

PROTEÍNA CELULAR EN BIOMASA DE LA LEVADURA PRODUCIDA A PARTIR DE RESIDUOS DE CÁSCARAS DE NARANJA Y PAPA PARA USO EN LA ALIMENTACIÓN ANIMAL

Cellular protein in yeast biomass produced from residues of both orange and potato shells for use in animal feeding

Castellanos Riveros, Alberto¹ ; Torres Vargas, Golda Meyer²

Recibido: 22 de Abril del 2017
Aceptado: 26 de Mayo del 2017

Resumen

El propósito de este artículo es evaluar el contenido de proteína celular en la biomasa de la levadura *Saccharomyces Cerevisiae* producida a partir de residuos de cáscaras de naranja y papa para uso en la alimentación animal. Se utilizaron los residuos de cáscaras de naranja y papa, y combinaciones porcentuales de estos; caracterizándoseles químicamente en cuanto porcentaje de humedad con base húmeda y con base seca, porcentaje de materia seca, porcentaje de grasa, celulosa, almidón y azúcares reductores. 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 existen diferencias significativas.

Palabras claves: Proteína Celular, Levadura, Biomasa, Alimentación Animal.

Abstract

The purpose of this article is to present a research exercise whose purpose was to determine the cell protein content in the biomass of the yeast *Saccharomyces*

¹ Médico Veterinario Zootecnista. Esp. Msc. UNAD. alberto.castellanos@unad.edu.co

² Especialista en Biotecnología agraria. UNAD. golda.torres@unad.edu.co

Cerevisiae produced from waste orange peels and potato for use in animal feed. Waste of orange and potato peel and combinations of these was used; chemically they were characterized in the percentage of moisture in the wet and dry on base, percentage of reducing dry matter, percentage of fat, cellulose, sugars, starch Y. The Facts Content cellulose, reducing sugars starch and indicated that should performing a hydrolysis to increase the amount of fermentable sugars. The effect of treatments on the production of reducing sugars was evaluated by chemical hydrolysis; Tukey's test indicated that there are significant differences.

Key words: Cell protein, yeast, Biomass, Animal Feeding.

Introducción

En la actualidad, a diario se generan miles de toneladas de residuos sólidos vegetales provenientes de varias fuentes: doméstico, comercial, industrial y natural, los cuales requieren de espacio para su biodegradación natural, así como una tecnología adecuada, sobre todo cuando no existe una separación o disposición final adecuada. Específicamente, a nivel mundial se producen aproximadamente 1600 millones de toneladas por año de residuos sólidos, los cuales generan graves problemas en relación con el ambiente y el manejo económico, mientras que en Colombia (Ministerio, 2004) se producen cerca de 27300 Ton/día de basura, de las cuales el 65% son residuos orgánicos y el 35% son inorgánicos. Se estima que de este 65% de residuos orgánicos, el 40% pertenece a residuos de tipo orgánico derivados de frutas, tubérculos, hortalizas, leguminosas. En cuanto a los residuos de origen vegetal, en las ciudades no se realiza una separación adecuada, de forma generalizada, solo existe en las plazas de mercado y supermercados de cadena, residuos que llegan a los rellenos sanitarios, allí son recolectados por particulares y sometidos a procesos de compostaje y vermicompostaje.

La composición química de los residuos es aprovechable partiendo de 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 artículo muestra 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*. Esta investigación procura dar 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.

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. Los residuos orgánicos que más abundan, según (Galanakis, 2012), son los de origen alimentario y agrícola. De otra parte (Lian, y otros, 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, 2012), las reservas de combustibles fósiles son limitadas y el calentamiento global se está convirtiendo en un problema grave.

Desde hace varios años, la ciencia ha mostrado su interés por el aprovechamiento de los residuos orgánicos vegetales, de acuerdo con (Okeke & Frankenberger, 2005) recomiendan usar el almidón y residuos de piel de papa para el tratamiento del agua en la bio-reducción de contaminantes como el perclorato. Los residuos orgánicos vegetales son considerados por (Binder, 2009; Gil, Domínguez, & Pacho, 2008) como una fuente renovable energética. Adicionalmente (Galanakis, 2012) presenta las tecnologías emergentes y convencionales que se han desarrollado para la recuperación de sustancias de interés industrial y funcional de los residuos de alimentos.

