 min+ baño de hielo.	10 ml Agua destilada +agitar completamente.	Dejar en reposo 15 min y leer a 540 nm como longitud de onda.
R1	1ml	1 ml +agitar completamente.			
R2	1ml	1 ml +agitar completamente.			
R3	1ml	1 ml +agitar completamente.			
R4	1ml	1 ml +agitar completamente.			

➤ **Pre
sen**

tación de resultados: Presentarlos de la siguiente forma: Usar el formato del anexo de Excel para el registro de laboratorio. Presentar los datos en forma tabulada y el análisis de los mismos según el estado del arte consultado (Artículos científicos). Anexar fotografías.

ANEXO 3. PROTOCOLO HIDRÓLISIS QUÍMICA (Monsalve, et al., 2006 y Sun, et al., (2002)

Materiales

- Erlenmeyers 100 ml o 150 ml
- Pipetas
- Probeta 100 ml
- Agitadores de vidrio
- Autoclave
- Centrifuga
- Balanza
- Vidrio reloj
- Espátula
- Vasos de vidrio 600 ml
- Material de vidrio empleado en el protocolo de Azúcares Reductores por el método del ácido 3,5- Dinitrosalisilico (DNS).

Reactivos

- Solución de NaOH al 0.1 N (2000ml o 2 L)
- Solución de NaOH al 5 N (500 ml)
- CaSO₄ (Sulfato de Calcio).
- H₂SO₄ al 5% y 20% (200 ml de cada uno)
- Reactivos del protocolo de Azúcares Reductores por el método del ácido 3,5- Dinitrosalisilico (DNS).

Procedimiento: Se realiza mediante dos etapas:

1. Etapa 1 : Eliminación de lignina

- Tomar 5 grs de material vegetal deshidratado en polvo. Tomar pH.
- En un erlenmeyer sumergir totalmente la muestra con NaOH 0.1 N por 15 minutos (aproximadamente 97,5 ml de base por replica).
- Adicionar a cada muestra 0.816 grs de CaSO₄ (Sulfato de Calcio). Disolver hasta verificar que se disuelve. Dejar en reposo 3 horas.
- Separar en un embudo de decantación, colocando lana de vidrio para evitar que se tapone la salida del embudo. (No filtrar en papel filtro).
- Eliminar el líquido resultante, es la lignina separada.
- Recoger el sólido y trabajar la etapa 2.

2. Etapa 2: Hidrólisis ácida de la celulosa

- Adicionar sobre el sólido la concentración de ácido correspondiente, de acuerdo a la siguiente relación:
- Por cada 100 gramos de muestra adicionar 50 ml de ácido sulfúrico (5%) :2.5 ml por replica.
- Colocar la muestra en la autoclave a 1 atm (15 Psi), 125°C y 15 minutos.
- Dejar enfriar
- Centrifugar para separar el jarabe (sobrenadante o líquido).

- Tomar pH del jarabe.
- Neutralizar al pH de la materia prima con NaOH 5 N.
- Aplicar el protocolo para la determinación de Azúcares Reductores por el método del ácido 3,5- Dinitrosalicílico (DNS).
- Se pueden dejar en refrigeración a 8°C, para la posterior utilización.

3. Etapa 3: Hidrólisis del almidón

- Tomar el precipitado del centrifugado de la etapa 2.
- Preparar una solución de ácido sulfúrico al 20%.
- Adicionar a cada muestra la cantidad de ácido hasta que el pH este entre 1.0-2.0
- Llevar a ebullición a baño María y con varilla de vidrio por 6 horas con agitación permanente.
- Filtrar al vacío el hidrolizado del bagazo
- Neutralizar con NaOH al 5N
- Mezclar los filtrados (etapa 2).
- Aplicar el protocolo para la determinación de Azúcares Reductores por el método del ácido 3,5- Dinitrosalicílico (DNS).
- Se pueden dejar en refrigeración a 8°C, para la posterior utilización.

ANEXO 4. CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS SEGÚN BRADFORD, (Miller, G., 1976).

Para la cuantificación de proteína se optó por un ensayo de alta sensibilidad como lo es el método de Bradford utilizando BSA (albúmina sérica Bovina) como patrón. Preparando un stock de una concentración de 1 mg/ml

Materiales: Pipetas, Probeta de 500 ml, Balón aforado de 10 ml, Agitadores de vidrio, Pipeteadores, Vasos de precipitado, Vidrios reloj, Espátulas.

El material de vidrio antes y después debe lavarse así:

1. Lavar con poco jabón
2. Enjuagar con abundante agua hasta que no halla residuos de jabón
3. Dejar en agua tibia por espacio de 10 minutos
4. Enjuagar nuevamente con abundante agua
5. Especialmente los tubos de ensayo y las celdas de cuarzo: enjuagar con etanol puro hasta que el color desaparezca y luego con abundante agua.

Reactivos:

Etanol al 95%

H₃PO₄ al 85% (d= 1.685 g/ml)

Buffers fosfatos a pH 4.5-5.

Patrón de BSA 1 mg/ml

Preparación de Reactivos:

Etanol al 95%: $c_1v_1=c_2v_2$

H₃PO₄ al 85%: (d= 1.685 g/ml) 85 ml y llevarlos hasta 100 ml con agua destilada

Preparación de Buffers fosfato:

Pesar 13.60 g de KH₂PO₄ por litro (0.1). Pesar 17.42 de K₂HPO₄ g por litro, este último se puede reemplazar por Na₂HPO₄, hacer los cálculo relacionando la cantidad de moléculas de agua del reactivo.

