



Universidad Autónoma de Nayarit

Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias

**Aprovechamiento de la pulpa, cáscara de mango
(*Mangifera Indica L.*) y bagazo de caña para la
obtención de productos de interés Agro Industrial**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL, PARA OBTENER EL GRADO
MAESTRO EN CIENCIAS EN EL ÁREA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS**

Presenta:

QFB. Jorge Luis Villalpando Guzmán

**Tutor: Dr. Sergio Francisco Jaubert
Cotutor: M en C. María Luisa Machuca
Asesor: M en C. Juana Edelia Vidales**

Tepic, Nayarit; Agosto del 2010



INDICE

Lista de Figuras.....	i
Lista de Tablas.....	iii
Resumen.....	1
Capítulo 1. Introducción.....	2
1.1 Hipótesis.....	6
1.2 Objetivos.....	6
Capítulo 2. Revisión de Literatura.....	7
2.1 Mango y sus componentes.....	7
2.2 Deshidratación y Secado complementario.....	9
2.2.1 Ventajas y desventajas de la Deshidratación osmótica.....	11
2.3 Bagazo de Caña.....	13
2.4 Fermentación en Estado Sólido.....	14
2.4.1 Ventajas.....	16
2.4.2 Desventajas.....	17
2.5 Comparación entre FES y FMS.....	17
2.6 Inducción de pectinasas en hongos.....	18
2.7 Trabajos Realizados.....	20
2.8 Enzimas.....	23
2.9 Pectinas.....	24
2.9.1 Composición y estructura.....	25
2.9.2 Clasificación.....	27
2.9.2.1 Grado de Metilación.....	28
2.9.2.2 Enlaces de Calcio.....	28
2.9.3 Aplicación de las pectinas.....	29
2.10 Pectinas.....	30
2.10.1 Clasificación.....	30
2.10.1.1 Pectinesterasas.....	30
2.10.1.2 Hidrolasas y Liasas.....	31
2.10.1.3 Protopectinas.....	33
2.10.2 Aplicaciones de las pectinasas.....	33
2.10.2.1 Pectinas ácidas.....	33
2.10.2.2 Pectinasas alcalinas.....	36
Capítulo 3. Metodología.....	40

3.1 Secado complementario con microondas sobre rebanadas predeshidratadas osmóticamente.....	40
3.2 Pellets de Mango.....	43
3.2.1 Análisis de los extruidos de cáscara de mango.....	44
3.3 Cinéticas de Producción de pectinasas.....	46
3.3.1 Caracterización bioquímica de los extractos.....	50
3.3.1.1 DNS.....	50
3.3.1.2 pH Óptimo.....	51
3.3.1.3 Temperatura Óptima.....	51
3.3.1.4 Termoestabilidad.....	52
Capítulo 4. Resultados y Discusiones.....	53
4.1 Obtención de Rebanadas deshidratadas secadas con microondas.....	53
4.2 Obtención de pellets de la cáscara de mango.....	56
4.2.1 Caracterización de propiedades de los extruidos de cáscara de mango.....	58
4.2.2 Prueba de Paleabilidad.....	59
4.2.3 Evaluación de Color.....	59
4.3 Condiciones de Fermentación en estado sólido.....	60
4.3.1 pH Óptimo.....	60
4.3.2 Temperatura Óptima.....	68
4.3.3 Termoestabilidad.....	72
4.3.3.1 Termoestabilidad 50°C.....	73
4.3.3.2 Termoestabilidad 60°C.....	75
4.3.3.3 Termoestabilidad 70°C.....	78
Capítulo 5. Conclusiones.....	86
5.1 Perspectivas.....	87
Capítulo 6. Literatura Citada.....	89
Anexo 1. Composición porcentual de los principales desechos agropecuarios.....	101
Anexo 2. Componentes principales de Fermentación en Estado Sólido (FES).....	103
Anexo 3. Azúcares reductores totales presentes en pellets de cáscara de mango.....	104

Lista de Figuras

Fig. 1. Estructura de molécula de pectina.....	25
Fig. 2. Regiones identificadas de la molécula de pectina.....	26
Fig. 3. Estructura molecular de la pectina, mostrando la clasificación de las pectinasas.....	30
Fig. 4. Hidrólisis del monómero del ácido galacturónico.....	32
Fig. 5. Imágenes de tres geometrías de rebanadas de mango predeshidratadas osmóticamente que se sometieron al secado complementario con microondas.....	40
Fig. 6. Empleo de Rebanadora Industrial.....	43
Fig. 7. Pasta de cáscara de mango.....	43
Fig. 8. Charolas con pasta de cáscara de mango secándose al sol.....	44
Fig. 9. Pasta de cáscara de mango extruida.....	44
Fig. 10. Extruidos secados con aire convencional.....	45
Fig. 11. Pellets de mango cermidos en malla 8.....	46
Fig. 12. BCA cermido en malla 30 y 40.....	46
Fig. 13. Hongo esporulado, <i>Aspergillus awamori</i> en medio PDA.....	47
Fig. 14. Columna para fermentación con algodón y papel filtro en fondo.....	48
Fig. 15. Fermentador a 30°C, con Columnas en soporte y suministro de aire.....	49
Fig. 16. Efecto del peso de la carga y del tiempo de secado complementario con microondas, sobre el porcentaje de daño térmico.....	54
Fig. 17. Efecto del peso de la carga y del tiempo de secado complementario con microondas, sobre el porcentaje de termoexpansión.....	55
Fig. 18. Efecto del peso de la carga y del tiempo de secado complementario con microondas, sobre °Brix.....	56
Fig. 19. Efecto del tiempo de Fermentación sobre la producción de actividad de pectinasa por <i>A. awamori</i> en FES 1, 2 y 3.....	63
Fig. 20. Efecto de los diferentes sustratos sobre la producción de actividad de pectinasa por <i>A. awamori</i> en FES 1, 2 y 3.....	63
Fig. 21. Efecto de los diferentes pH sobre la actividad de pectinasa producida por <i>A. Awamori</i> en FES 1, 2 y 3.....	64
Fig. 22. Efecto del tiempo de Fermentación sobre la producción de actividad de pectinasa por <i>A. awamori</i> en FES 4 y 5.....	66
Fig. 23. Efecto del sustrato de fermentación sobre la producción de actividad de pectinasa por <i>A. awamori</i> en FES 4 y 5.....	67

Fig. 24. Efecto del pH sobre la actividad de pectinasa producida por <i>A. awamori</i> en FES 4 y 5.....	67
Fig. 25. Efecto de la temperatura sobre la actividad de pectinasa producida por <i>A. awamori</i> en FES 1, 2 y 3.....	70
Fig. 26. Efecto del soporte sobre la actividad de pectinasa producida por <i>A. awamori</i> en FES 1, 2, 3, 4 y 5.....	71
Fig. 27. Interacción entre el efecto del tiempo de fermentación y el sustrato utilizados para producción de pectinasas.....	72
Fig. 28. Medias de la Actividad residual de pectinasa en los diferentes extractos. Termoestabilidad a 50°C.....	75
Fig. 29. Medias de la actividad residual de pectinasa en los diferentes extractos. Termoestabilidad a 60°C.....	78
Fig. 30. Medias de la Actividad residual de pectinasa en los diferentes extractos, Termoestabilidad a 70°C.....	80
Fig. 31. Termoestabilidad a 60°C para la FES 1.....	82
Fig. 32. pH óptimo de cinéticas de Fermentación.....	83

Lista de Tablas

Tabla 1. Diseño Central Compuesto empleado para cada una de las tres geometrías descritas. Factores controlados: Tiempo de tratamiento térmico con microondas y peso de la carga de rebanadas a deshidratar.	42
Tabla 2. Condiciones de Fermentación.....	50
Tabla 3. Cifras calculadas con base en las interacciones de factores controlados, relacionados con el menor daño térmico del producto.....	53
Tabla 4. Composición proximal (% B,S) de los extruidos de la cáscara de mango.....	58
Tabla 5. Color y luminosidad de extruidos de mango a diferentes tiempos de almacenamiento.....	59
Tabla 6. Resultados en pH óptimo para pellets a 50°C para FES 1.....	60
Tabla 7. Resultados de pH óptimo para pellets a 60°C para FES 2.....	61
Tabla 8. Resultados de pH óptimo para pellets a 70°C para FES 3.....	61
Tabla 9. Análisis de varianza para actividad enzimática de pectinasa medida a diferentes pH.....	62
Tabla 10. Resultados pH óptimos para pellets lavados, secado a 60°C en FES 4.....	64
Tabla 11. Resultados de pH óptimo para pellet lavado, secado a 70°C en FES 5.....	65
Tabla 12. Análisis de Varianza para actividad enzimática a diferentes pH...	
Tabla 13. Resultados de Temperatura óptima para pellets a 50°C para FES 1.....	66
Tabla 14. Resultados de Temperatura óptima para pellets a 60°C para FES 2.....	68
Tabla 15. Resultados de Temperatura óptima para pellets a 70°C para FES 3.....	69
Tabla 16. Análisis de la Varianza de la actividad de pectinasa a diferentes temperaturas.....	69
Tabla 17. Resultados de Temperatura óptima para pellet lavado, secado a 60°C en FES 4.....	70
Tabla 18. Resultados Temperatura óptima para pellet lavado, secado a 70°C en FES 5.....	71
Tabla 19. Resultados de Termoestabilidad a 50°C para pellet a 50°C para FES 1.....	73

Tabla 20. Resultados de Termoestabilidad a 50°C para pellet a 60°C para FES 2.....	73
Tabla 21. Resultados de Termoestabilidad a 50°C para pellet a 70°C para FES 3.....	74
Tabla 22. Resultados Termoestabilidad a 50°C para pellet lavado, secado a 60°C en FES 4... ..	74
Tabla 23. Resultados de Termoestabilidad a 50°C para pellet lavado, secado a 70°C en FES 5.....	74
Tabla 24. Análisis de varianza de la termoestabilidad de los extractos enzimáticos a 50°C.....	75
Tabla 25. Resultados de Termoestabilidad a 60°C para pellet a 50°C para FES 1.....	76
Tabla 26. Resultados de Termoestabilidad 60°C para pellet a 60°C para FES 2.....	76
Tabla 27. Resultados de Termoestabilidad a 60°C para pellet a 70°C para FES 3.....	76
Tabla 28. Resultados de Termoestabilidad a 60° para pellet lavado, secado a 60°C, en FES 4.....	76
Tabla 29. Resultados Termoestabilidad a 60°C para pellet lavado, secado a 70°C, en FES 5.....	77
Tabla 30. Análisis de varianza de la termoestabilidad de los extractos enzimáticos a 60°C.....	77
Tabla 31. Resultados de Termoestabilidad a 70°C para pellet a 50°C para FES 1.....	78
Tabla 32. Resultados de Termoestabilidad a 70°C para pellet a 60°C, para FES 3... ..	79
Tabla 33. Resultados de Termoestabilidad a 70°C para pellet lavado, secado a 60°C, para FES 4.....	79
Tabla 34. Resultados Termoestabilidad a 70°C para pellet lavado, secado a 70°C, para FES 5.....	79
Tabla 35. Análisis de varianza de la termoestabilidad de los extractos enzimáticos a 70°C.....	80
Tabla 36. Resultados de cinéticas enzimáticas expresados en unidades totales por columna... ..	81

Resumen

En este trabajo se utilizaron esquilmos derivados de agroindustrias nayaritas tales como la cáscara de mango y bagazo de caña para la producción de pectinasas en una fermentación de Estado sólido. Las cáscaras de mango se sometieron a un proceso de reducción de partícula empleó un molino de cuchillas, obteniendo una pasta suave y uniforme, ésta pasta se llevó a un proceso de secado con aire caliente hasta llegar a una humedad del 15%, a los extrudidos de cáscara de mango se les aplicó un secado complementario a tres temperaturas 50°C, 60°C y 70°C hasta un contenido final de humedad del 7.8%. Los pellets fueron utilizados como sustrato, en Fermentación en Estado Sólido (FES), teniendo como soporte bagazo de caña y al hongo *Aspegillus awamori* como productor de pectinasas. Se realizaron tres cinéticas de producción en un fermentador de estado sólido de columnas, las condiciones de fermentación fueron las siguientes: para la FES-1 se consideró un pellet a 50°C y bagazo de caña (50%-50%), inoculo con 1.3×10^7 esporas/ml y humedad del 75%. Para la FES-2 pellet a 60°C y bagazo de caña (50%-50%) inoculo de 1.1×10^7 esporas/ml y humedad del 75% y para la FES-3 pellet a 70° y bagazo de caña (50%-50%), inoculo de 1.9×10^7 esporas/ml y humedad del 75%, ajustó la temperatura de fermentación a 30°C. Se realizó una cinética de actividad, en la que se tomó muestras cada 24 horas. La actividad de pectinasa de los extractos, se determinó utilizó el método de DNS, para la medición de azúcares reductores liberados por la actividad de pectinasa. Para la caracterización bioquímica de los extractos, se determinaron los pH óptimos (3.6, 4.5, 5.0, 6.0 y 6.5), y las temperaturas óptimas (35°C hasta 70°C), además de la termoestabilidad a 50, 60 y 70°C (cada 30 min.). Los resultados obtenidos en estas pruebas fueron los siguientes: El pH óptimo encontrado fue de 4.5, 6.0 y 4.5 para los extractos de la FES-1, 2 y 3, respectivamente. Con respecto a las temperaturas óptimas, las mejores actividades se detectaron a los 60°C, 50°C y 45°C para los extractos de la FES-1, 2 y 3, respectivamente. De acuerdo a los primeros resultados obtenidos de las cinéticas enzimáticas, la máxima actividad de la pectinasa se obtiene dentro de las primeras 48 horas de iniciada la fermentación, posteriormente no existe un incremento significativo de la actividad. A partir de los resultados, se continuó con la optimización de las condiciones de fermentación para la incrementación de la actividad de pectinasa. Las cinéticas FES 4 y FES 5, no se encontraron diferencias significativas en la producción de pectinasas, siendo su tiempo máximo de producción de 24 horas, a un pH de 6.5. Tomando en cuenta que no es significativo el utilizar pellets de mango secados a diferentes temperaturas.