Composición química de los residuos orgánicos vegetales

Los residuos orgánicos vegetales poseen grandes cantidades de residuos lignocelulósicos, que 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). Estos residuos son ricos en celulosa, tal como lo presentan (Cardona, 2004), en la caracterización de residuos vegetales provenientes de plazas de mercado, lo que justifica su posterior aprovechamiento como fuente de azúcares fermentables, según (Bian, 2010).

La celulosa es uno de los constituyentes mayoritarios de la pared celular de las plantas. 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. Para procesos de crecimiento de microorganismos, estas sustancias pueden actuar como sustancias tóxicas o inhibidoras, de acuerdo al análisis de (Binder, 2009; Chiaramonti, 2012). La hemicelulosa de maderas duras y los residuos agrícolas, según (Chander, 2011) suelen ser ricos en xilano. El almidón es un polisacárido de reserva alimenticia predominante en las plantas, constituido por

amilosa y amilopectina. El almidón también hace parte de los residuos de origen vegetal generados de la industria de la papa y tubérculos; (Cardona, 2004) han caracterizado residuos vegetales provenientes de plazas de mercado. 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.

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. El contenido de residuos generados por la industria de cítricos, específicamente en la elaboración de zumos y derivados fue analizado por (Martín, 2010). La cáscara de naranja, en un enfoque de biorefinería, según (Martín, 2010; Plessas, 2007; Tejeda, 2009) integra la conversión proceso de biomasa para la producción de combustibles, energía eléctrica y productos químicos. El uso de residuos como la cáscara de la naranja, es recomendado por (Ghorbanpour, 2012) para hacer bioetanol para vehículos, mientras que (Bicu, 2012) recomiendan el uso de las cáscaras de naranja desengrasadas y parcialmente libre de pectina (despectinadas), para la obtención de celulosa industrial como material absorbente industrial, y por su parte, (Rezzadori, Benedetti, & Amante, 2012) presentan las posibles aplicaciones en el consumo humano, en fertilizantes, y alimentos para animales.

Investigaciones sobre residuos de cascara de papa, (Chen, 2012; Arapoglou, 2010) exponen la preocupación por la contaminación ambiental que presenta los residuos de las cáscaras. En la industria de la papa, se genera entre el 15-40% de residuos de piel de papa según (Arapoglou, 2010; Carvalho, y otros, 2013). El procedimiento de pelado genera aproximadamente 10 ton/día, este residuo rico en almidón, celuloso, hemicelulosa, lignina y azúcares de menor peso molecular, lo que justifica su aplicación y reutilización; por ejemplo (Mars, y otros, 2010), exponen el uso de cáscara de papa para la obtención de hidrógeno y biocombustibles; (Arocha & Rosell, 2011) contribuyen a las investigaciones en hidrocoloides presentes en la cáscara de papa y almidón de papa; (Chen, 2012; Zanariah, 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. Un estudio de gran interés lo presentó (Mahmood, 1998), al estudiar en conjunto los residuos de cáscara de naranja y papa para la obtención de enzimas extracelulares con fines industriales.

Hidrólisis enzimática

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 (Lennartsson, 2012; Grohmann, 1995; Arapoglou, 2010) presentan una situación similar para la hidrólisis del almidón vía enzimática, donde se tiene que emplear varias enzimas tipo alfa-amilasa termoresistentes, celulosas y enzimas desramificante tipo dextrinas.

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). Varios autores recomiendan la hidrólisis química como la manera de convertir los polisacáridos de celulosa y hemicelulosa en monosacáridos tipo glucosa, (Grohmann, 1995; Binder, 2009; Zhou, 2011) recomiendan usar concentraciones de H₂SO₄ más diluidas. 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, 2009), por cromatografía de alta resolución, HPLC, (Gámez, 2006) y cromatografía de gases, (Kang, 2012).