De cada buffer se requiere preparar 200 ml. Tomar pH de cada uno y registrarlo en la botella.

Tomar 160 ml de KH₂PO₄ e ir adicionando K₂HPO₄ hasta el pH solicitado. pH 4.5-5.0

Reactivo de Bradford: Muy importante no confundir el azul de Coomasie G-250 con el Coomasie R-250).

Pesar 35 mg (0.035 grs) de azul de coomassie G-250 y disolverlos en 17.5 ml de etanol al 95%. Posteriormente adicionar 35 ml de H₃PO₄ al 85% y completar con agua destilada hasta 350 ml. Filtrar dos veces por papel filtro y guardar en frasco oscuro (ámbar) a 4°C.

Patrón de BSA 1 mg/ml: en un balón aforado prepara de 10 ml: Disolver 10 mg de albúmina bovina en 10 ml de agua destilada, con lo que tenemos una disolución madre con una Concentración de 1 mg/ml.

Procedimiento Curva Patrón:

Tubos	Patrón BSA (ml)	Buffer fosfato (ml)	Reactivo Bradford (ml)	
Blanco	----	3,00	2,00	Dejar reposar 5 minutos y reposar absorbancias a 595 nm
Tubo 1	0,10	2,90	2,00	
Tubo 2	0,50	2,50	2,00	
Tubo 3	1,00	2,00	2,00	
Tubo 4	1,50	1,50	2,00	
Tubo 5	2,00	1,00	2,00	
Tubo 6	2,50	0,50	2,00	
Tubo 7	3,00	0,00	2,00	

Notas importantes:

Si las absorbancias son mayores de 2, realizar las diluciones del patrón. Agitar suavemente para evitar la formación de espuma así: coloque papel aluminio (no corchos porque absorben el colorante) e invierta suavemente el tubo, esto en todas las adiciones de la tabla. La formación de espuma impide la lectura de los tubos.

El color es estable entre 5-60 minutos. Se debe prender con tiempo el espectrofotómetro.

Muestras Problema:

Adicionar a cada precipitado obtenido en el proceso de fermentación 5 ml de buffer fosfato pH 4.5 -5.0, agitar bien.

Muestra	Extracto de proteína (ml)	Reactivo Bradford (ml)	
R1	2 ml	3,00	Dejar reposar 5 minutos y reposar absorbancias a 595 nm
R2	2 ml	3,00	
R3	2 ml	3,00	

Registrar las absorbancias: Para una concentración de proteínas de 0.1 mg/ml da valores de absorbancias entre 0.4. Las absorbancias deben estar entre 0.15-0.5

ANEXO 5. MATRIZ Y DATOS DEL EXPERIMENTO CARACTERIZACIÓN QUÍMICA

TRATAMIENTO	REPLICAS	Parámetro							
		%H base humedad	%H base seca	%MS (materia seca)	CELULOSA (g/100 gramos de residuo seco)	AZÚCARES REDUCTORES (g/gramos de residuo seco)	pH	% ALMIDON (gramos/100 gramos residuo seco)	GRASA (% extracto etéreo).
N100	R1	74,0467	5,6438	24,9280	11,6440	17,1892	4,5000	0,5349	2,3200
	R2	74,1800	5,2285	24,9200	10,7560	22,9675	4,5000	1,2035	1,2600
	R3	74,6333	5,7424	24,3956	12,0200	20,2506	4,5000	1,0698	1,7800
	R4	74,2533	6,3180	24,6622	12,1200	16,6988	4,5000	0,8023	0,9200
P100	R1	81,7867	2,2969	17,9743	1,2967	0,3070	5,6000	59,1042	0,4400
	R2	83,2600	1,6129	16,5857	1,0100	0,8791	5,6000	58,8368	1,3600
	R3	81,2600	2,1878	18,5057	1,7514	0,9586	5,6000	61,5112	0,6400
	R4	82,6067	1,8398	17,2333	1,7171	0,8835	5,6000	60,9763	0,6800
N25P75	R1	78,9800	1,8649	20,7400	5,9120	8,4157	5,1000	44,3282	0,8000
	R2	78,9800	1,5858	20,8200	3,9182	5,7783	5,1000	44,1276	0,1400
	R3	80,3700	1,4162	19,4314	3,2700	5,0096	5,1000	46,1334	1,2000
	R4	79,5800	1,6650	20,2160	2,4240	5,5928	5,1000	45,7322	1,0600
N50P50	R1	76,3867	1,5528	23,4300	9,4143	7,1036	4,8000	29,5521	0,9200
	R2	76,7800	1,3494	23,0633	10,3800	7,5410	4,8000	29,4184	1,2600
	R3	76,5667	1,5249	23,2100	9,0067	4,6386	4,8000	30,7556	1,0600
	R4	75,8467	1,6561	23,9533	9,3800	6,8054	4,8000	30,4882	1,6800
N75P25	R1	72,4467	2,1824	27,1800	10,9480	14,9627	4,6000	14,7761	0,6400
	R2	73,3733	1,9887	26,2660	11,5480	18,0970	4,6000	14,7092	0,9800
	R3	72,4467	2,1824	27,1775	11,2520	15,7777	4,6000	15,3778	0,7800
	R4	73,3733	1,9887	26,2560	11,1160	18,6669	4,6000	15,2441	0,9800