Capítulo 1. Introducción

México, es uno de los principales países productores de frutas tropicales a escala mundial, ocupa el tercer lugar como productor de mango con más de 1, 500,000 toneladas (SAGARPA, 2009.) Después de la India que exporta 240,000 toneladas anuales, México es el segundo exportador de mango a nivel mundial, con aproximadamente 236,000 toneladas; el tercer exportador es Brasil con apenas 116,000 toneladas de las exportaciones de mango a nivel mundial (FAO, 2007). En México, estado de Nayarit es uno de los más importantes productores de frutas tropicales entre las que destaca por su cantidad, y calidad sensorial el mango, con una producción de 291,100 toneladas anuales (SAGARPA, 2009).

Nayarit tiene el potencial de incrementar significativamente su producción de frutas tropicales, sin embargo no se ha hecho, debido al alto porcentaje de pérdidas que se tiene de estos productos. Al mismo tiempo, que el 95% de la demanda internacional de productos elaborados a partir de frutas tropicales, se encuentra desatendida (Revista Claridades Agropecuarias, 2006). Para coadyuvar al desarrollo integral del estado de Nayarit, es necesario considerar a la agroindustria, como el medio más importante para diseñar nuevas líneas de proceso, como la Deshidratación Osmótica de frutas tropicales, y así aumentar el aprovechamiento de estas frutas, y satisfacer parte de la demanda internacional. Deben desarrollarse productos que permitan conservar al mango en el lugar y tiempo de abundancia, con el objeto de disponer de él durante todo el año y así disminuir las pérdidas debidas a la alta propensión a la descomposición de esta fruta. En la obtención de productos de buena aceptación se requiere de métodos rápidos y objetivos que permitan predecir y controlar la calidad, desde la recepción de la materia prima hasta que el producto terminado llegue al consumidor (Chua y cols., 2000)

Existe una extensa gama de productos que se pueden elaborar a partir de frutas frescas. Sin embargo, los principios de conservación son prácticamente los mismos, y están enfocados a contrarrestar los efectos de los factores de deterioro como los microorganismos, la actividad enzimática, y las oxidaciones (Mayor y

Sereno, 2004). La eliminación de la humedad y la incorporación de diversas sustancias de los alimentos se pueden lograr en forma simultánea mediante su inmersión en soluciones acuosas hipertónicas, elaboradas a partir de azúcares, sales, polioles y otros sólidos solubles, que permitan establecer un gradiente de concentraciones entre el alimento y la solución concentrada. Este proceso se conoce como Deshidratación Osmótica (Xian-Ju y cols., 2007; Chou y Chua, 2001), entre sus muchas aplicaciones se encuentra el desarrollo de nuevos productos, ya sea para consumo directo, o como productos predeshidratados, lo que permite ahorrar energía en el secado, mejorar la estabilidad, las propiedades funcionales, la textura, el contenido de nutrimentos y la calidad sensorial de los alimentos deshidratados. Los productos osmodeshidratados son materiales generalmente suaves que permiten darles formas atractivas para el consumidor.

La Deshidratación Osmótica es un método que mejora la calidad de los alimentos deshidratados en cuanto a su textura, color, y atributos sensoriales, entre otros. Sin embargo, mediante la deshidratación osmótica no se elimina la suficiente humedad para que los alimentos osmodeshidratados sean estables, por lo que se requiere aplicar un método complementario de secado (Kumar y cols, 2006). Como métodos complementarios de secado para los alimentos osmodeshidratados se encuentran el secado con aire caliente, el secado con pulso de vacío, la liofilización, el secado solar y el secado con microondas (Venkatachalapathy y Ragavan, 1999). Los atributos de calidad y estabilidad de los alimentos osmodeshidratados se relacionan directamente y en forma significativa con las condiciones de proceso empleadas en el método de secado complementario (Fito y cols, 2001). El secado con microondas ofrece importantes ventajas como método complementario en alimentos osmodeshidratados, ya que favorece la Termo Expansión del producto, reduce la pérdida de vitamina C y ácido ascórbico, favorece la retención de nutrimentos (Sabiani, 2006), requiere cortos tiempos de secado y no es expuesto a los factores contaminantes y deteriorativos presentes en el secado con aire o en el secado solar (Beaudry y cols, 2003; Erle, 2005).

En México, en el estado de Nayarit se siembran y cosechan grandes cantidades de productos agrícolas como son el mango, caña de azúcar, plátano, sandía, melón, sorgo, arroz y frijol, entre otros. De estos productos que se cosechan, el mango y la caña de azúcar son los de mayor importancia por su producción a nivel nacional.

De acuerdo con un monitoreo agroeconómico del 2009 de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), la producción de mango fue de 239,719.5 toneladas en una superficie sembrada de 20,971 hectáreas. Así mismo, la producción de caña de azúcar fue de 2,781,325 toneladas en una superficie sembrada 34,069 hectáreas. (SAGARPA, 2009).

En contraste con la producción de estos recursos agrícolas, en Nayarit se generan anualmente más de 5000 toneladas anuales de residuos de cáscara y hueso de mango, de ellos se utilizan cerca del 20% para generar compostas orgánicas, el resto no es aprovechado para generar algún subproducto derivado y simplemente se desecha, generando costos de transporte a las empresas, el cual no es redituable. Para el caso del bagazo de caña la producción anual es de aproximadamente 834,000 toneladas (Revista Claridades Agropecuarias, 2006).

En Nayarit, el manejo de los esquilmos (cáscaras y huesos) de mango es una problemática que requiere ser atendida. Por la magnitud de este problema, los proyectos relacionados con la utilización de estos subproductos deben estar enfocados al desarrollo de alternativas factibles de implementar en Nayarit.

El bagazo es uno de los subproductos que tiene mayor demanda en México por sus características combustibles y lignocelulósicas. A este respecto, se debe señalar que el principal consumidor de este material es la propia industria azucarera, que lo aprovecha como fuente de energía al ser quemado en los ingenios azucareros; se calcula que aproximadamente el 86% del bagazo generado se usa para estos fines (Revista claridades Agropecuarias, 2006).

Diversas aplicaciones para el aprovechamiento del bagazo de caña han sido reportadas, combustible y biocombustibles, producción de papel, etc. Las

cáscaras de mango pueden ser empleadas en la preparación de pectina y fibra dietética. La preparación de fibra pectina es una alternativa en la producción de ingredientes a bajo costo (Larrauri y cols., 1996).

El uso de residuos agroindustriales en bioprocesos proporcionan sustratos alternativos, junto con el advenimiento de innovaciones biotecnológicas, principalmente en el área de enzimas y la tecnología de fermentación, se han abierto grandes posibilidades para la el aprovechamiento de dichos residuos. (Pandey y Soccol, 2000).

Por lo tanto, se producen grandes cantidades de esta fruta Los resultados obtenidos en el presente trabajo permitieron optimizar las condiciones de proceso del secado complementario con microondas a nivel de planta piloto, lo cual permitió integrar una línea de proceso para frutas osmodeshidratadas, como una alternativa para el mejor aprovechamiento del mango de la región. El aprovechamiento del bagazo de caña y la cáscara de mango para la producción de metabolitos de interés alimentario o comercial tales como enzimas pectinasas sería de especial importancia para el estado de Nayarit, para ello se implementaron dos procesos biotecnológicos, uno para formar pellets de cáscara de mango, las cuales sirvieron como soporte de producción de pectinasas y un proceso de producción biotecnológico llamado Fermentación en Estado Sólido, el cual, es definido como el cultivo de microorganismos sobre material sólido en ausencia o casi ausencia de agua libre, para la producción de las enzimas (Sanzo y cols., 2001). Realizándose la investigación dentro del proyecto de Fondos Mixtos Nayarit, 92071, Estrategias para monitorear la producción de lipasas y pectinasas por fermentación en estado sólido utilizando residuos agrícolas del estado de Nayarit.

1.1 Hipótesis

El empleo de esquimos agrícolas tales como pellets de cáscara de mango como sustrato y bagazo de caña como soporte en Fermentación por estado sólido (FES), favorecen la producción de enzimas pectinasas de interés biotecnológico.

1.2 Objetivos

Objetivo General

Utilizar esquimos de cáscara de mango y bagazo de caña del Estado de Nayarit para producir pectinasas de interés biotecnológico por medio de una fermentación de Estado Sólido.

Objetivos Particulares

- Procesar esquimos de mango para obtener pellets secados a 50°C, 60°C y 70°C, útiles como sustrato en la fermentación de Estado sólido.
- Obtener extractos enzimáticos, a partir de Fermentación en estado sólido, utilizando pellets de cáscara de mango y bagazo de caña de azúcar como fuentes de carbono.
- Caracterizar bioquímicamente los extractos crudos en base a su pH óptimo, Temperatura óptima y su termoestabilidad en temperaturas de 50°C, 60°C y 70°C

Capítulo 2. Revisión de literatura

2.1 Mango y sus componentes.

El mango (*Mangifera indica*, L.) es una fruta producida en más de 90 países por todo el mundo (FAOSTAT 2007). Durante el tratamiento de mango, son generados esquilmos como son la cáscara y el hueso, que representan cerca del 40% del peso total de la fruta. Son ricos en varias sustancias nutritivas como azúcares, ácidos orgánicos, sustancias colorantes, proteínas, aceites y vitaminas que pueden ser de interés en la industria alimentaria, farmacéutica, química o cosmética (Kumar y cols., 2009).

En la mayoría de las variedades de mango, la cáscara constituye aproximadamente del 20 al 25% del total del peso de la fruta (Srirangarajan y Srikye, 1976). De la cáscara de mango se puede obtener pectinas con un alto grado de gelificación (220°). Los geles de pectina son importantes para crear o modificar la textura de compostas, jaleas, confites y productos lácteos bajos en grasa. La pectina es también utilizada como ingrediente en preparaciones farmacéuticas, como antiarréicos y desintoxicantes, entre otros. Además, ésta reduce la intolerancia a la glucosa en diabéticos, e incluso baja el nivel del colesterol sanguíneo (Berardini y cols., 2005).

En muchos países se utilizan las cáscaras de mango para la elaboración de compostas, las cuales han demostrado ser buenos fertilizantes para el cultivo del mango, ya que le restituyen algunos de sus nutrimentos esenciales. Es componente habitual de la alimentación de ganado vacuno, porcino y caprino. También, mediante procesos fermentativos se puede obtener a partir de la cáscara de mango, ácido acético, ácido cítrico, y alcohol. Así como, enzimas principalmente celulasas y pectinasas (Berardini y cols., 2005)

La cáscara de mango tiene propiedades astringentes, por lo que es utilizada como un ingrediente muy importante en la elaboración de productos de cosmetología. La fibra de la cáscara de mango es una buena fuente de fibra dietaria, y su composición química es similar a las fibras obtenidas de las cáscaras

cítricas, por lo que es incluida en la elaboración de alimentos dietéticos (Sudhakar y Maini, 2000)

El aroma y sabor de la cáscara de mango son agradables y persistentes, además, la cáscara de mango tiene un importante contenido de pectina y una alta actividad antioxidante, por lo que se ha utilizado para elaborar mermeladas con buen nivel de aceptación sensorial. La cáscara de mango ha sido utilizada para la obtención de pectina por vía química. La extracción de pectina por vía enzimática presenta algunas ventajas con respecto a la pectina extraída químicamente, ya que estos materiales pueden presentar actividad biológica y aplicaciones médicas (Sudhakar y Maini, 2000).