Materiales y Métodos

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. Se utilizaron cáscaras de naranja (*Citrus sinensis* L var valencia), adquiridas al azar en un punto de venta en Duitama (Boyacá), entre las 6:00 y 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; se congelaron en bolsas ziploc. Adicionalmente se utilizaron cáscaras de papa (*Solanum tuberosum*), variedad Diacol Capiro (R-12), obtenidas directamente de la fábrica de productos fritos “La libertad” de la ciudad de Duitama (Boyacá), inmediatamente después del proceso de pelado. En el laboratorio se procedió a la selección, adecuación (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) y congelamiento en bolsas ziploc.

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*”.

Preparación de las muestras de residuos

La materia prima fue deshidratada a una temperatura de 110±1 °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, mostradas en la Figura 1: cáscara de naranja al 100% p/p (N100), cáscara de papa al 100% p/p (P100), cáscara de naranja al 25% p/p y papa al 75% p/p (N25P75), cáscara de naranja al 50% p/p y papa al 50% p/p (N50P50), cáscara de naranja al 75% y papa al 25% (N75P25).



Figura 1. Combinaciones porcentuales de cáscaras de naranja y papa deshidratadas

Caracterización de los residuos

Las muestras de residuos fueron analizadas por porcentaje de humedad (%H), expresado en base húmeda (%H bh) y en base seca (%Hbs), de acuerdo con el método AOAC 1990/964.22; porcentaje de materia seca (% MS) acorde al método AOAC 1990/924.22; porcentaje de grasa en términos de % extracto etéreo de acuerdo al método Soxhlet reportado en la AOAC 1990/920.39; porcentaje de almidón (gramos/ 100 gramos de residuo seco) de acuerdo con el método Von Asboth, reportado por Quintero (2008); porcentaje de celulosa (gramos/ 100 gramos de residuo seco), de acuerdo al procedimiento reportado por Mussatto et al. (2006); porcentaje de azúcares reductores (gramos/100 gramos de residuo seco) de acuerdo con el método reportado por Miller (1959), Zor et al. (1996) y Wood et al. (2012), y el pH mediante el método del pHmetro.

Tratamientos de hidrólisis y fermentación de los residuos

Hidrólisis química de los residuos

Las muestras de residuos fueron sometidas a un pretratamiento químico para hidrolizar los polisacáridos hasta azúcares fermentables y así poder ser degradados fácilmente por la levadura *Saccharomyces Cerevisiae* siguiendo la metodología reportada por (Monsalve, Medina, & Ruíz, 2006) y lo recomendado por (Sun & Cheng, 2002). Este procedimiento se desarrolló con cuatro réplicas para cada combinación porcentual.

Las muestras N100, N25P75 y N75P25 fueron sometidas a varias etapas de hidrolisis básica, que consistieron en sumergir totalmente los muestras en una solución de NaOH 0.1 N durante 15 minutos y después en mezclarse con de sulfato de calcio por 3 horas para la eliminación de lignina de las cáscaras de naranja; la combinación P100 no se trató mediante este procedimiento. Posteriormente, las

muestras

P100, N25P75 y N75P25 se sometieron a un proceso de hidrólisis ácida; cada 100 gramos de residuos se mezclaron con 50 ml de H₂SO₄ a 125 °C por 15 minutos. La hidrólisis del almidón se llevó a cabo mediante la adición de H₂SO₄ diluido al 20%, mantenido en baño María a 94°C por 6 horas con agitación constante; la combinación N100 no se sometió a este procedimiento.

Fermentación

El proceso de fermentación fue discontinúa o en batch de acuerdo con (Ortiz, 2012). A continuación se describen los métodos asociados de adaptación del microorganismo y medio de cultivo, pie de cuba y fermentación aeróbica.

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 adiciono 0,5 gramos Levadura Seca Activa, *Saccharomyces Cerevisiae*. Se dejó en agitación mecánica por 24 horas a una temperatura de 32 °C. 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 (Díaz, 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.

Pie de cuba

Es necesario que antes de la fermentación aeróbica se realice un pie de cuba para adaptar la levadura al medio, (Díaz, 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.

Fermentación aeróbica

Luego de preparado el pie de cuba para cada sustrato, se procedió a realizar el montaje para la fermentación aeróbica. Se mezcló el contenido de los erlenmeyer para obtener un total de 150 ml y se puso 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.