ANEXO 6. RESUMEN ESTADISTICO CARACTERIZACIÓN QUIMICA

Resumen estadístico de las propiedades de la cáscara de naranja (N100) utilizada en el experimento								
Estadístico	% de humedad en base húmeda	% de humedad en base seca	% de materia seca	% de celulosa	% de azúcar reductora	pH	% de almidón	% de grasa
Media	74,278	5,733	24,726	11,635	19,277	4,5	0,90262	1,5700
Mediana	74,217	5,693	24,791	11,832	18,720	.	0,9360	1,5200
Moda	74,047 ^a	5,229 ^a	24,396 ^a	10,756 ^a	16,699 ^a	.	*	*
Desv. típ.	0,252	0,449	0,253	,621	2,920	.	0,2965	0,6124
C. de variación	0,338	7,831	1.022	5.335	15.146	.	32,849	39,006
Asimetría	1,311	0,521	-0,869	-1,416	0,669	.	-0,481	0,368
Curtosis	2,172	1,420	-1,207	1,633	-2,049	.	-1,701	-1,508
a. Existen varias modas. Se mostrará el menor de los valores. * No registra moda.								

Resumen estadístico de las propiedades de la cáscara de papa (P100) utilizada en el experimento								
Estadístico	% de humedad en base húmeda	% de humedad en base seca	% de materia seca	% de celulosa	% de azúcar reductora	pH	% de almidón	% de grasa
Media	82,228	1,984	17,575	1,444	0,757	5,6	60,107	0,780
Mediana	82,197	2,014	17,604	1,507	0,881	5,6	60,040	0,666
Moda	81,26 ^a	1,613 ^a	16,5857 ^a	1,010 ^a	0,307 ^a	5,6	*	*
Desv. típ.	0,883	0,315	0,841	0,355	0,302	0,0	1,3349	0,4006
C. de variación	1,074	15,881	4,784	24,623	39,922	0,0	2,221	51,359
Asimetría	0,153	-0,326	-0,153	-0,524	-1,911		0,103	1,576
Curtosis	-2,158	-3,116	-1,850	-2,979	3,737		-5,027	2,928
a. Existen varias modas. Se mostrará el menor de los valores. * No registra moda.								

Resumen estadístico de las propiedades de la mezcla de cáscara de naranja al 25% y cáscara de papa al 75% (N25P75) utilizada en el experimento

Estadístico	% de humedad en base húmeda	% de humedad en base seca	% de materia seca	% de celulosa	% de azúcar reductora	pH	% de almidón	% de grasa
Media	79,477	1,633	20,302	3,881	6,199	5,100	45,080	0,800
Mediana	79,280	1,625	20,478	3,594	5,685	5,100	45,030	0,930
Moda	78,980	1,416 ^a	19,431 ^a	2,424 ^a	5,009 ^a	5,1	*	*
Desv. típ.	0659	,1863	0,639	1,486	1,514	0,0	1,001	0,4501
C. d variación	0.828	11.404	3.148	38,829	24.420	0.0	2,220	56,263
Asimetría	1,086	0,229	-1,116	1,028	1,713		0,103	-1,321
Curtosis	-0,103	0,657	0,144	1,316	3,209		-5,027	1,500

a. Existen varias modas. Se mostrará el menor de los valores.
* No registra moda.

Resumen estadístico de las propiedades de la mezcla de cáscara de naranja al 50% y cáscara de papa al 50% (N50P50) utilizada en el experimento

Estadístico	% de humedad en base húmeda	% de humedad en base seca	% de materia seca	% de celulosa	% de azúcar reductora	pH	% de almidón	% de grasa
Media	76,395	1,521	23,414	9,545	6,522	4,8	30,053	1,230
Mediana	76,477	1,539	23,320	9,397	6,955	4,8	30,020	1,160
Moda	75,847 ^a	1,349 ^a	23,063 ^a	9,007 ^a	4,639 ^a	4,8	*	*
Desv. típ.	0,399	0,127	0,389	0,586	1,292	0,0	0,667	0,330
C. de variación	0.522	8.378	1.675	6.143	19.802		2,219	26,829
Asimetría	-1,075	-,813	1,183	1,385	-1,673	0.0	0,102	1,039
Curtosis	1,342	1,654	1,147	2,598	3,015		-5,280	0,708

a. Existen varias modas. Se mostrará el menor de los valores.
* No registra moda.

Resumen estadístico de las propiedades de la mezcla de cáscara de naranja al 75% y cáscara de papa al 25% (N75P25) utilizada en el experimento

Estadístico	% de humedad en base húmeda	% de humedad en base seca	% de materia seca	% de celulosa	% de azúcar reductora	pH	% de almidón	% de grasa
Media	72,910	2,086	26,719	11,216	16,8764	4,6	15,026	0,845
Mediana	72,910	2,086	26,722	11,184	16,937	.	15,0101	0,880
Moda	72,4477 ^a	1,989 ^a	26,256 ^a	10,948 ^a	14,963 ^a	.	*	*
Desv. típ.	0,535	0,112	0,529	0,254	1,7867	.	0,333	0,166
C. de variación	0.734	5.684	1.983	2.263	10.580	.	2,216	19,645
Asimetría	0,000	0,000	0,000	0668	-0,090	.	0,102	-0,578
Curtosis	-6,000	-6,000	-5,998	0,472	-4,527	.	-5,027	-2,761

ANEXO 7. CURVA PATRON DE GLUCOSA PARA LA DETERMIANCIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES (MÉTODO DNS) ANTES DE LA HIDROLISIS QUÍMICA

Curva utilizada para conocer la concentración de azúcares reductores obtenidos en la hidrólisis de las combinaciones N100, P100, N25P75, N50P50, N75P25.