Los residuos agroindustriales son generados en gran cantidad durante el tratamiento y su disposición más bien causa varios problemas ambientales. Hubo una tendencia creciente hacia la utilización más eficiente de residuos agroindustriales como el bagazo de yuca, el bagazo de caña de azúcar, la pulpa de remolacha, la pulpa/cáscara de café, la cáscara de mango, cáscara de manzana, etc., como sustratos en bioprocesos. Son utilizados como las materias primas potenciales para el crecimiento de microorganismos que les suministra las sustancias nutritivas esenciales (Pandey y Soccol, 1998; Pandey, 1994; Pandey y Soccol, 2000; Pandey y cols., 2000a; 2000b; 2000c; 2000d; Pandey, 1999a; Pandey, 1992).

Actualmente han sido desarrolladas mejores tecnologías con el propósito de lograr el aprovechamiento y degradación de desechos agrícolas mediante procesos fermentativos de bajo costo y alto rendimiento, que generen productos como las pectinasas, de amplia aplicación en la industria nacional. La atención de hoy en día en particular ha sido el pago por productos con valor agregado extraídos de fuentes baratas como los restos de industrias agrícolas; estos incluyen la melaza de caña de azúcar, esquilmos de piel de papas, semillas y cáscara de uvas, semillas y cáscaras cítricas, subproductos verdes de verduras, y subproductos de cacao (Guimaraes y cols., 2007).

2.2 Deshidratación y Secado Complementario

La conservación de frutas y vegetales se ha ido aplicando a lo largo de cientos de años, basados en las técnicas de secado solar. La calidad de un alimento es importante, para ello se han ido perfeccionando técnicas de secado tales como Secado con Aire caliente, vacío, congelado, deshidratación osmótica, lecho fluido, microondas o bien la combinación de estos (George y cols., 2004; Bezyma y Kutovoy, 2005).

La aplicación del fenómeno de ósmosis en la deshidratación de frutas se puede aprovechar debido a que un gran número de frutas, como es el caso del mango, de la fresa, papaya, piña, melón entre otras, cuentan con elementos necesarios para inducir la osmosis. Estos elementos corresponden a la pulpa, que en estas frutas consiste en una estructura celular más o menos rígida que actúa como membrana semipermeable.

Detrás de estas membranas celulares se encuentran los jugos, que son soluciones diluidas, donde se hallan disueltos sólidos que oscilan entre el 5 a 18% de concentración. Se esta fruta entera o trozos se sumerge en una solución o jarabe de azúcar de 70%, se tendría un sistema donde se presentaría el fenómeno de ósmosis. Los jugos en el interior de las células de la fruta están compuestos por sustancias disueltas en agua, como ácidos, pigmentos, azúcares, minerales, vitaminas, etc.

La deshidratación osmótica consiste en un proceso de eliminación del agua contenida en el interior de sólidos celulares, mediante su inmersión en una disolución concentrada (jarabe o salmuera). La fuerza impulsora requerida para el flujo del agua es la diferencia de potencial químico entre la disolución y el fluido intracelular. Si la membrana es semipermeable, el soluto es incapaz de difundirse hacia el interior de las células a través de la membrana. No obstante en los sistemas alimentarios es difícil tener membranas perfectamente semipermeables, debido a su compleja estructura interna, y siempre se produce alguna difusión del soluto hacia el alimento, y viceversa, una lixiviación del propio soluto del alimento hacia fuera.

El proceso de deshidratación osmótica se caracteriza por tener 2 periodos: uno dinámico y el otro de equilibrio (Rahman 1992). En el periodo dinámico las velocidades de transferencia de materia aumentan o disminuyen hasta que se alcanza el equilibrio. El proceso osmótico termina cuando se alcanza este equilibrio, o sea, cuando la velocidad neta de transporte de materia es cero. El agua se elimina principalmente por difusión y por flujo capilar, mientras que la captación del soluto o lixiviación se produce solamente por difusión (Raoult-Wack, 1994)

Este es un proceso determinado por los fenómenos de flujo osmótico de transporte en medio líquido. El agua se extrae de los alimentos mediante el uso de la presión osmótica generada por soluciones hipertónicas. Al sumergir al alimento en soluciones osmóticas, se generan gradientes de potencial químico entre el alimento y la solución, estos gradientes constituyen las fuerzas impulsoras para la transferencia de masa durante el proceso osmótico, el cual se caracteriza por la presencia de flujos de agua y de solutos, simultáneos y en contracorriente (Barat, 1998).

En circunstancias como el aumento de la temperatura por escaldado previo de las frutas, la baja agitación o calentamiento del sistema se puede producir ingreso de sólidos hasta un 6 a 10%. Como hasta ahora se ha visto, de las características y las condiciones en que se realice el proceso, dependerán los fenómenos que dentro del sistema fruta:jarabe se presenten

La reducción de la actividad acuosa de los alimentos que produce dos transformaciones simultáneas en el producto, una debida a la pérdida de agua y otra, debida a la ganancia de sólidos. En el proceso osmótico el agua se extrae del alimento en forma líquida y sin que ésta cambie de fase; la transferencia de masa entre el alimento y la solución se puede realizar incluso a temperatura ambiente, hecho que favorece la preservación de nutrimentos, de atributos sensoriales y de estructuras en los alimentos (Torreggiani, 1995).

Esta reducción de la actividad acuosa limita el desarrollo microbiano en los alimentos, que simultáneamente se enriquece al producto con diversos compuestos, mejorando sus propiedades nutricionales y de estabilidad. Una característica importante apreciada en los alimentos osmo-deshidratados, es la formación y retención de una capa de solutos en la superficie, que protege al alimento de agentes externos, reduce la pérdida de sólidos y le confiere al producto propiedades especiales para posteriores tratamientos (Azuara, 1999).

Los productos obtenidos por deshidratación osmótica son más estables durante el almacenamiento que los alimentos no tratados por este método. Esto es debido a que contienen menor actividad de agua, provocada por la ganancia de soluto y la pérdida de agua. A baja actividad de agua las reacciones químicas causantes del deterioro en el alimento, también son menores, así como la producción de toxinas por microorganismos.

En el enlatado de frutas y hortalizas frescas con alto contenido de humedad, el agua puede fluir desde el producto a la salmuera o jarabe provocando disolución. Esto puede evitarse mediante el proceso predeshidratado osmótico, con el que se consigue mejorar la estabilidad del producto (Sharma y col., 1991). El soluto ejerce efecto germicida, restringiendo de este modo el crecimiento de organismos aerobios.

Desde el punto de vista industrial la deshidratación osmótica implica importantes ventajas ya que es una técnica de conservación apropiada para muchos alimentos, incluso para tejidos vegetales dañados, ya sea por pretratamientos, o por mal manejo (Toupin y Le Mayer, 1989; Hough y col., 1993).

2.2.1 Ventajas y Desventajas de la Deshidratación Osmótica

Algunas de las ventajas logradas están relacionadas con la conservación de la calidad sensorial y nutricional de las frutas.

El agua que sale de la fruta al jarabe de temperatura ambiente y en estado líquido, evita las pérdidas de aromas propios de la fruta, los que si se volatizarían o

descompondrían a las altas temperaturas que se emplea durante la operación de evaporación que se practica durante la concentración o deshidratación de la misma fruta mediante otras técnicas.

La ausencia de oxígeno en el interior de la masa de jarabe donde se halla la fruta, evita las correspondientes reacciones de oxidación (pardeamiento enzimático) que efectúan directamente la apariencia del producto final.

La deshidratación de la fruta sin romper células y sin poner en contacto los sustratos que favorecen el oscurecimiento químico, permite mantener una alta calidad al producto final. Es notoria la alta conservación de las características nutricionales propias de la fruta.

La fruta obtenida conserva en alto grado sus características de color, sabor y aroma. Además, si se deja deshidratar suficiente tiempo es estable a temperatura ambiente, lo que la hace atractiva a varias industrias. La relativa baja actividad de agua del jarabe concentrado, no permite el fácil desarrollo de microorganismos que rápidamente atacan y dañan las frutas en condiciones ambientales.

Esta técnica presenta interesantes ventajas económicas, teniendo en cuenta la baja inversión inicial en equipos, cuando se trata de volúmenes pequeños a nivel planta piloto, donde solamente se requieren recipientes plásticos medianos, mano de obra no calificada, sin consumo de energía eléctrica y además los jarabes que se producen, pueden ser utilizados en la elaboración de yogures, néctares, etc., a fin de aprovechar su poder edulcorante y contenido de aromas y sabores de la fruta osmodeshidratada.

Por otra parte el uso de azúcar (sacarosa) o jarabes y melazas tan disponibles en nuestro medio rural, con la posibilidad de su reutilización bien sea en nuevos procesos o para edulcorar otros productos la hace una técnica interesante. Entre las limitaciones que presenta esta técnica de osmodeshidratación está que no a todas las frutas puede aplicarse. Por ahora solo se emplean las frutas que presentan estructura sólida y pueden cortarse en trozos. Tampoco se recomiendan las frutas que poseen alto número de semillas de tamaño mediano

como la mora o guayaba. Algunas frutas pueden perder su poca acidez como el mango o la piña, aunque se puede corregir este inconveniente ajustando la acidez del jarabe a fin de que la relación de sabor ácido-dulce sea agradable al gusto.

2.3 Bagazo de Caña

Los residuos de la industria azucarera, y potencialmente cualquier residuo agroindustrial, son sustratos más económicos, pero más complejos que la glucosa y sacarosa, y pueden ser convertidos en productos útiles mediante procesos de fermentación. Por su abundancia y capacidad de renovación sustentable, las materias primas más viables para la producción de biocombustibles y plásticos resultan ser los azúcares presentes en los residuos agroindustriales (la lignocelulosa o biomasa), siendo su bajo o nulo costo otro factor que favorece su uso (Ingram y cols., 1998).

Desde el punto de vista económico, se requiere que el residuo agroindustrial se encuentre concentrado en ciertas localidades, y cuyo transporte sea mínimo. El sustrato que cumple este requisito en nuestro país es el bagazo de caña de azúcar (BCA, Martínez y cols., 2000). Este se encuentra concentrado en los ingenios de los estados, Nayarit, Veracruz, Jalisco y Morelos, entre otros.

El bagazo es el residuo fibroso de la caña, que se obtiene después de extraer el jugo y su uso tradicional ha sido como combustible en la misma industria. En muchos países se quema por completo, debido a que lo sustituyen por petróleo. Los expertos estiman factible obtener hasta 30% de bagazo sobrante sin tener necesidad de quemar petróleo, si se mejora la eficiencia térmica de los ingenios (Pandey y cols., 1995).

La fibra se utiliza para la producción de pulpa, papel y tableros; mientras que la médula, presente también en el bagazo se utiliza para la alimentación de ganado, como combustible, o como materia prima para la producción de furfural (Rosales y Sanroman, 2005)

En promedio en BCA mexicano contiene **42% de celulosa y 28% de hemicelulosa**. Esta última está compuesta de polímeros de xilosa, ácido urónico, radicales acetilo, arabinosa y manosa. Un análisis promedio del bagazo da los siguientes valores: **fibra 48.7 % , humedad 49%, sólidos solubles 2.3%** (Pandey y Soccol, 2000).

Técnica y económicamente es recomendable llevar a cabo una hidrólisis química de la fracción hemicelulósica, generando jarabes que contienen xilosa, arabinosa y glucosa, en una relación 80, 5 y 15% respectivamente (Martínez y cols., 2000), y una hidrólisis enzimática de la fracción celulósica (Dien y cols., 2003), para generar glucosa y celobiosa.