Caracterizaciones del producto fermentado

Cuantificación 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).

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 y en algunos casos se debió realizar diluciones de la muestras (10⁻¹ hasta 10⁻²).

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, tomando alícuotas de 1 ml cada tres horas por triplicado.

Concentración de proteína

La determinación de proteína se realizó tomando alícuotas de 9 ml cada tres horas por triplicado; 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, 1994) y (Zor, 1996).

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 (Ortíz, 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 & Bayo, 1996).

Análisis estadístico.

Para la presentación e interpretación de resultados de la caracterización de la materia prima, se utilizaron las medias estadísticas de rigor como la media aritmética, desviación estándar, coeficiente de variación y presentaciones gráficas. Para la presentación e interpretación de resultados del proceso de hidrólisis química, 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.

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, 2004) con cinco niveles y cuatro réplicas 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).

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*. Se utilizaron las siguientes 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.

Variabes: 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.

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

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

Variabes 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%.

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 interpretaron utilizando las medidas estadísticas de rigor como la media aritmética, desviación estándar, coeficiente de variación y presentaciones gráficas.

Contenido de Proteína Celular (SCP)

De igual forma que para la hidrólisis química, la verificación del modelo estadístico 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 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*.

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, 2004) el modelo estadístico apropiado es:

$$Y_{ij} = u + \alpha_i + \beta(X_{ij} - X) + \varepsilon_{ij} \quad \left[\begin{array}{l} i = 1, 2, \dots, a \\ j = 1, 2, \dots, n \end{array} \right]$$

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} . X es la media de los valores de x_{ij} . u 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.

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). Se utilizaron las siguientes 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.

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.

Resultados y discusión

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 1. 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:

$$Y = mx + b$$
$$Y = 0,332x + 0,0102$$
$$R2 = 0,9924$$

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.

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).

Tabla 1. Caracterización residuos de cáscara de naranja, papa y combinaciones porcentuales.

| Componente Tratamientos | 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 |
|----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---|--|---|------------------|
| 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 |
| 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 |

^a media aritmética. Los números entre paréntesis corresponden a la desviación estándar. (n=4).

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).

Tabla 2. Cantidad de azúcares reductores después de la hidrólisis (g/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 3. Estadístico (ANOVA) Cantidad de azúcares reductores después de la hidrólisis (g/gramos 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 4.

Tabla 4. Comparaciones múltiples. Cantidad de azúcares reductores después de la hidrólisis (g/g de residuo seco).

| (I) Materia prima (Naranja y Papa) | (J) Materia prima (Naranja y Papa) | Sig. | Intervalo de confianza al 95% | |
|---------------------------------------|---------------------------------------|-------|-------------------------------|-----------------|
| | | | Límite inferior | Límite inferior |
| 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 |

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:

$$Y = mx + b$$

$$Y = 1.47283x + 0,0053$$

$$R^2 = 0,9977$$

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. 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.

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

Tabla 5. Resultados fermentación combinaciones porcentuales de cáscara de naranja y papa.