Tabla. Datos absorbancias de glucosa. Promedio tres réplicas.

Concentración de glucosa (mg/L)	Absorbancia (540 nm)
0,0000	0,0000
0,0150	0,0253
0,0200	0,0336
0,0300	0,0543
0,0500	0,1098
0,0700	0,1780
0,0800	0,2025
0,1000	0,2809

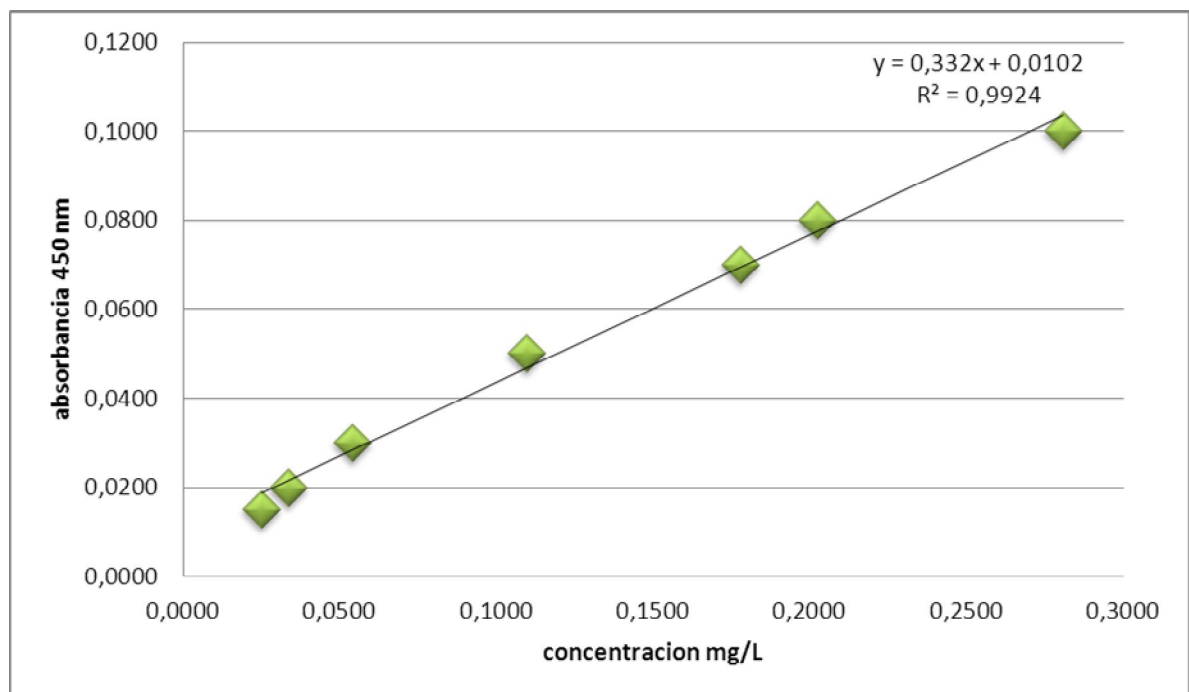


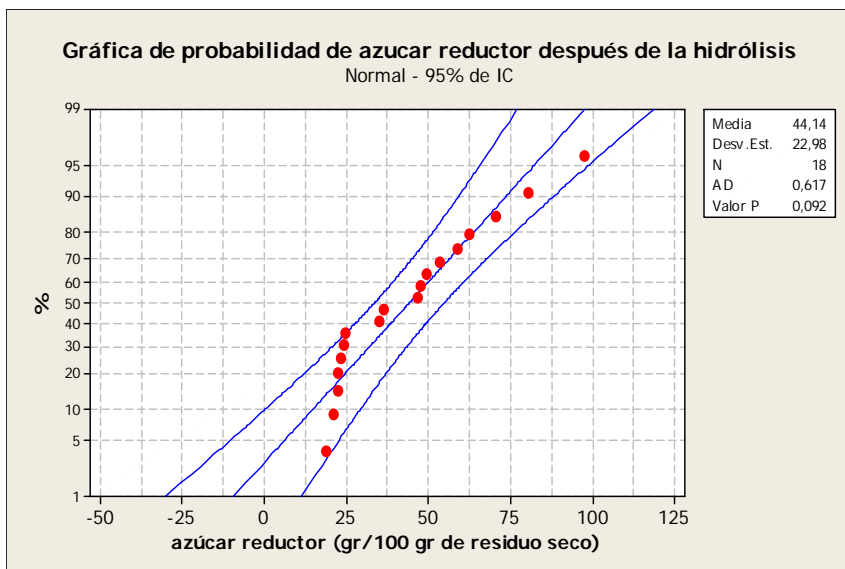
Figura. Curva patrón de glucosa y ecuación lineal.