Sin embargo, los procesos que implican el bagazo de caña para la producción de etanol realmente requieren de una cantidad sustancial. Esto afectaría el suministro de combustible para los molinos de azúcar y se haría lo necesario para encontrar un combustible alternativo, que hasta ahora en gran parte ha sido fracasado (principalmente debido a motivos económicos). Además, la producción de etanol del bagazo de caña necesita hidrólisis, que requiere una gran cantidad de enzimas celulasas para sacarificación (Rosales y Sanroman, 2005)

2.3 Fermentación en Estado Sólido

La fermentación en estado sólido (FES) es definida como el cultivo de microorganismos sobre sustrato sólidos en ausencia o casi ausencia de agua libre (Moo-Young y cols., 1983; Sanzo y cols., 2001; Raghavarao y cols., 2003; Kashyap y cols., 2003). Debido al bajo contenido de líquidos, en la FES se requieren fermentadores relativamente pequeños sin que se sacrifique el rendimiento del producto, además la baja actividad de agua reduce las contaminaciones pues solo algunas bacterias son capaces de crecer en estas condiciones. Por otro lado, la FES es lenta y presenta problemas para la transferencia de calor y masa. (Raghavarao y cols., 2003).

En los procesos fermentativos de este tipo, la cantidad del agua no debería exceder la capacidad de saturación de la cama sólida en la cual los microorganismos crecen (Laukevics y cols., 1984). El agua es esencial para el crecimiento microbiano y en la FES está presente en capas finas y en ocasiones, dentro de los sustratos (Mudgett, 1986). El agua libre no parece ser el entorno natural para la mayoría de microorganismos. Los productos fúngicos de interés biotecnológico, por ejemplo enzimas, metabolitos secundarios y esporas, presentan mayores ventajas respecto a la fermentación sumergida cuando se utilizan o crecen en sustratos húmedos sólidos.

En este proceso, el sustrato sólido no sólo suministra las sustancias nutritivas a la especie de microorganismo, sino también, sirve como un anclaje para las células microbianas (Nair y cols., 2004).

La fermentación de estado sólido ha surgido como una tecnología potencial para la producción de productos microbianos como en alimentos, combustibles, sustancias químicas de alimentos, industriales y productos farmacéuticos y otras aplicaciones en bioprocesos como la lixiviación, bioremediación, biogeneración, biotransformación, biocontrol, desintoxicación, etc. (Chundakkadu, 2005).

La FES es un sistema útil para la producción de enzimas de interés en el campo de la biotecnología (Nigam y Singh, 1994), tales como amilasas (Murado y cols., 1997; Mulimani y Ramalingam, 2000; Rahardjo y cols., 2005), celulasas, xilanasas, proteasas, fitasas, lipasas, etc., en ácidos tales como ácido cítrico, láctico; en metabolitos secundarios, el ácido giberílico, alcaloides y en antibióticos, como la penicilina, ciclosporin, cepamicina y tetraciclinas (Chundakkadu, 2005; Pandey y cols., 1999a; Sodhi y cols., 2005).

La FES ha provocado varias investigaciones en décadas pasadas debido a su posibilidad de usar los desechos o esquilmos producidos en el tratamiento de frutas y semillas, haciendo los procesos mucho más eficientes tanto del punto de vista económico como de ambiental.

Los residuos agroindustriales generalmente son considerados como el mejor sustrato de producción de enzimas para los procesos de FES (Ellaiah y cols., 2002). Los sustratos tradicionalmente usados en FES incluyen el arroz, el trigo, el mijo, la cebada, el grano y el frijol de soja, cáscara de manzana, cáscara de uva, cáscara de piña, cáscara de plátano, cáscara de kiwi (Sodhi y cols., 2005; Hesseltine, 1977). El costo y la disponibilidad son consideraciones importantes y por lo tanto la selección de un sustrato sólido apropiado juega un papel importante en el desarrollo de procesos de FES eficientes (Pandey y Selvakumar, 1999).

2.3.1 Ventajas:

Castilho y cols. (2000), Aguilar y cols. (2001) y Holker y cols. (2004), han descrito las ventajas más importantes sobre la FES y su utilización en la producción de enzimas, tales características son las siguientes:

1. El producto presenta alta concentración, lo que facilita su purificación
2. Baja cantidad de efluentes líquidos.
3. El inóculo usado es la flora natural de los sustratos
4. La cantidad de esquilmos generada es más pequeña que el FMS
5. Una elevada productividad de enzimas.
6. Mejor oxigenación.
7. Mayor estabilidad del producto.
8. Bajos costos operativos y de capital de inversión.
9. Disminución de volúmenes de operación.
10. Equipos y medios de cultivo sencillos.
11. Procesos de recuperación más fáciles.
12. La posibilidad de utilizar directamente los sólidos fermentados como alimentos.
13. Su operación requiere de tecnologías sencillas y económicas.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAHÍA DE CARRACAS



SISTEMA DE BIBLIOTECAS

14. Los subproductos agroindustriales sólidos pueden ser utilizados como medios de cultivo para la obtención de productos (enzimas) de alto valor agregado.

2.3.2 Desventajas:

1. Los microorganismos usados son limitados aquellos que cultivan en los niveles reducidos de humedad.
2. La falta de dispositivos para determinar parámetros como la humedad, el pH, oxígeno y dióxido de carbono, constituyen un problema debido a la naturaleza heterogénea de este tipo de fermentación.

2.4 Comparación entre la Fermentación en Estado sólido y Fermentación Sumergida.

En el mundo occidental, la FES ha sido menos estudiada que la Fermentación en Estado Sumergido (FS). Las diferencias más importantes entre estos sistemas son el contenido relativamente bajo de humedad en el medio, la formación de los gradientes de temperatura, sustancias nutritivas, así como sus productos como esporulación, enzimas, metabolitos secundarios (Mejía y cols., 1998), el ácido cítrico (Favela y cols., 1998) y los compuestos aromáticos (Shary-Bagnon y cols., 2000).

La FES, como se ha relatado, presenta más ventajas que la fermentación sumergida (FS), esto se traduce en una producción más barata de enzima que tiene mejor propiedades fisicoquímicas que las producidas por FS (Sanzo y cols., 2001). Estudios han demostrado que las enzimas producidas por FES son más estables en amplias gamas de temperatura y pH, en comparación con la FS. Esto ha sido evidenciado para enzimas como la amilasa (Ramesh y Lonsane, 1991), pectinasa (Solis y cols., 1993); Maldonado y Strasser of Saad, 1998), tanasas (Lekha y Lonsane, 1994) y proteasas (George y cols., 1997)

La FES tiene ventajas potenciales sobre la fermentación sumergida en lo que concierne a la simplicidad en la operación, la alta productividad de fermentación, menos favorable para el crecimiento de contaminantes y la formación de producto concentrada (Ashokkumar y cols., 2001).

La producción de pectinasas por hongos del género *Aspergillus* ha sido más alta en FES que en fermentación sumergida (Solis y cols., 1996). Acuña y col. (1995) reportaron que *A. niger* produce diferentes respuestas fisiológicas dependiendo del tipo de fermentación usada, y que hay ventajas en la producción de pectinasas usando FES en comparación con la fermentación sumergida.

Entre las ventajas para procesos de FES a menudo es citado que los niveles de producción de enzima son más altos que en FS, comparando las condiciones de fermentación y el medio de fermentación. Sin embargo, hay una escasez en cuanto a estudios fisiológicos que comparan FES y FS tratando de explicar por qué los microorganismos producen niveles de enzima más altos en la primera clase de proceso comparado con el segundo.

Esta carencia de información hace difícil cualquier evaluación en cuanto al valor de un proceso contra el otro, así como, el dificultar el acercamiento fundamental de tratar la optimización y el diseño para la técnica FES en áreas como la mejora de tensión, la ingeniería de sustrato sólido y el control de procedimiento. Algunos ejemplos conocidos son las amilasas (Raimbault y Alazard, 1980; Soccol y cols., 1993; Raimbault, 1998; Soccol y cols., 1994), Glucoamilasas (Soccol y cols., 1993; Soccol y cols., 1994), celulasas [Raimbault, 1998; Soccol y cols., 1994], pectinasas (Favela y cols., 1989; Solis y cols., 1993; Díaz y cols., 2001), cafeinasas, lipasas (Falony y cols., 2006; Palma y cols., 2000) y la producción de proteasas (Villegas y cols., 1993; George y cols., 1997).

2.5 Inducción de pectinasas en hongos

Como ya se mencionó anteriormente, la fuente principal para la producción de enzimas pectolíticas son hongos del género *Aspergillus* (Voragen y Pilnik, 1988). Este microorganismo, como otros, produce diferentes enzimas pécticas en

respuesta a las condiciones de cultivo, obteniéndose al final de la fermentación un cultivo que contiene una mezcla compleja de enzimas que degradan tanto pectina como otros polisacáridos de la pared celular.

Los mecanismos moleculares que controlan la síntesis de las pectinasas microbianas son aún poco conocidos. El sistema genético mejor estudiado es el de la bacteria *Erwinia carotovora*. En este caso, los genes involucrados en el catabolismo de la pectina y la producción de pectinasas son inducidos por intermediarios del catabolismo del ácido galacturónico (ejemplo, 2-ceto-3-deoxi-gluconato), mientras que el control negativo de la expresión lo ejerce un complejo sistema de represión que involucra proteínas regulatorias, AMPc, etc.

La síntesis de las pectinasas es influenciada además por factores ambientales tales como la osmolaridad del medio, temperatura, disponibilidad de nitrógeno u oxígeno, limitación de hierro y la presencia de agentes que dañan el ADN (Hugouvieux y col, 1996).

En hongos filamentosos la tendencia general observada en varias especies de *Aspergillus* (*A. niger*, *A. tubigiensis*, *A. flavus*, *A. aculeatus*, etc.) y en fitopatógenos, es que la síntesis de las enzimas pectolíticas como poligalacturonasas, pectinmetilesterasas o pectiniliasas, es inducida por pectina, ácido poligalacturónico y ácido galacturónico y reprimida por glucosa (de Vries y col, 1999).

En algunos casos la inducción es promovida por azúcares como α -L-ramnosa y α -L-arabinosa (Hugouvieux y col, 1996). En forma similar a lo descrito en otros sistemas genéticos, se ha demostrado la intervención de proteínas CreA e incluso AMPc en los fenómenos de represión de las pectinasas (Ruijter y Visser, 1997).

Los factores ambientales también modulan la síntesis de las enzimas fúngicas y es interesante mencionar que la expresión de ciertos genes, que codifican pectinasas u otras enzimas hidrolíticas, está controlada por el pH del medio (Cavallito y col, 1996; Wubben y col, 2000).

La mayor parte de los estudios de inducción/represión de pectinasas en hongos se refieren a las enzimas que actúan sobre el homogalacturonano y a las denominadas enzimas accesorias. Se conoce poco de la regulación de la síntesis de enzimas que degradan el ramnogalacturonano y otros polímeros como ramnogalacturonano tipo II y xilogalacturonano.

2.6 Trabajos realizados

A nivel industrial, la producción de enzima es un campo creciente de biotecnología (Viniestra y cols., 2003). La mayor parte de los fabricantes de enzimas las producen por fermentación sumergida (FMS) o Fermentación líquida (FML) (Aguilar y cols., 2003).

Se sabe que la síntesis de pectinasas, en hongos, es inducida o estimulada por la presencia de pectina (Solis y cols., 1996), por lo que, los medios de cultivo utilizados para la producción de pectinasas son adicionados con subproductos que contengan residuos de pectina, como remolacha, fibra de yuca (Budiatman y Lonsane, 1987), bagazo de manzana (Rombouts y Pilnik, 1980; Ghildyal y cols., 1981; Hours y cols., 1988a; Hours y cols., 1988b), cáscaras de cítricos (Maldonado y Strasser of Saad, 1998; Couri y Farias, 1995; Maldonado y cols., 1986; Siessere y Said, 1989), pulpa de café (Maldonado y Strasser of Saad, 1998), salvado de trigo (Rao Narsimha, 1996; Acuña y cols., 1995), salvado de Arroz, bagazo de caña (Pereira y cols., 1993; Garzón y Hours, 1992; Acuña y cols., 1994; Huerta y cols., 1994), cáscara de naranja (Siessere y Said, 1989), cáscara de granos (Berovic y Ostroversnik, 1997) entre otros.

El efecto de diferentes fuentes de carbono sobre la síntesis de pectinasas por hongos en la fermentación en estado sólido ya ha sido estudiado, y generalmente se han utilizado desechos agroindustriales que contengan sustancias

pécticas como indicadores (Fonseca y Said, 1994; Galiotou-Panayotou y cols., 1993; Hang y Woodanms, 1994; Naidu y Pandey, 1998; Solis y cols., 1993).