| Horas | N100 | | | | P100 | | | | N25P75 | | | |
|-------|-----------|---------|---------|------------|-----------|---------|---------|------------|-----------|---------|---------|------------|
| | 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 | 6,93 | ND | 3,09E+6 | ND | 26,02 | ND | 1,60E+6 | ND | 21,25 | ND | 3,25E+6 | ND |
| 3 | 1,70 | 0,028 | 3,84E+7 | 0,289 | 7,155 | 0,035 | 3,09E+7 | 0,040 | 5,935 | 0,023 | 7,25E+7 | 0,026 |
| 6 | 1,52 | 0,033 | 7,20E+7 | 0,304 | 6,542 | 0,049 | 3,63E+7 | 0,200 | 6,395 | 0,116 | 1,30E+8 | 0,058 |
| 9 | 1,38 | 0,048 | 3,09E+8 | 2,451 | 7,022 | 0,155 | 8,64E+8 | 3,544 | 4,672 | 0,14 | 6,72E+8 | 2,897 |
| 12 | 1,11 | 0,062 | 7,84E+8 | 2,596 | 6,485 | 0,199 | 1,69E+9 | 3,721 | 2,925 | 0,164 | 1,09E+9 | 4,442 |
| 15 | 1,23 | 0,091 | 1,27E+9 | 2,920 | 4,472 | 0,238 | 2,58E+9 | 8,236 | 3,005 | 0,218 | 1,49E+9 | 5,937 |
| 18 | 1,07 | 0,097 | 1,61E+9 | 4,174 | 3,302 | 0,342 | 5,22E+9 | 9,768 | 1,76 | 0,253 | 2,20E+9 | 8,755 |
| Horas | N50P50 | | | | N75P25 | | | | | | | |
| | ARR (g/L) | B (g/L) | NC / ml | PS (mg/ml) | ARR (g/L) | B (g/L) | NC / ml | PS (mg/ml) | | | | |
| 0 | 22,42 | ND | 3,41E+6 | ND | 10,68 | ND | 3,11E+6 | ND | | | | |
| 3 | 15,61 | 0,020 | 5,07E+7 | 0,004 | 4,112 | 0,052 | 6,11E+7 | 0 | | | | |
| 6 | 5,182 | 0,097 | 8,00E+7 | 0,094 | 4,139 | 0,061 | 8,00E+7 | 0,087 | | | | |
| 9 | 3,475 | 0,129 | 6,03E+8 | 1,816 | 2,852 | 0,087 | 8,94E+8 | 0,271 | | | | |
| 12 | 2,679 | 0,160 | 1,22E+9 | 3,945 | 2,732 | 0,117 | 1,47E+9 | 3,588 | | | | |
| 15 | 2,532 | 0,200 | 1,63E+9 | 5,568 | 2,262 | 0,173 | 1,73E+9 | 4,298 | | | | |
| 18 | 2,459 | 0,215 | 1,89E+9 | 6,868 | 2,022 | 0,311 | 2,19E+9 | 6,077 | | | | |

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:

$$Y = mx + b$$

$$Y = 0.5711 + 0.7266$$

$$R^2 = 0,9912$$

Tabla 6, se presenta el contenido promedio de proteína unicelular SCP (mg/ml) y en la Tabla 7, 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 8).

Tabla 6. Cantidad de Proteína unicelular (mg/ml).

| Combinaciones de naranja y papa | Media ^a | Desviación típica | N |
|---|--------------------|-------------------|----|
| N100 | 2,12281 | 1,814751 | 18 |
| P100 | 4,25198 | 3,884832 | 18 |
| N25P75 | 3,68621 | 3,346908 | 18 |
| ^a indica que hay Diferencias significativas $p \leq 0.05$, (n=3). | | | |

Tabla 7. 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 | 0 |
| Intersección | 1034,265 | 1 | 1034,27 | 533,25 | 0 |
| xcentr | 659,065 | 1 | 659,065 | 339,8 | 0 |
| trat | 49,579 | 4 | 12,395 | 6,39 | 0 |
| Error | 162,923 | 84 | 1,94 | | |
| Total | 1905,831 | 90 | | | |
| Total corregida | 871,567 | 89 | | | |
| ^a R cuadrado = ,813 (R cuadrado corregida = ,802) | | | | | |

Tabla 8 Comparaciones múltiples (prueba de Tukey) Cantidad de Proteína unicelular (mg/ml).

| Tratamientos | Promedio de los tratamientos | Diferencias de promedios ^a | | | | |
|---|------------------------------|---------------------------------------|-------------------|-------|-------|----------------------------------|
| | | Y1-Y2 | Y1-Y3 | Y1-Y4 | Y1-Y5 | |
| Y1= N100 | 2,122806 | -2,1 | 2,13 ^b | | | Rech H0 Diferencia significativa |
| Y2= P100 | 4,251978 | -1,6 | 1,56 ^b | | | Rech H0 Diferencia significativa |
| Y3= N25P75 | 3,686211 | 2,12 | 2,12 ^b | | | Rech H0 Diferencia significativa |
| Y4= N50P50 | 3,049478 | -1,7 | 1,72 ^b | | | Rech H0 Diferencia significativa |
| Y5= N75P25 | 3,839328 | 0,57 | 0,57 | | | No Rech H0 Diferencia n.s |
| | | Y2-Y4 | 1,2 | 1,2 | | 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 | -0,2 | 0,15 | | No Rech H0 Diferencia n.s |
| | | Y4-Y5 | -0,8 | 0,79 | | No Rech H0 Diferencia n.s |
| ^a : con $\alpha=0.05$ y $f= 84$ grados de libertad para el error. $q=(5,84)=3.82$. $T=1.30$ | | | | | | |
| ^b La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05. | | | | | | |