ANEXO 8. MATRIZ Y DATOS DEL EXPERIMENTO HIDRÓLISIS QUÍMICA

TRATAMIENTO	REPLICAS	AZÚCARES REDUCTORES (g/gramos de residuo seco)
N100	R1	19,0030
	R2	21,1175
	R3	22,3012
	R4	24,2440
P100	R1	70,7048
	R2	47,4458
	R3	53,6084
	R4	97,2771
N25P75	R1	34,9217
	R2	46,5181
	R3	58,7771
	R4	
N50P50	R1	62,4880
	R2	36,1807
	R3	49,3012
	R4	80,1807
N75P25	R1	23,5042
	R2	24,7235
	R3	22,2651
	R4	

ANEXO 9. ESTUDIO ESTADISTICO HIDRÓLISIS QUÍMICA

ANÁLISIS EXPLORATORIO AZÚCAR REDUACTOR DESPUÉS DE LA HIDRÓLISIS



Descriptivos

		Estadístico	
% de azúcar reductor después de la hidrólisis	Media	44,142	
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	32,715
		Límite superior	55,569
	Mediana	41,349	
	C. de variación	52,055	
	Desv. típ.	22,979	
	Mínimo	19,003	
	Máximo	97,277	
	Rango	78,274	
	Amplitud intercuartil	36,501	
	Asimetría	0,827	
Curtosis	-0,019		

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	Gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
% de azúcar reductor (hidrólisis)	,190	18	,086	,901	18	,060

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Descriptivos								
% de azúcar reductor (hidrólisis)								
	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
N100	4	21,666425	2,1940817	1,0970409	18,175151	25,157699	19,0030	24,2440
P100	4	67,259025	22,2999375	11,1499688	31,774848	102,743202	47,4458	97,2771
N25P75	3	46,738967	11,9292336	6,8873462	17,105108	76,372826	34,9217	58,7771
N50P50	4	57,037650	18,7986888	9,3993444	27,124741	86,950559	36,1807	80,1807
N75P25	3	23,497600	1,2292133	,7096866	20,444065	26,551135	22,2651	24,7235
Total	18	44,142339	22,9786368	5,4161166	32,715332	55,569346	19,0030	97,2771

Prueba de homogeneidad de varianzas

% de azúcar reductor (hidrólisis)

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
3,529	4	13	,037

ANOVA					
% de azúcar reductor (hidrólisis)					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	6122,191	4	1530,548	6,971	,003
Intra-grupos	2854,111	13	219,547		
Total	8976,302	17			

Comparaciones múltiples

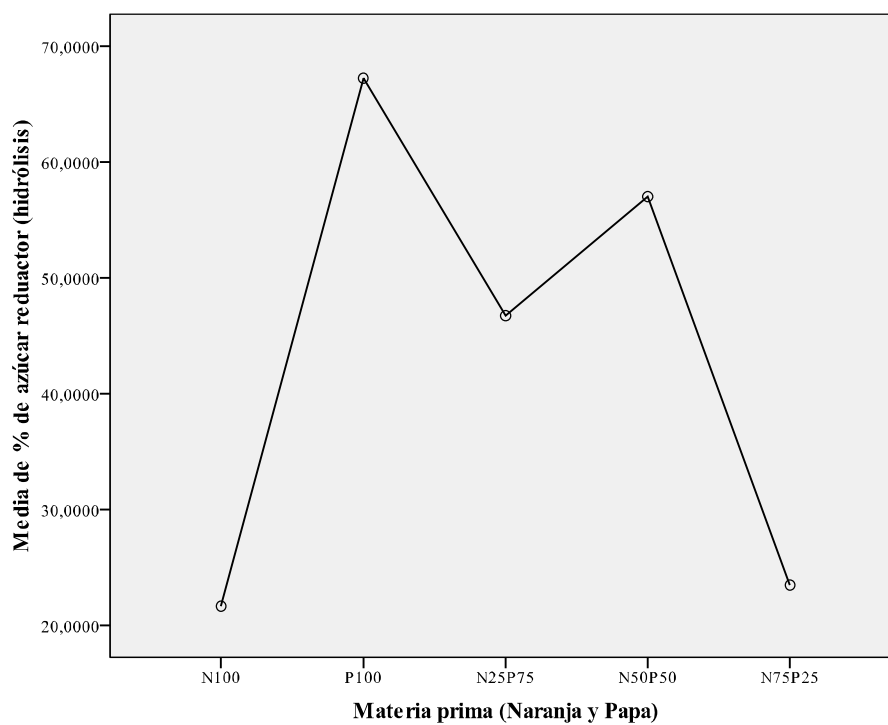
% de azúcar reductor (hidrólisis)

HSD de Tukey

(I) Materia prima (Naranja y Papa)	(J) Materia prima (Naranja y Papa)	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
N100	P100	-45,5926000*	10,4772847	,006	-78,582218	-12,602982
	N25P75	-25,0725417	11,3167609	,234	-60,705402	10,560318
	N50P50	-35,3712250*	10,4772847	,033	-68,360843	-2,381607
	N75P25	-1,8311750	11,3167609	1,000	-37,464035	33,801685
P100	N100	45,5926000*	10,4772847	,006	12,602982	78,582218
	N25P75	20,5200583	11,3167609	,407	-15,112802	56,152918
	N50P50	10,2213750	10,4772847	,861	-22,768243	43,210993
	N75P25	43,7614250*	11,3167609	,014	8,128565	79,394285
N25P75	N100	25,0725417	11,3167609	,234	-10,560318	60,705402
	P100	-20,5200583	11,3167609	,407	-56,152918	15,112802
	N50P50	-10,2986833	11,3167609	,888	-45,931543	25,334177