Kapoor y Kuhad (2002), descubrieron que al utilizar agroresiduos complementados con fuentes de nitrógeno el nivel de producción de pectinasas se favorece en la FES que es la FS.

Recientemente se han publicado reportes en donde se emplea procesos de fermentación sólida para la producción de diferentes hidrolasas extracelulares por *Rhizopus sp.*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* y levaduras como *Yarrowia lipolytica* (Dominguez y cols., 2003; Hag y cols., 2002).

Patil y Dayany (2006) evaluaron los agro desechos ricos en pectina, la cáscara de limón, tallo de sorgo, y cascarilla de girasol, utilizándolos como sustratos en la producción de pectinasa por *Aspergillus niger* DMF 27 y *Aspergillus niger* DMF 45, en sistemas FES y FMS, respectivamente.

El bagazo de caña ha sido utilizado como fuente de carbono, como lo de acuerdo al reporte de investigación de Oojkaas y cols. (2000), sin embargo, en este trabajo no se observó crecimiento de *P. veridicatum*, indicando que el microorganismo no fue capaz de hidrolizar la celulosa o hemicelulosa. El nivel bajo de producción confirmó que el hongo no fue capaz producir celulasas y xilanasas. Por lo tanto se concluye que el empleo de bagazo de caña es conveniente para utilizarlo como soporte para el crecimiento de hongos filamentosos. Estos resultados confirmaron la investigación de Oriol y cols. (1988), en donde no encontraron producción de celulasas y xilanasas, utilizando *Aspergillus niger*. Y bagazo de caña como fuente de carbono.

La mezcla de bagazo de naranja y el salvado de trigo mostró ser el mejor medio para la producción de pectinasas, con 55.2 U y 3540 U de poligalacturonasas y pectinliasas por gramo de sustrato, respectivamente (Naidu y Pandey, 1998).

Las mezclas de esquilmos ricos en azúcares, como el plátano (13.2 %) y mango (19.5 %), utilizando el bagazo de caña como soporte, aumentan la producción de poligalacturonasas y pectiniliasa, en comparación cuando no se utiliza soporte. Por otra parte el tamaño de partícula utilizada afectó el cambio de calor y la oxigenación, siendo el bagazo de caña quien aumentó el espacio entre las partículas, incrementando la aeración y la difusión de la sustancia nutritiva con el microorganismo (Mitchell y cols., 1991; Mitchell y cols., 2000).

Otros informes indican que la FES es más productiva en cuanto a la estabilidad de las pectinasas que la FMS, teniendo una estabilidad más alta al pH y la temperatura (Acuna-Arguelles y cols., 1995; Kapoor y Kuhad, 2002; Diaz-Godfnez y cols., 2001; Joshi y cols., 2006).

Xia y cols. (2009) en un experimento de fermentación revelaron que el *Aspergillus niger*, produjo protopectinasa a las 36 horas, bajo las siguientes condiciones de fermentación temperatura de 35°C, pH de 5, y se utilizó como fuente de nitrógeno urea. La producción de pectina en este cultivo bajo condiciones óptimas llegó a un 24.5 %, que es comparable con la producción de otros métodos físicos y químicos hasta ahora descritos.

Acuña y cols., (1995), Maldonado y Strasser of Saad (1998) reportaron que la producción poligalacturonasa por *Aspergillus niger*, fué seis veces mayor en la fermentación de estado sólido que en la fermentación sumergida.

Actualmente con los avances en la comprensión de los aspectos fisiológicos de los microorganismo y de la tecnología se han podido mejorar los procesos fermentativos en la fermentación de estado sólido a través de modelado matemático y control de estos biorreactores (Pandey, 2003).

Recientemente, se han estudiado nuevas enzimas, la ramnogalacturonasa y la xilogalacturonasa (Schols y Voragen, 1996), las características, propiedades y producción son descritas por Contreras y cols., (1997) y Aguilar y cols., (2002).

También se han estudiado las homogalacturonos y ramnogalacturonos (Schols y Voragen, 1996), junto con las Pectinesterasas, poligalacturonasas y

pectinolasas, en fermentación en estado sólido (Rolin y cols., 1998; Contreras y cols., 1997).

2.7 Enzimas

El empleo de enzimas en la industria de alimentos está basado en tres aspectos básicos (Baduí, 1996):

1. El control de calidad de ciertos productos de alimentación. Es importante considerar que para evaluar la calidad de los productos alimentarios, algunos métodos analíticos están basados en reacciones enzimáticas, tal es el caso del análisis del contenido de azúcares solubles (utilizando biosensores enzimáticos). Debido a que la presencia o ausencia de algunas actividades enzimáticas tienen un gran impacto en la calidad del producto final. La producción enzimática en una fermentación es inducida por varios factores (nutricionales, pH, temperatura, etc.) y es de esperarse que un determinado momento se produzca la máxima actividad enzimática; sin embargo, esta producción disminuye rápidamente debido al estrés inducido al microorganismo. Por lo tanto es de suma importancia recuperar la enzima antes de que se presente el decremento de la actividad enzimática. Es evidente que conocer el momento en que se tiene la máxima productividad enzimática es de suma importancia para recuperar la mayor cantidad de enzimas. Las reacciones enzimáticas por lo general liberan un producto, que entonces es relacionado con la concentración de sustrato inicial proporcionado por la muestra analizada.
2. La modificación de las propiedades de algunos aditivos alimenticios y de los productos de alimentación, se refiere al empleo de enzimas para modificar las propiedades fisicoquímicas y reológicas de los productos alimentarios, como amilasas, lipasas y pectinasas. Las enzimas usadas como biocatalizadores para la producción de algunos aminoácidos también pueden ser consideradas como un ejemplo de este aspecto particular (Garza y cols., 2000).

3. La producción de enzimas usadas como aditivos alimenticios.

Ejemplos de enzimas utilizadas en la industria alimentaria

1. Fosfatasa alcalina: para la evaluación de la eficacia del proceso de pasterización de leche.
2. Catalasa: para identificar el índice de contaminación microbiana
3. Pectinesterasas: su activación *in situ* permite obtener frutas y verduras con atributos sensoriales más atractivos para los consumidores (Chávez y cols., 1998; Aguilera y cols., 1999)
4. Peroxidasa y la lipoxigenasa son usados para evaluar la eficacia del proceso que palidece algunas verduras (Aguilar y cols., 1996).
5. La estererasas como índice de contaminación fúngica.
6. La N- acetildeshidrogenasa para la destrucción de huevos de *Salmonella* en la leche (Baduí, 1996).

2.8 Pectinas

Las pectinas son mezclas complejas de polisacáridos que pueden llegar a constituir un tercio del peso seco de la pared celular de las dicotiledóneas y algunas plantas monocotiledóneas (Jarvis, y cols., 1998). La pectina es una mezcla amplia de sustancias pécticas de diferente composición que contiene como componente principal ácido pectínico. Las mayores concentraciones de pectina se han encontrado en la lámina media, con una disminución gradual en su abundancia hacia la membrana plásmica (Darvill y cols., 1980). La pectina juega un papel fundamental en el procesamiento de los alimentos, como aditivo y como fuente de fibra dietética. Pertenece al grupo de los polisacáridos y se encuentra en la mayoría de los vegetales, especialmente en frutas como naranja, toronja y limón. Las pectinas tienen función lubricante y cementante en la pared celular de las plantas superiores. También están involucradas en la textura y la maduración de los frutos, en el crecimiento de los vegetales y en la interacción entre las

plantas huésped y sus patógenos. Es un coloide que tiene la propiedad de ligar una significativa cantidad de agua.

La pectina encuentra un amplio uso en la fabricación de muchos productos a base de frutas como son mermeladas, jaleas, ates entre otras conservas (Giridhari y cols., 1998; Lang y Domenburg, 2000).

2.8.1 Composición y estructura

El componente más abundante de las pectinas es el ácido galacturónico, que forma el esqueleto principal de la molécula consistente en una cadena de residuos de la ácido D-galacturónico unidos mediante enlaces alfa (1→4), (Fig. 1). Estos residuos pueden estar parcialmente metilados, esterificados en el C-6 con alcohol metílico, siendo el grado de metilación variable según el origen de la pectina.

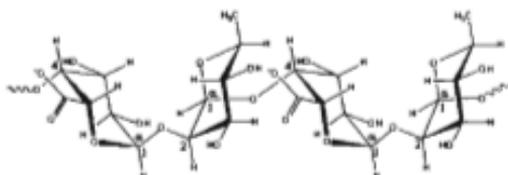


Fig. 1 Estructura de molécula de Pectina.

La pectina también contiene con frecuencia residuos de ramnosa, arabinosa y galactosa. Generalmente la ramnosa forma parte de la cadena principal, mientras que la arabinosa y la galactosa se encuentran en las cadenas laterales unidas a la cadena principal formando ramificaciones (Heredia y cols., 1995).

Las pectinas solubles en agentes quelantes tienen una composición similar pero pueden presentar un 2% de ramnosa, principalmente sustituyendo al ácido galacturónico en la cadena principal, y del 10 al 20 % de otros azúcares en forma de cadenas laterales. Las pectinas contienen dos regiones definidas (Pérez y cols., 2000). La región lisa o homogalacturonano consiste en un esqueleto de

protopectina es insoluble en agua, mientras las otras tres sustancias son totalmente o parcialmente solubles en agua (Serra y cols., 1992). La protopectina es una matriz de sustancia péctica que por hidrólisis da lugar a la pectina o al ácido pectínico. Protopectina es el término utilizado para describir las sustancias pécticas insolubles en agua encontradas en los tejidos vegetales y de las cuales se forman las sustancias pécticas solubles (Kilara, 1982).

Los ácidos pécticos son galacturonanos que no contienen grupos metilos. También pueden denominarse ácido poligalacturónico. A las sales de los ácidos pécticos se les **pectatos** o **poligalacturonatos**. Los **ácidos pectínicos** son galacturonanos con cantidades variables de grupos metilos esterificados con los grupos carboxilos del C-6. A las sales de los ácidos pectínicos, se les llama pectinatos. Estas sustancias tienen la propiedad de formar geles con azúcares, con ácidos y, si el contenido de metilos es bajo, con otros componentes como sales de calcio (Kashyap y cols., 2001).

2.8.2 Clasificación:

La pectinas también se pueden clasificar según el proceso de extracción de la pared celular en tres tipos: pectinas solubles en agua, extraíbles con agua o soluciones salinas; pectinas solubles en quelantes, extraíbles mediante soluciones de agentes quelantes de calcio, el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), CDTA (ácido ciclohexanodiaminotetraacético) o hexametáfosfato; y protopectinas, extraíbles con soluciones alcalinas o ácidos diluidos calientes (Van Buren, 1991).

La dificultad de la extracción de la protopectina puede ser debida a los puentes ácidos o básicos que anclan la protopectina en la matriz de la pared. Una parte de las cadenas de protopectina están embebidas en la pared primaria y secundaria, el resto se encuentra en la lámina media. La pectina soluble en agua y la pectina soluble en quelantes derivan de la lámina media (Van Buren, 1991).

Las pectinas solubles en agua están formadas básicamente por homogalacturonano. El ácido galacturónico está esterificado con alcohol metílico

siendo el grado de metilación variable según el origen de la pectina (Brown y cols., 2001).

2.8.2.1 Grado de Metilación

Dependiendo del origen de la pectina y del modo de extracción los grupos carboxilos de los residuos de ácido galacturónico presentan un grado variable de esterificación por metanol y pueden estar parcialmente o completamente neutralizados por iones de sodio, potasio o amonio. En ciertas pectinas, adicionalmente, los grupos hidroxilos están parcialmente acetilados (Turquois y cols., 1999; Kashyap y cols., 2001).

Un factor importante que caracteriza las cadenas de pectina es el grado de metilación (DE) que se define como el número de moles de metanol por 100 moles de ácido galacturónico. Según este criterio, las pectinas han sido clasificadas en dos grupos: las que presentan más de un 50% de metilación, pectinas altamente metiladas (HM); y las que contienen menos del 50% de metilación, pectinas de baja metilación (LM). La principal fuente de las pectinas de alta metilación es la cáscara de los cítricos y la manzana. La reducción del grado de metilación tiene como consecuencia un aumento de la cohesión ya que la formación de grupos carboxilos libres aumenta la posibilidad de enlaces entre polímeros (Van Buren, 1991).