Parámetros cinéticos

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. (Tabla 9)

$$\mu_x = \ln 2 / td$$

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

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta x}{\Delta s}$$

Tabla 9. 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 |

Al analizar los resultados de la caracterización de la materia prima se observa que es útil para considerar aspectos relacionados como almacenamiento, pretratamiento para la posterior determinación del contenido de almidón y la selección del método de hidrólisis tanto de almidón como de celulosa. Durante esta caracterización, para el porcentaje de humedad en base húmeda (%Hbh) (Figura 2) se observó un comportamiento altamente homogéneo entre los datos, los coeficientes de variación fueron menores de 1.08, 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. 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 mayor cantidad de sólidos que los residuos de cáscara de papa (*Solanum tuberosum*) variedad Diacol Capiro (R-12,).

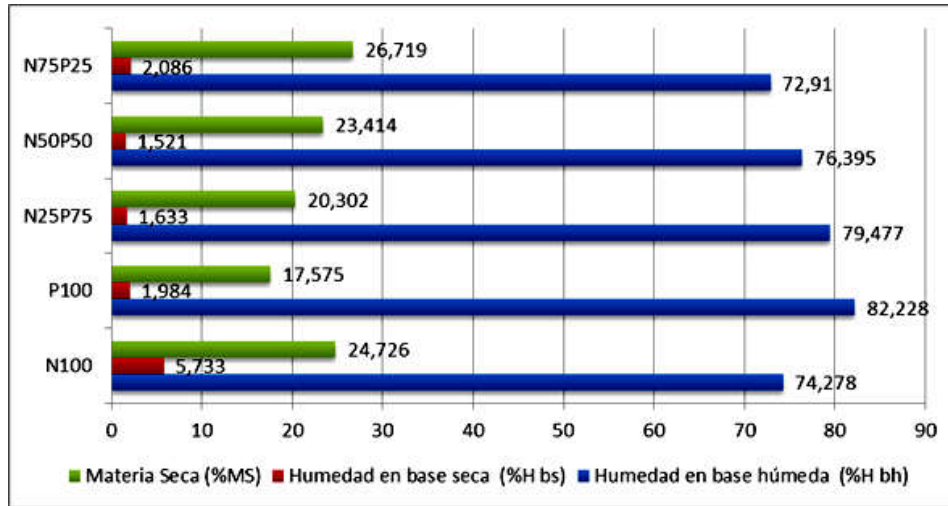


Figura 2. Caracterización de la materia prima para Humedad y Materia seca

Los valores de la

Figura 2 muestra el análisis estadístico para el parámetro de grasa, como extracto etéreo, indicando que los datos presentan un coeficiente de variación del 19.6%, es decir, que los datos son altamente heterogéneos lo que se traduce en 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.

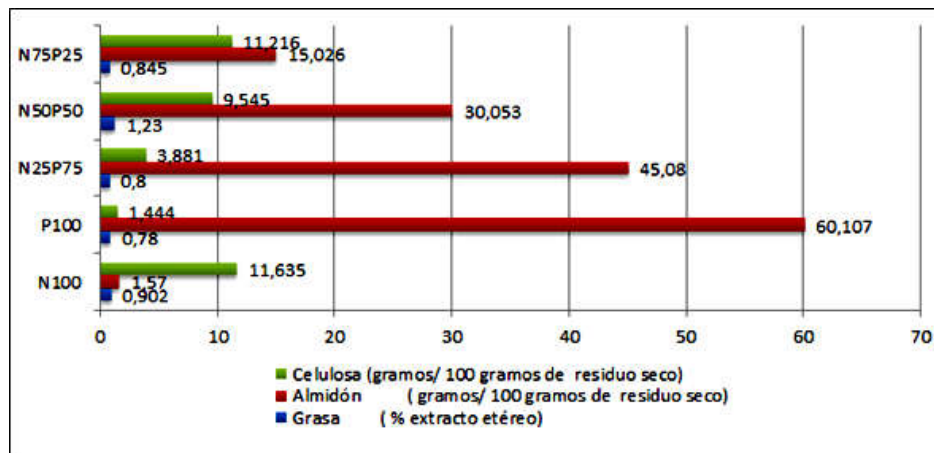


Figura 3. Caracterización de la materia prima para celulosa, almidón y grasa.