	N75P25	23,2413667	12,0981263	,354	-14,851763	61,334496
N50P50	N100	35,3712250*	10,4772847	,033	2,381607	68,360843
	P100	-10,2213750	10,4772847	,861	-43,210993	22,768243
	N25P75	10,2986833	11,3167609	,888	-25,334177	45,931543
	N75P25	33,5400500	11,3167609	,069	-2,092810	69,172910
N75P25	N100	1,8311750	11,3167609	1,000	-33,801685	37,464035
	P100	-43,7614250*	11,3167609	,014	-79,394285	-8,128565
	N25P75	-23,2413667	12,0981263	,354	-61,334496	14,851763
	N50P50	-33,5400500	11,3167609	,069	-69,172910	2,092810

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.



ANEXO 10. CURVA PATRÓN DE GLUCOSA PARA LA DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES (MÉTODO DNS) DESPUÉS DE LA HIDRÓLISIS QUÍMICA

Curva utilizada para conocer la concentración de azúcares reductores residuales obtenidos en la fermentación de las combinaciones N100, P100, N25P75, N50P50, N75P25.

Tabla. Datos absorbancias de glucosa. Promedio tres réplicas.

Concentración (mg/L)	Absorbancia a 540 nm
0,0100	0,0109
0,0300	0,0380
0,0500	0,0701
0,0700	0,0940
0,0800	0,1130
0,1000	0,1449

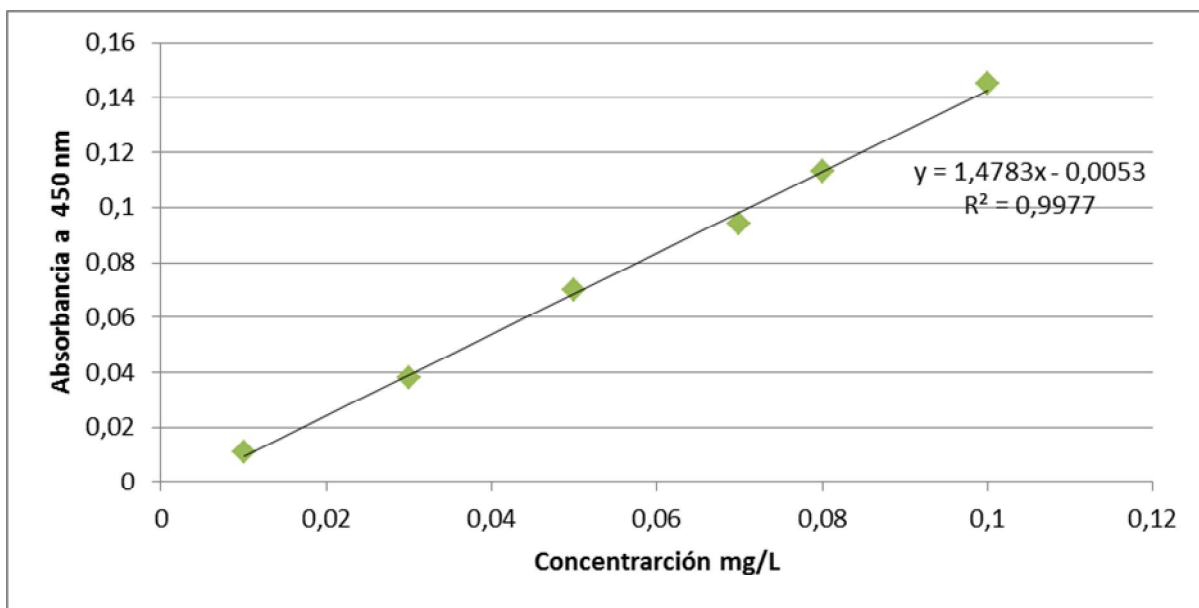


Figura. Curva patrón de glucosa y ecuación lineal.

**ANEXO 11. CURVA PATRÓN DE ALBÚMINA SÉRICA BOVINA (BSA) PARA
LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA UNICELULAR SCP
(MÉTODO BRADFORD 1976)**

Tabla. Datos absorbancias de glucosa. Promedio tres réplicas.

Concentración mg/ml	Absorbancias 595 nm
0,01	0,6094
0,05	0,7479
0,10	0,7893
0,15	0,8150
0,20	0,8424
0,25	0,8718
0,30	0,8928