Las pectinas tienen la capacidad de formar geles en determinadas condiciones, cambios físicos o químicos que disminuyen la solubilidad de las moléculas de pectina. El mecanismo de gelificación y las propiedades de los geles dependen entre otros factores de la temperatura, pH y el grado de metilación. Las pectinas de elevada metilación forman geles en medio de ácidos y en presencia de sacarosa, mientras que las pectinas de baja metilación forman geles en presencia de elementos alcalinos y de calcio (Turquois y cols., 1999).

2.8.2.2 Enlaces de calcio

La capacidad del calcio para formar complejos insolubles con pectinas se debe a la unión de dicho ion con los grupos carboxilos libres de cadenas distintas

del polímero, formando como consecuencia un red tridimensional (BeMiller, 1986). Los enlaces de calcio implican otros grupos funcionales aparte de los grupos carboxilo. En este sentido, la interacción fuerte entre el calcio con los átomos de oxígeno de los grupos hidroxilo de la pectina han sido descrito por Rees y cols. (1982).

Los enlaces cruzados de calcio son más estables en presencia de otros enlaces cruzados vecinos cooperativos. La máxima estabilidad se alcanza cuyo están presentes de 7 a 14 enlaces cruzados consecutivos. El calcio no coagula las pectinas con grado de esterificación mayor del 60% y las concentraciones necesarias para coagular con bajo grado de metilación aumenta a medida que el peso molecular disminuye (Van Buren, 1991). La formación de geles puede resultar también de la interacción entre las cadenas poliméricas a través de puentes de hidrogeno y/o interacciones hidrofóbicas, formando como resultado una red tridimensional (BeMiller, 1986).

2.8.3 Aplicación de las pectinas

Tradicionalmente las pectinas se utilizan en la industria alimentaria como agentes gelificantes y espesantes. Suelen ser componentes habituales de productos alimentarios como mermeladas, jaleas, productos lácteos y también en productos cosméticos como geles y pastas. Actualmente las pectinas también se utilizan como fibras nutricionales y para la producción de proteína unicelular (Kravtchenko y cols., 1992, Thakur y cols., 1997; Alkorta y cols., 1998). Recientemente, se ha incrementado su utilización tanto como fuente de energía, así como de materia prima para procesos industriales (Pérez y cols., 2000).

Las pectinas se utilizan también en el sector farmacéutico como agentes detoxificantes, siendo conocidas por sus efectos antidiarreícos. La pectina en forma de carbohidrato coloidal actúa como lubricante en los intestinos al recubrir la mucosa con polisacáridos y promover el peristaltismo sin causar irritación, siendo adecuada como aditivo en la comida para bebés.

La pectina reduce la toxicidad de algunos fármacos y prolonga su actividad sin disminuir los efectos terapéuticos. Los microglóbulos de pectina gelatinizada

pueden también utilizarse en quimioterapia de cánceres localizados como sistema de liberación intravascular de fármacos (Hoondal y cols., 2002).

2.9 Pectinasas

Las pectinas son degradadas por enzimas pectinolíticas, pectinasas, los cuales presentan gran diversidad, debida en parte a la compleja naturaleza del sustrato degradado. Las plantas y los microorganismos son los principales productores de estas enzimas (Naidu y Pandey, 1998; Najafpour y cols., 2007). Las pectinasas se clasifican en tres tipos principales: Enzimas desesterificantes (pectinesterasas), enzimas despolimerizantes (hidrolasas y liasas) y protopectinas (Fig. 3), (Kashyap y cols., 2001).

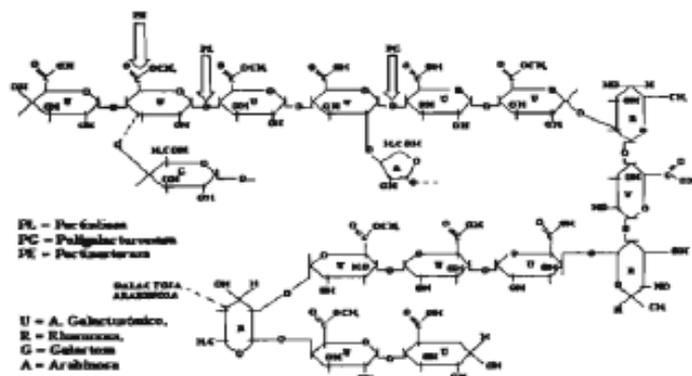


Fig. 3. Estructura molecular de la pectina, mostrando la clasificación de las pectinasas.

2.9.1 Clasificación

2.9.1.1 Pectinesterasas

Las Pectinesterasas (pectina pectilhidrolasa), también conocidas como pectina metil esterases, catalizan la desesterificación de los grupos metilo de la pectina dando lugar a ácido poligalacturónico o pectato (Kashyap y cols., 2001). Su actividad se puede determinar midiendo la liberación de metanol. Son sintetizadas por hongos, bacterias, levaduras y plantas superiores (Alkorta y cols.,

1998). Las pectinesterasas de levaduras son activas a un pH entre 3 y 5, y en bacterias entre 7 y 8. Estas enzimas se inactivan por calentamiento a 80°C (Gerhartz, 1990).

2.9.1.2 Hidrolasas y liasas

Las enzimas despolimerizantes o despolimerasas se clasifican atendiendo tres aspectos, que se refieren al modo de ataque al esqueleto de ácido poligalacturónico. Estos aspectos se basan en los siguientes criterios: a) el mecanismo químico de ruptura de los enlaces: hidrólisis o transeeliminación; b) la naturaleza del sustrato preferido: pectina o ácido poligalacturónico; c) el modo de corte del polímero: endo o exo (Kashyap y cols., 2001). Las enzimas despolimerizantes pueden romper los enlaces alfa (1→4) glucosídicos entre los monómeros de ácido galacturónico de las pectinas por hidrólisis (hidrolasas) o por transeeliminación (liasas).

Las hidrolasas rompen los enlaces (figura 4) entre los monómeros de ácido galacturónico por adición de agua. Son activas a pH ácido y pueden ser inhibidas por el ion calcio (Guevara y cols., 1997).

Se pueden dividir en dos grupos principales atendiendo al sustrato que hidrolizan:

a) las poligalacturonasas o pectato hidrolasas degradan la pectina desmetilada, es decir, el ácido poligalacturónico o pectato. Pueden tener modo de acción endo u exo. Las endopoligalacturonasas están ampliamente distribuidas y son producidas por una gran variedad de organismo como bacterias, hongos, levaduras plantas superiores y nematodos parásitos de plantas (Sakai y cols., 1993). Las exopoligalacturonasas son producidas por hongos, algunas bacterias y plantas superiores (Sawada y cols., 2001). Generalmente las exopoligalacturonasas de hongos y plantas liberan ácido galacturónico, mientras que las bacterianas liberan ácido digalacturónico (Sakai y cols., 1993).

b) Las polimetilgalacturonasas o pectina hidrolasas degradan el polímero metilado, la pectina. Aunque hay artículos que describen este tipo de actividad catalítica, la existencia de estas enzimas parece ser cuestionada ya que es posible

que preparaciones de poligalacturonasas contaminadas con pectinesterasas, hayan sido consideradas por error como preparaciones polimetilgalacturonasas (Alkorta y cols., 1998). Sin embargo, recientemente se han descrito algunas poligalacturonasas que degradan las zonas no esterificadas de la pectina, hecho que apuntaría a la existencia de auténticas pectinas hidrolasas (Daas y cols., 1999). Las liasas, también llamadas transeliminasas, rompen los enlaces glucosídicos por beta-eliminación. Según el sustrato sobre el que actúan sea pectina o ácido poligalacturónico se clasifican en polimetilgalacturonato liasas o poligalacturonato liasas, respectivamente. Las polimetilgalacturonato liasas o pectina liasas fueron descubiertas por Albersheim en 1960 (Kozianowski y cols., 1997). Todas las descritas hasta la fecha actúan de forma endo y son sintetizadas mayoritariamente por hongos. Las poligalacturonato liasas o pectato liasas están ampliamente distribuidas entre los microorganismos patógenos de plantas y son el objeto de diferentes estudios (Hugouvieux-Cotte-Pattat y cols., 1996). Estas enzimas actúan a pH alcalino, entre 8 y 10, pueden tener modo de acción endo u exo, y requieren iones calcio para la actividad enzimática (Sakai y cols., 1993).

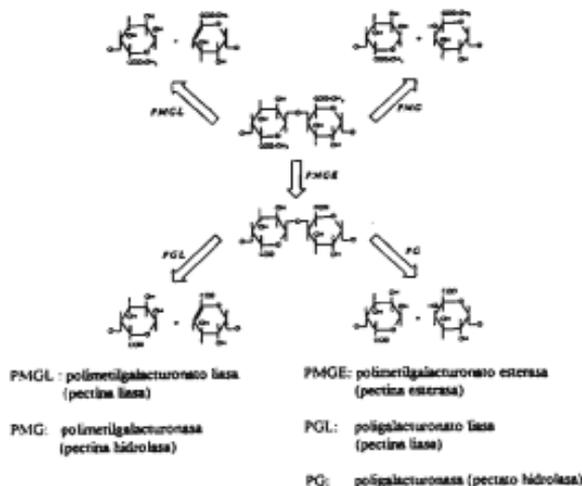


Fig. 4. Hidrólisis del monómero del ácido galacturónico

2.9.1.3 Protopectinasas

Las protopectinasas son enzimas que solubilizan la protopectina. Se clasifican en dos tipos. El tipo A degrada el ácido poligalacturónico de la protopectina mientras que el tipo B degrada las cadenas de polisacáridos que conectan el ácido poligalacturónico con otros constituyentes de la pared celular. (Sakai y cols., 1993). En este tipo de enzimas se incluirían las hidrolasa y liasas que degradan el ramnogalacturonano (De Vries y Visser, 2001).

2.9.2 Aplicaciones de las pectinasas

Las pectinasas figuran entre las enzimas de aplicación industrial más antiguas. La primera aplicación comercial de estas enzimas data de 1930, cuyo Kertesz y Mehliz (Gerhartz, 1990) observaron que las pectinasas se podían utilizar en la fabricación de zumos de frutas, por lo tanto se ha incrementado su uso en la industria alimentaria de zumos. Las pectinasas constituyen actualmente un importante sector en el campo de enzimas industriales, donde en 1995 supusieron un volumen de ventas alrededor de los 75 millones de dólares (Kashyap y cols., 2001). Desde el punto de vista de su aplicación, las pectinasas pueden clasificarse principalmente en dos grandes tipos:

2.9.2.1 Pectinasas ácidas

Son las enzimas pécticas utilizadas en la industria de zumos de frutas y en la fabricación de vinos. Son mayoritariamente poligalacturonasas de origen fúngico, especialmente de *Aspergillus niger* (Dhillon y cols., 2004; Freitas y cols., 2006; Patil y Dayany, 2006).