Observando los resultados de la Figura 3, los valores para el parámetro de grasa como extracto etéreo, el análisis estadístico indican que los datos presentan un coeficiente de variación del 19.6%, indicando que los datos son altamente heterogéneos, en consecuencia 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, 1998; Arapoglou, 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 3), se aprecia claramente que este 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.

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, 1995; Mahmood, 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, 1998; Arapoglou, 2010) y con contenidos de almidón en piel de papa del 66% y 52% y superiores a lo reportado por (Mars, y otros, 2010) con un 39% .

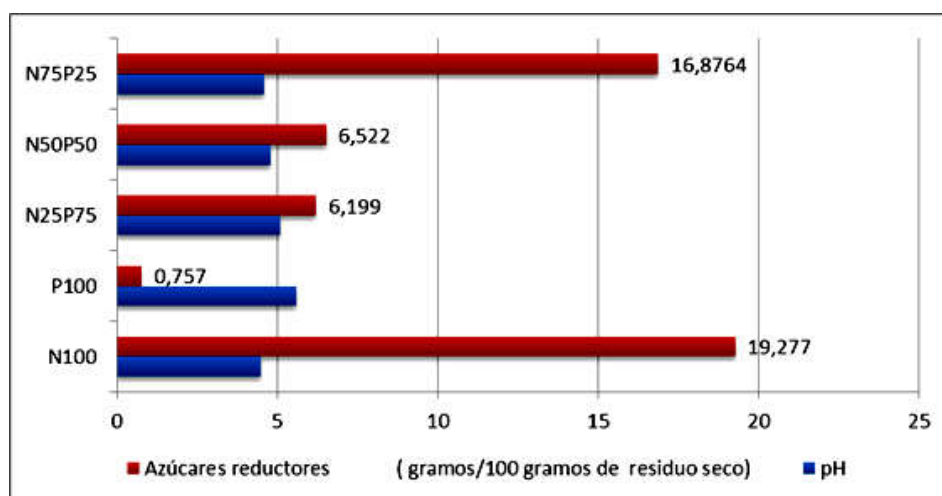


Figura 4. Caracterización de la materia prima para pH y azúcares reductores.

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 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 azucars 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, 1998; Arapoglou, 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, 1995) reporta un contenido mayor (23,2%), aun 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, 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 polisacáridos 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, Medina, & Ruíz, 2006; Tejeda, 2009) 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.

Por otra parte, el estudio de la Hidrólisis química constituye 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”.

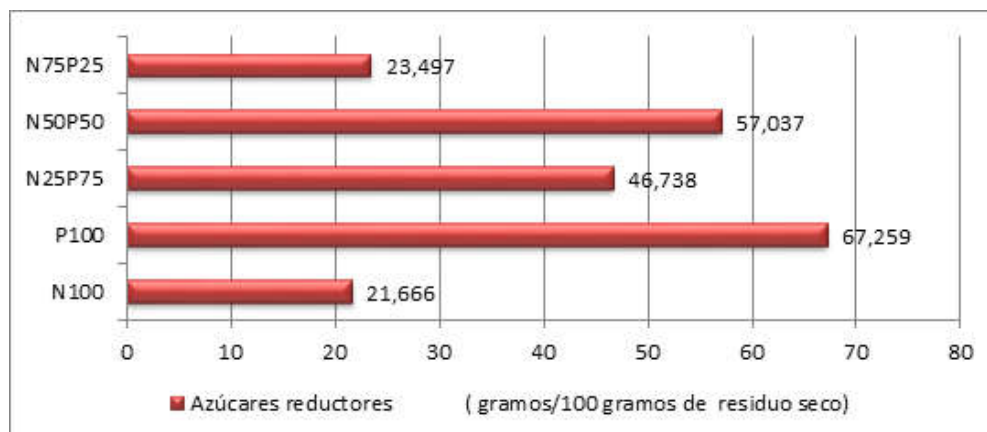


Figura 5. Cantidad de azúcares reductores después de la hidrólisis (g/gramos de residuo seco).