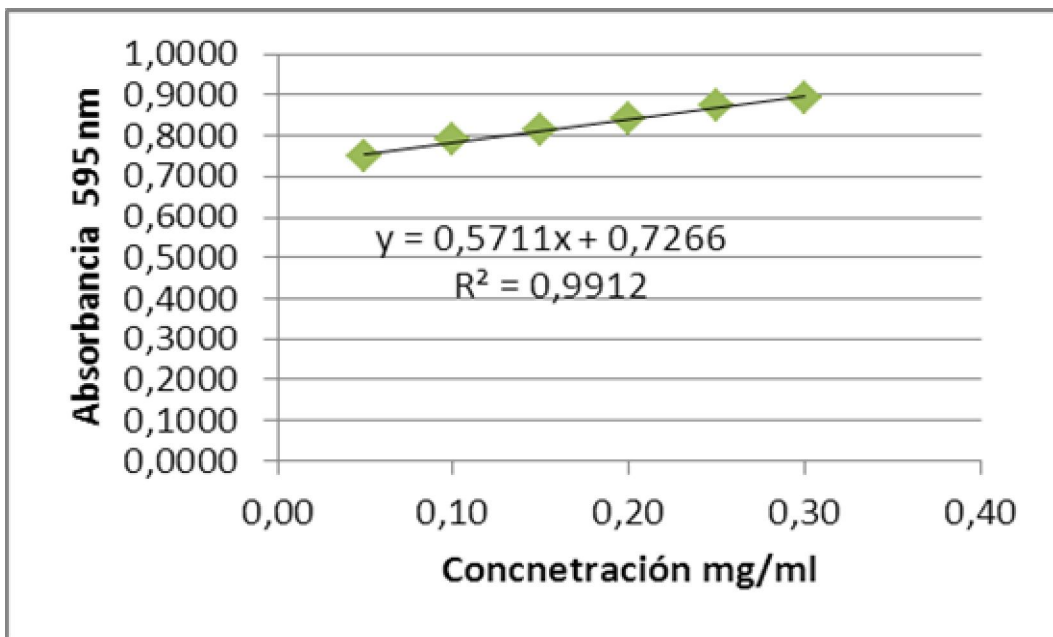


Figura. Curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA) 1 mg/ml y ecuación lineal.

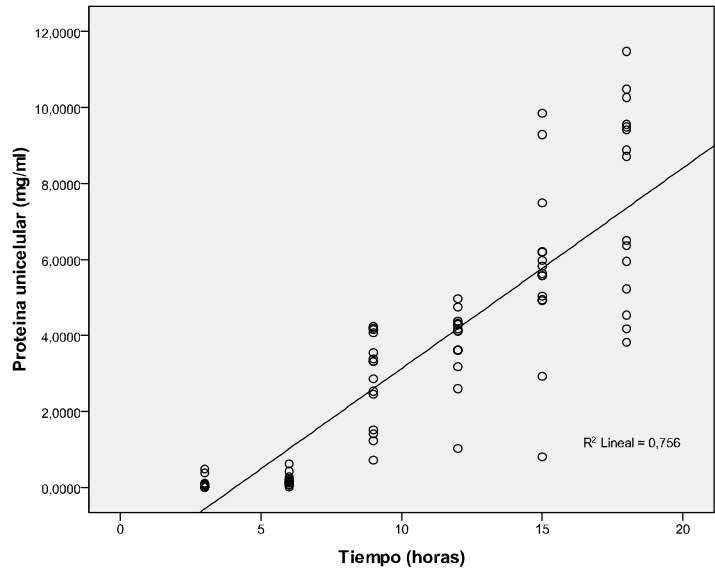
ANEXO 12. MATRIZ Y DATOS DEL EXPERIMENTO PARA LA CANTIDAD DE PROTEINA UNICELULAR, SCP (mg/ml)

Tiempo (h)		P100	N100	N25P75	N50P50	N75P25
3	R1	0,0338	0,0369	0,0108	0,0231	0,0508
	R2	0,0554	0,0185	0,0262	0,0077	0,0862
	R3	0,0169	0,0292	0,0323	0,0308	0,0215
6	R1	0,0323	0,0554	0,1554	0,1492	0,0323
	R2	0,0215	0,0062	0,1062	0,0554	0,0907
	R3	0,0938	0,0400	0,0892	0,0877	0,0615
9	R1	0,1569	0,0123	0,1985	0,1385	0,1138
	R2	0,0815	0,0538	0,0862	0,1246	0,0123
	R3	0,2292	0,0785	0,1354	0,1246	0,1354
12	R1	0,1862	0,0615	0,1431	0,1554	0,1031
	R2	0,2200	0,0341	0,2185	0,2015	0,1046
	R3	0,1908	0,0908	0,1323	0,1246	0,1462
15	R1	0,2295	0,1179	0,2747	0,2062	0,2000
	R2	0,2813	0,0708	0,1462	0,1862	0,2108
	R3	0,2031	0,0862	0,2352	0,2092	0,1108
18	R1	0,6006	0,0785	0,2723	0,1564	0,3215
	R2	0,2295	0,0785	0,3492	0,1815	0,3538
	R3	0,1962	0,1369	0,1385	0,3077	0,2600

ANEXO 13. ESTUDIO ESTADISTICO EXPERIMENTO PARA LA CANTIDAD DE PROTEINA UNICELULAR, SCP; (mg/ml)

1. Se cumple la primera condición que el modelo sea lineal: Para un modelo de un solo factor con una variable, se asume que existe una relación lineal entre la variable de respuesta y la covariable:

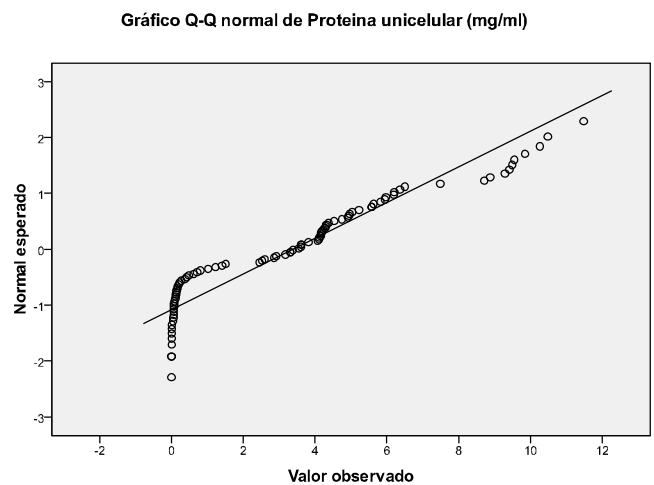
Las gráficas muestran que hay una tendencia lineal entre el contenido de proteína y el tiempo. R^2 0,756. La proteína obtenida es afectada por el tiempo, a mayor tiempo mayor cantidad de proteína obtenida. A medida que



aumenta el tiempo aumenta el contenido de proteína. Por lo tanto se usa el análisis de covarianza para eliminar el efecto de tiempo sobre el contenido de proteína obtenida, cuando se prueba las diferencias entre tratamientos en diferentes combinaciones.

Análisis exploratorio.

2. La prueba de normalidad de datos: cumple aproximadamente, lo que permite seguir con el análisis de varianza.



3. Importancia de la covariable: al correer el experimento sin la covariable no se encuentran diferencias entre los tratamiento, es sumamente necesario el tiempo como covariable. El tiempo interactúa con la producción de proteína. Al eliminar el tiempo, oculta las diferencias significativas, es decir que en todos los tratamientos, el contenido de proteína es el mismo. Se rechaza (0,284) que son iguales.

Pruebas de los efectos inter-sujetos					
Variable dependiente:Proteina unicelular (mg/ml)					
Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	49,579 ^a	4	12,395	1,282	,284
Intersección	1034,265	1	1034,265	106,951	,000
trat	49,579	4	12,395	1,282	,284
Error	821,988	85	9,670		
Total	1905,831	90			
Total corregida	871,567	89			
a. R cuadrado = ,057 (R cuadrado corregida = ,013)					

4. Cuando se tiene en cuenta el tiempo como covariable, se observa que si hay efecto entre tratamiento vs el tiempo, el R² sube a 0,813.

Pruebas de los efectos inter-sujetos					
Variable dependiente:Proteina unicelular (mg/ml)					
Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	708,644 ^a	5	141,729	73,073	,000
Intersección	1034,265	1	1034,265	533,247	,000

xcentr	659,065	1	659,065	339,801	,000
trat	49,579	4	12,395	6,390	,000
Error	162,923	84	1,940		
Total	1905,831	90			
Total corregida	871,567	89			
a. R cuadrado = ,813 (R cuadrado corregida = ,802)					

5. comparación de medias: con el valor P (SIG en la tabla).hay diferencia entre naranja y papa, en la combinaciones no hay diferencias significativas. En promedio se va obtener la misma cantidad de proteína.

6. Para saber cuál es el mejor sustrato para producir proteína se hace la prueba de Tukey:

Se desea probar que:

$H_0 = \mu_i = \mu_j$: todas la medias de los tratamientos son iguales, no hay diferencia significativa.

$H_0 = \mu_i \neq \mu_j$: todas la medias de los tratamientos no son iguales, no hay diferencia significativa o por lo menos una de las medias de los tratamientos es diferente.

Para tamaños de las muestras iguales, la prueba de Tukey declara que dos medias son significativamente diferentes si el valor absoluto de sus diferencias muestrales exceden a:

$$T_{\alpha} = q_{\alpha}(a, f) \sqrt{MSE/n}$$

Por lo tanto para el experimento:

$$T_{0.05} = (5.0, 84) \sqrt{1,940/18}$$

$$T_{0.05} = 3,82 \sqrt{1,940/18}$$

$$T_{0.05} = 1.30$$

Tratamientos	Promedio de los tratamientos	Diferencias de promedios ^a			
Y1= N100	2,122806	Y1-Y2	-2,13	2,13 *	Rech H0 Diferencia significativa
Y2= P100	4,251978	Y1-Y3	-1,56	1,56*	Rech H0 Diferencia significativa

Y3= N25P75	3,686211	Y1-Y4	2,12	2,12*	Rech H0 Diferencia significativa
Y4= N50P50	3,049478	Y1-Y5	-1,72	1,72*	Rech H0 Diferencia significativa
Y5= N75P25	3,839328	Y2-Y3	0,57	0,57	No Rech H0 Diferencia n.s
		Y2-Y4	1,20	1,20	No Rech H0 Diferencia n.s
		Y2-Y5	0,41	0,41	No Rech H0 Diferencia n.s
		Y3-Y4	0,64	0,64	No Rech H0 Diferencia n.s
		Y3-Y5	-0,15	0,15	No Rech H0 Diferencia n.s
		Y4-Y5	-0,79	0,79	No Rech H0 Diferencia n.s

Los valores marcados con asterisco indican pares de medias que son significativamente diferentes, por lo tanto, para el experimento, el crecimiento de levadura sobre sustrato N100 produce una cantidad de proteína unicelular diferente comparada con los sustratos P100, N25P75, N50P50 y N75P25. Cuando la levadura crece sobre sustratos P100, N25P75, N50P50 y N75P25, la cantidad de proteína unicelular no difiere significativamente, es decir, estos sustratos pueden producir la misma cantidad de proteína a las condiciones del experimento.