Las principales aplicaciones de las pectinasas en el procesamiento de frutas y verduras son:

a) clarificación de jugos, que consiste en la separación del jugo de los fragmentos vegetales y partículas insolubles de cáscara y semillas en suspensión, rompiendo la pectina contenida en estas partículas, de modo que disminuye la viscosidad y la floculación de las micelas, mejorando su separación del jugo por sedimentación o filtración, siendo para el caso de jugos espumosos claros (manzana, uva) la

aplicación de las pectinasas produce una mejora en clarificación, mientras que el caso de jugos turbios (cítricos, tomates, néctares) la adición de pectinasas estabiliza la turbidez del jugo (Kashyap y cols., 2001). El agregado de una mezcla de poligalacturonasa (PGasa) y pectinmetilesterasa (PME) o pectinliasa (PeL) sola, produce la degradación de la capa externa de pectina, promoviendo la interacción electrostática de los complejos, su precipitación y la consiguiente clarificación del jugo. En algunos casos, la pérdida de turbidez del jugo es indeseable, como en los jugos cítricos destinados al consumo. Cuyo los frutos se exprimen, la PME endógena desmetoxila la pectina y promueve su interacción con el Ca+2 presente en el jugo, dando lugar a la precipitación del pectato de calcio y la consiguiente autoclarificación (Bonnin y col, 1997). A través de la acción combinada de pectinasas y celulasas se puede lograr la degradación completa de la pared celular dando lugar a la lisis y la consiguiente liberación del jugo celular. Este proceso conocido como *licuefacción* se aplica a la producción de jugos de frutas difíciles de filtrar como mango, piña, plátano o guayaba (Hoondal y cols., 2002).

b) extracción de jugos: la disminución en la viscosidad de las pulpas por el tratamiento con pectinasas aumenta simultáneamente el rendimiento en la extracción de jugo. Este hecho tiene especial relevancia en algunas frutas tales como bayas y manzanas, cuyas pulpas son con frecuencia viscosas y semisólidas tras el prensado, y de difícil extracción de su parte soluble. La adición de pectinasas, así como de mezclas enzimáticas que conjuntamente con hemicelulasas y celulasas, mejora la extracción del jugo, color, aroma y sabor, suplementando la acción de las enzimas endógenas de la fruta. De esta forma se reduce el tiempo necesario para la filtración y la clarificación del jugo, así como se aumenta el rendimiento en la extracción de éste (Cheetham, 1985).

c) Producción de concentrados: los jugos de fruta concentrados son importantes comercialmente debido a que tienen un periodo de conservación más largo y a que presentan costes de almacenamiento y transporte disminuidos. La

despolimerización de la pectina evita la gelificación de los jugos durante su concentración o almacenaje.

d) **Productos unicelulares:** los productos unicelulares son aquellos formados por maceración de sustancias vegetales, es decir, transformación de los tejidos vegetales en suspensiones de células intactas por hidrólisis selectiva de los polisacáridos de la lamina media (Kashyap y cols., 2001). Algunas de las frutas usadas para estos productos son las peras, duraznos, chabacano, papaya, maracuyá y guayaba. De igual modo, la maceración es empleada para obtener purés de vegetales como zanahorias, morrones u otros, con alto contenido de sólidos, pigmentos y vitaminas. Se originan productos que se pueden utilizar como base material de jugos de pulpa y néctares, como comidas de bebés, como ingredientes de productos lácteos tales como pudines y yogures, y para preparar protoplastos para aplicaciones biotecnológicas. Las enzimas preferentemente empleadas para la maceración de los tejidos vegetales, son las PGasas y PeL. En este proceso, la presencia de PME (tanto endógena como exógena) es indeseable pues la acción de esta enzima transformaría el proceso de maceración en un enzimado de pulpa (Pilnik y Voragen, 1993).

e) **Producción de vinos:** de modo similar a la aplicación de pectinasas en la producción de jugos, la utilización de estas enzimas reduce los costos y mejora el proceso de vinificación. La adición de pectinasas puede realizarse en la etapa de prensado de las uvas, facilitando dicho proceso y la extracción de mosto, o sobre el vino, para facilitar su clarificación. Este proceso puede realizarse por la adición combinada de pectinasas, hemicelulasas y proteinasas, como alternativa a la clarificación natural, que puede durar varios meses y requiere dióxido de azufre. Las pectinasas también pueden potenciar la liberación de antocianinas, de importancia en los vinos tintos.

2.9.2.2 Pectinasas Alcalinas

Desde hace unos años las pectinasas alcalinas se han introducido en diversidades procesos industriales, como el textil, principalmente en el enriado de lino y en las fibras de plantas. Las enzimas que se utilizan en estos sectores proceden mayoritariamente de bacterias (Hoondal y cols., 2002), destacando entre ellos las producidas por *Bacillus* (Kashyap y cols., 2001). Con el aumento del conocimiento de los mecanismos de degradación microbiana de la pectina, las pectinasas alcalinas se están abriendo camino en otros procesos biotecnológicos, como la purificación de virus de plantas (Salazar y Jayasinghe, 1999), y la fabricación de papel (Reid y Ricard, 2000; Viikari y cols., 2001), aunque en la mayoría de los mismos todavía no han sido comercializadas.

a) Industria textil: en el enriado de lino, este proceso consiste en la liberación de las fibras de celulosa a partir de los tejidos vegetales mediante la eliminación de las sustancias cementantes, como pectinas y hemicelulosas. Dicha eliminación se debe a la degradación selectiva de estos compuestos por la microflora autóctona de los campos o estanques en donde se realiza el proceso. El enriado es uno de los factores limitantes de la obtención de fibras de lino, por lo que está siendo objeto de numerosos estudios para mejorar su eficiencia y rendimiento (Henriksson y cols., 1997). El enriado húmedo consiste en sumergir la materia prima vegetal en tanques de agua templada, donde tiene lugar la degradación de la pectina por microflora anaeróbica, mientras que el enriado seco tiene lugar en el suelo. En estos procesos, sobre todo en el enriado seco, existe el riesgo de dañar las fibras por la actividad celulolítica de la flora microbiana. Una alternativa a estos procesos tradicionales es el enriado con agentes químicos, que origina unos buenos resultados aunque con elevado consumo de energía e impacto ambiental (Kashyap y cols., 2001). El enriado enzimático constituye una de las alternativas más prometedoras al proceso. Los estudios realizados hasta la fecha muestran que una de las enzimas claves para el enriado enzimático son las pectato liasas con acción endo (Bruhlmann y cols., 1994), aunque se desconoce cuáles son las características enzimáticas y las condiciones ambientales necesarias para obtener

una elevada eficiencia en el proceso. No obstante, existen en el mercado preparaciones de pectinasa comercializadas con este objeto (Flaxzyme, Novo, Nordisk). La evaluación de diferentes pectinasas está siendo estudiada actualmente por numerosos grupos de investigación para optimizar el enriado enzimático.

Procesos similares al enriado del lino se realizan con otras fibras textiles como cáñamo y yute. La liberación de las fibras de celulosa mediante la eliminación de gomas y otras sustancias cementantes "degumming" puede ser mejorada con el uso de pectinasas.

b) Decrudado de algodón. Es el proceso consistente en la eliminación de sustancias hidrófobas, ceras entre otras, de la superficie de las fibras para obtener buenas propiedades de humectabilidad que permitan el blanqueado y la tinción posterior de hilos y tejidos. Las pectinasas están siendo estudiadas en este campo para eliminar las pectinas que actúan como pegamento entre las sustancias que recubren las fibras y la celulosa.

c) Otras aplicaciones:

Las pectinasas se han utilizado en fermentación en estado sólido para sacarificación de esquilmos cítricos con el fin de producir bioetanol (Couto y Sanroman, 2006)

Tratamiento de aguas residuales pécticas. Un método alternativo para la depuración de las aguas residuales de la industria de productos cítricos es el uso de pectinasas bacterianas. El pretratamiento de estas aguas con pectinasas alcalinas y microorganismos pectinolíticos alcalófilos facilita la eliminación de las sustancias pécticas y la descomposición del agua residual por tratamiento con fangos activados (Horikoshi, 1999).

Producción de papel japonés. Las pectinasas alcalinas producidas por *Bacillus sp* y *Erwinia caratovor*a, debido a su fuerte actividad de maceración, se utilizan para el enriado de fibras de Mitsumata en la fabricación de papel japonés

(Horikoshi, 1999). Las sábanas de papel preparadas con esta pulpa son muy uniformes y suaves al tacto (Kashyap y cols., 2001).

Fabricación de papel. Los polisacáridos solubilizados a partir de la materia prima durante el proceso de fabricación del papel pueden interferir en dicho proceso. Entre estos polisacáridos puede estar presente el ácido poligalacturónico, que acompleja los polímeros catiónicos utilizados en las etapas finales de fabricación para retener las partículas finas. La degradación por pectinasas del ácido poligalacturónico a oligómeros, de menor capacidad de unión a los polímeros catiónicos, disminuye la demanda catiónica del proceso (Reid y Ricard, 2000).

Extracción de aceite: los aceites de semilla de canola, coco, girasol, palma, grano y olivas son tradicionalmente producidos por extracción con disolventes orgánicos. Las enzimas degradadoras de la pared celular, incluyendo las pectinasas pueden ser utilizadas en la extracción de aceite vegetal en un proceso acuoso por licuefacción de los componentes estructurales de la pared celular de las semillas oleaginosas (Kashyap y cols., 2001). Otra aplicación es el llamado *enzimado de pulpa* (pulp enzyming). En este caso, las pectinasas se adicionan a la masa prensada de frutas, generalmente las que contienen mucha pectina, por ejemplo: fresas, cerezas, grosellas, frambuesas e incluso manzanas y uvas. Las pectinasas degradan la pectina que causa la gelificación de la pulpa, facilitó el proceso de filtración. Este proceso se ha aplicado también para aumentar el rendimiento del prensado en la producción de aceite de oliva, palma y coco.

Fermentación del café y del té: las pectinasas juegan un papel importante en el procesamiento y producción del café y del té. En la fermentación del café se utilizan microorganismos pectinolíticos, para liberar la cubierta mucilaginoso del grano del café. El tratamiento enzimático también acelera la fermentación del té, aunque la dosis de enzima debe ser ajustada cuidadosamente para evitar daño en las hojas.

Aditivos para forrajes: a principios de los 80's comenzó una intensa investigación sobre la utilización de enzimas para aumentar la digestibilidad y el

poder nutritivo de piensos ricos en fibras vegetales para la alimentación de cerdos y aves. Los primeros éxitos comerciales se obtuvieron con la adición de beta-glucanasas a piensos basados en cebada, aunque las xilanasas fueron las enzimas que mostraron mayor eficiencia. Habitualmente, las preparaciones enzimáticas para el forraje son cocteles multienzimáticos que contienen conjuntamente con glucanasas y xilanasas, pectinasas, proteinasas y amilasas. La adición de enzimas libera nutrientes tanto por hidrólisis de las fibras no degradables como por liberación de nutrientes retenidos por estas fibras, incrementa su absorción y produce aumento de peso en los animales (Hoondal y cols., 2002).

Purificación de virus de plantas: en los casos de virus de plantas que están restringidos al floema, ciertas enzimas, como las pectinasas alcalinas y las celulasas pueden ser utilizadas para liberar los virus del tejido y proceder a su purificación (Salazar y Jayasinghe, 1999).

Capítulo 3. Metodología

El estudio se realizó en la Planta Piloto de Tecnologías Emergentes para el Procesamiento de Alimentos de Origen Vegetal, ubicada en la Unidad Académica de Agricultura de la Universidad Autónoma de Nayarit. Y en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C (CIATEJ AC), ubicado en Guadalajara, Jalisco.

3.1 Secado complementario con microondas sobre rebanadas predeshidratadas osmóticamente.

Se adquirió mango variedad Tommy Atkins, de la localidad de Xalisco, Nayarit. Se seleccionó y clasificó la fruta en forma manual en 3 estados de madurez (sazón, maduro y sobremaduro), seleccionando para el estudio, el estado de completa madurez, donde los atributos sensoriales característicos de la fruta son más acentuados. Se lavó y limpió la fruta. Posteriormente se rebanó manualmente en 3 diferentes geometrías de partícula: "Media Rebanada", "Tiras laterales" y "Gajos", como se muestra en Figura 1.

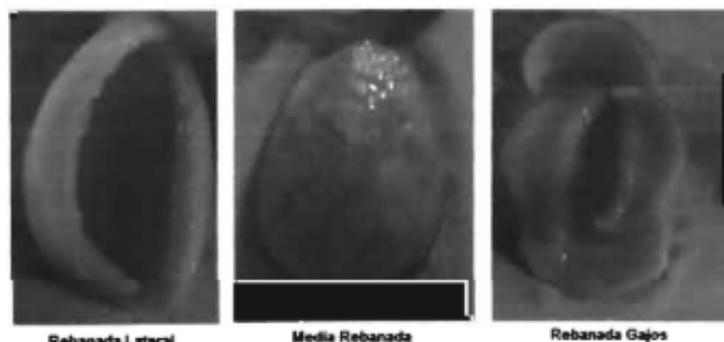


Figura 5. Imágenes de tres geometrías de rebanadas de mango predeshidratadas osmóticamente que se sometieron al secado complementario con microondas.

Las rebanadas de fruta se sometieron a un proceso de Deshidratación Osmótica bajo las siguientes condiciones: a) Se empleó un reactor osmótico con capacidad de 1,200 kg. Que consta de 40 módulos con capacidad para 30 kg cada uno. b) En cada módulo se agregó una relación de 1:5, que corresponde a 5 Kg de rebanadas de mango y 25 Kg de solución hipertónica elaborada con sacarosa a 76 grados Brix. c) A los módulos se les colocó una trampilla para inmersión, con el fin de mantener a las rebanadas sumergidas. d) Las rebanadas se dejaron reposar en la solución hipertónica durante 12 h. e) Cumplidas las 12 h, las rebanadas osmodeshidratadas se sacaron de los módulos y se colocaron en un sistema de drenado. El cual consta de una mesa de acero inoxidable con pendientes hacia la parte central, donde se encuentra un orificio para descarga de la solución osmótica diluida. f) La solución diluida (65 grados Brix) se reconstituyó a la concentración de 76 grados Brix, esta operación se realizó utilizando un evaporador (de paila abierta) con capacidad para 350 litros de solución. g) A las rebanadas Osmóticamente Deshidratadas, correspondientes a cada una de las tres geometrías evaluadas, se les determinó: La medición de la Termo expansión se realizó mediante análisis de imágenes digitales, contabilizando los pixeles de las rebanadas. Así mismo, se evaluó en las rebanadas predeshidratadas osmóticamente: el peso, la densidad y el contenido de sólidos solubles (grados Brix).