La hidrólisis química generó el aumento de azúcares reductores en cada una de los tratamientos (Figura 5) así: En los residuos de N100 y N75P25, la hidrólisis

química, no fue tan efectiva como en los otros tratamientos, ya que solo aumentó aproximadamente un 10% y 28% respectivamente el contenido de azúcares reductores; resultado que pudo verse afectado por varias razones, por ejemplo, (Giraldo & López, 2008) analizan que una hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa (0,5% de ácidos, 80°C, 1h) puede continuar hasta la formación de ácidos orgánicos y furfurales, disminuyendo el contenido de azúcares fermentables, (Lenihan, y otros, 2010), identifican 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 recomiendan (Gámez, 2006), desintoxicar los hidrolizados antes de inocular con una carbón activado (adsorción) para limpiar de sustancias como el hidroximetilfurfural (HMF), ácido acético, fufural y compuestos fenólicos provenientes de la lignina. Estos autores recomienda 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, y otros, 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, 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, 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 azucares/ 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/ 40 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, Medina, & Ruíz, 2006). Estos resultados son superiores a los trabajos de (Kang, 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, 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.

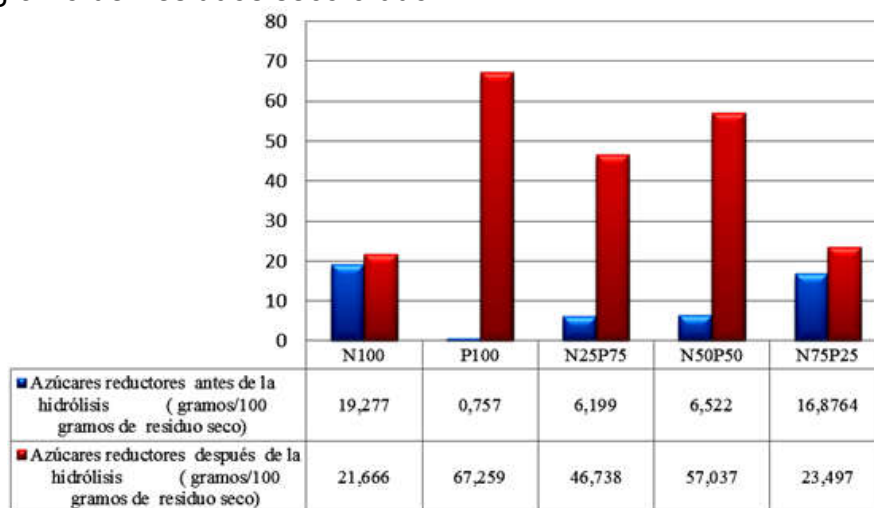


Figura 6. Producción de azúcares reductores antes y después de la hidrólisis química.

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.

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. Así mismo, de acuerdo con 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.

Referencias Bibliográficas

Arapoglou, D., Varzakas, Th., Vlyssides, A., Israilides, C., (2010). Ethanol production from potato peel waste (PPW). *Waste Management*, 30, 1898-1902.

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.

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).

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.

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.

Chiaramonti, 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.

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.

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).

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.

Grohmann, K., Cameron, R., Buslig, B (1995). Fractionation and pretreatment of orange peel by diluted acid hydrolysis. *Bioresource Technology*, 95, 129-141.

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.

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.

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.

Monsalve, J. Medina, R. y Ruiz, P. (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 Biorreactores y enzimología*. Universidad de Murcia.

Official Methodos of Analysys AOAC, 1990, Método 964.22: Determinación de humedad y materia seca.

Official Methodos of Analysys AOAC, 1990, Método AOAC 920.39: Determinación porcentaje de grasa método Soxhlet.

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.

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.

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

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*,

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.