Las rebanadas predeshidratadas osmóticamente, de las tres diferentes geometrías evaluadas, se sometieron a un proceso de Secado por Microondas en lotes, variando: 1) el Tiempo de secado complementario con microondas, y 2) el Peso de la carga a secar.

Para optimizar el efecto de los Factores Controlados, sobre las diferentes variables de respuesta evaluadas, se empleó de manera recurrente la Metodología de Superficie de Respuesta, utilizando Diseños Rotables, del tipo de Diseños Centrales Compuestos, completamente balanceados, de efecto aleatorio y precisión uniforme.

En la Tabla 1, se presentan los factores controlados, y los niveles correspondientes al Diseño Central Compuesto (DCC), que se utilizó para la optimización del proceso. El DCC se empleó para c/u de las tres geometrías que se evaluaron. Las cinco variables de respuesta fueron: 1) Pérdida de Peso, 2) Termo Expansión, 3) Densidad, 4) Daño Térmico al tejido, y 5) Contenido de sólidos solubles (grados Brix).

Tabla 1: Diseño Central Compuesto empleado para cada una de las tres geometrías descritas. Factores controlados: Tiempo de tratamiento térmico con microondas y Peso de la Carga de rebanadas a deshidratar.

SEGUNDOS	PESO	SEGUNDOS (s)	PESO (g)
X1	X2	E1	E2
-1.00	1.00	240	442.8
-1.00	-1.00	240	157.2
1.00	1.00	540	442.8
1.00	-1.00	540	157.2
0.00	1.41	390	500
0.00	-1.41	390	100
1.41	0.00	600	300
-1.41	0.00	180	300
0.00	0.00	390	300

Para el secado complementario por microondas se emplearon hornos de microondas, cuyas características son: Marca Panasonic, de 2.2 pies cúbicos, Modelo ONN-962w, 1300 watts a 300 Mhz.

La determinación de grados Brix (contenido de sólidos solubles) se realizó por refractometría utilizando el equipo: Abbe Atago, Modelo o 89 553 a 20 °C

El daño térmico en el producto se determinó midiendo el porcentaje de tejido dañado por reacciones de Caramelización.

El porcentaje de Termo Expansión se determinó mediante imágenes digitales, contabilizando los píxeles de las rebanadas predeshidratadas osmóticamente antes y después del secado complementario con microondas.

El análisis sensorial de producto optimizado se realizó con la colaboración de 60 jueces no entrenados (estudiantes de la Unidad Académica de Agricultura de la UAN), utilizando Escalas Hedónicas Semiestructuradas para evaluar los atributos de color, aroma, sabor, textura y agrado general. En las Escalas Hedónicas utilizadas 0 corresponde a pésimo y 100 a excelente.

3.2 Pellets de mango

Se adquirieron 6 toneladas de cáscara y hueso de mango, obtenidos como desechos del proceso de llenado aséptico de mango. Las cáscaras y huesos de mango se colocaron en cajas de entramado de plástico, con capacidad de 15 kg y 25 kg, posteriormente se introdujeron en un cuarto frío a la temperatura de $5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. El Scrap se separó en forma manual con la ayuda de 20 trabajadores

Las cáscaras separadas del scrap se sometieron a un proceso de reducción de tamaño, empleando una rebanadora industrial (Fig. 7), la cual tiene un disco con cuchillas encontradas que giran a 3000 rpm. Con las cáscaras de mango reducidas en tamaño se formó una pasta (Fig. 8), a la cual por refractometría se le determinó el contenido de sólidos.



Fig. 7 Empleo de Rebanadora Industrial



Fig. 8 Pasta de cáscara de mango

La pasta elaborada a partir de cáscara de mango, se colocó en charolas metálicas perforadas de 70 cm x 50 cm, y se llevó a un proceso de secado solar (Fig. 9). En esta etapa se determinó el tiempo de proceso para alcanzar en la pasta, el contenido de humedad requerido para ser extrudida.



Fig. 9. Charolas con pasta de cáscara de mango secándose al sol

Obtenida la pasta de cáscara de mango a la humedad requerida para extruirla se colocó en un extrusor operando a 100 rpm y temperatura ambiente. Se empleó un dado con diámetro de salida de 0.5 cm (Fig. 10a, 10b).

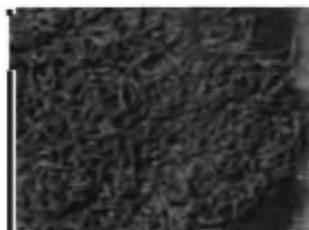


Fig. 10a y 10b. Pasta de cáscara de mango extruida

Los extrudidos obtenidos se colocaron en charolas metálicas perforadas, para secarlos con aire a 50°C, 60°C y 70°C, hasta una humedad del 7.8%.

3.2.2 Análisis de los extrudidos de cáscara de mango.

Los componentes proximales se determinaron por los métodos oficiales descritos por la AOAC (1977), comprendiendo los siguientes análisis:

- Humedad. Por secado de la muestra a 100 °C hasta peso constante.

- Cenizas. Como el peso remanente después de calcinar la muestra en mufla a 550 °C.
- Proteína. Por Kjeldahl. Calculando el contenido de proteína como Nitrógeno x 6.25.
- Grasa. Cuantificada como lípidos libres después de una extracción en éter etílico.
- Fibra Cruda. Cuantificada después de su digestión ácida y alcalina.
- Carbohidratos totales por diferencia, como extracto libre de Nitrógeno.
- Paleatabilidad. Por evaluación de la ingesta libre del alimento de prueba.
- Color. Mediante análisis digital utilizado como referencia los sistemas RGB y Lab.

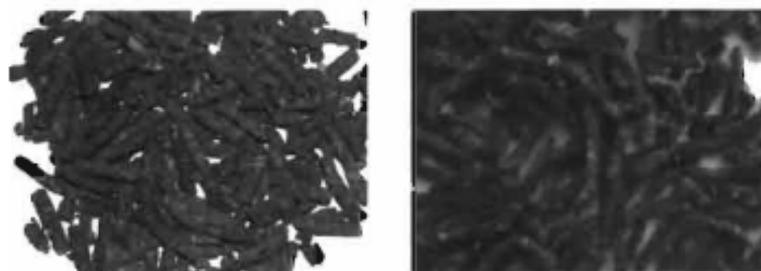


Fig. 11a y 11b. Extruidos secados con aire convencional.

Una vez obtenidos los extruidos (Fig. 11a, 11b) a diferentes temperaturas se continua con la investigación en una segunda instancia en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C. (CIATEJ AC), adquiriéndose Bagazo de Caña de Azúcar (BCA) del estado de Nayarit, el cual contenía crecimiento fúngico y un alto contenido de humedad. Para efectos del estudio, al BCA, se le aplicó un secado solar, bajando su nivel de humedad hasta un 5%. Para el caso de los pellets de mango secados a tres temperaturas diferentes, el contenido de humedad era de 7.8%, se les aplicó un secado complementario (horno de aire convencional marca San-Son modelo

Convection Plus HCX11), debido que al ser sometidos a un molino para su reducción de tamaño de partícula, se pegarían en la pared interior del molino. Quedando la el contenido de humedad del 5%.

Para la reducción de tamaño de partícula de los pellets y BCA, se utilizó un molino marca Pulvex modelo 200. Para estandarizar el tamaño de partícula de estos insumos, se utilizó una tamizadora marca ROTAP modelo RX20, utilizando cernidores de malla #8 para pellets de mango (Fig. 12) y malla #30 y #40 para el BCA (Fig.13).

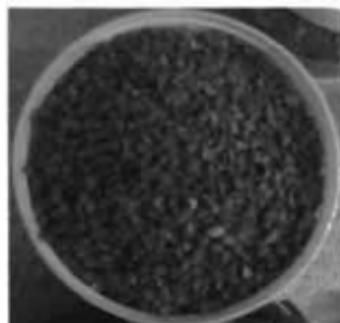


Fig. 12. Pellets de mango cernidos en malla 8

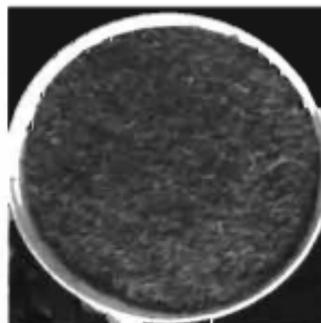


Fig. 13. BCA cernido en malla 30 y 40

3.3 Cinéticas de Producción de pectinasas

Se realizaron tres cinéticas de producción en un fermentador de estado sólido de columnas (Tabla 2), bajo la siguiente metodología para su montaje:

1. Se prepararon 250 ml de medio agar papa dextrosa (PDA), disolviendo 9.75 g de agar papa en 250 ml de agua destilada, ajustando el medio a pH 7.0 con NaOH, el medio se esterilizó en una autoclave electrónica marca Yamato sterilizer modelo SE510 a 1.5 Kg/cm² de presión durante 15 minutos.

2. Se continuó vertiendo el PDA en 4 matraces (esterilizados), realizándose esta operación en una campana de flujo laminar marca Clean Bench Labtech modelo AIHAN, una vez solidificado el medio se continuó con la inoculación del hongo *Aspergillus awamori*, incubándose a 37°C, en una estufa marca Felisa modelo 133, durante 4 días, para su crecimiento.
3. Se pesaron 130 g de BCA, se lavó y se seco a 70°C en una estufa electrónica marca Terlab, durante 2 días.
4. Alcanzado el crecimiento del hongo deseado (Fig. 14) y el BCA seco, se pesaron 130 g de pellet de mango, con temperatura de secado de 50°C. Para tener una relación 50-50 %, de sustrato y soporte.



Fig. 14. Hongo esporulado, *Aspergillus awamori* en medio PDA

5. Se preparó una mezcla de sales esenciales de impregnación para el crecimiento del hongo en el medio, sabiendo que por cada 3 g de BCA se utilizan 7 ml de solución de sales, se prepararon 607 ml de esta solución, pesando 4.595 g de K_2HPO_4 , 3.636 g de urea, 0.909 de $MgSO_4$. Esta solución se vertió en una bolsa para esterilizar junto con los 130 g de BCA y 130 g de pellet de mango. Mezclándolos hasta su homogeneidad y alcanzar una humedad del 75%.
6. Se prepararon 173 ml de una solución de desprendimiento de esporas fúngicas en el medio PDA, Tween al 0.01%, diluyendo 1 gota por cada

100 ml de agua destilada, sabiendo que por cada 3 g BCA se utilizan 2 ml de esta solución.

7. Se esterilizó la bolsa que contenía los pellets de cáscara de mango, BCA y las sales esenciales. Y el matraz que contenía la solución tween, a 1.5 Kg/cm^2 de presión durante 15 minutos.
8. Se tomaron 10 columnas a las cuales en el fondo se les colocó algodón y papel filtro (Fig. 15). Se colocaron en la campana para su esterilización por luz ultravioleta por 20 minutos.



Fig. 15. Columna para fermentación con algodón y papel filtro en fondo

9. Se prepararon las esporas a una concentración de 1.306×10^7 esporas por ml. Utilizando la solución tween como medio de desprendimiento de las esporas en el medio de crecimiento. Mismas que se homogenizaron junto con los pellets y el BCA (estériles).
10. Se llenaron las columnas con 110 g del sustrato.
11. Posteriormente se llenó el fermentador con agua a 30°C , la temperatura se controló utilizando una resistencia eléctrica. Se colocó un soporte de columnas (capacidad para 20 columnas), a las columnas se les colocó un burbujeador, el cual se conectó a un dispersor de aire, se les colocó una trampa, un tubo de acero inoxidable, el cual brindaba soporte a las columnas durante el movimiento del agua generado por el recirculador (Fig.16). Estos pasos se realizaron para cada una de las

columnas. Posteriormente se colocó un recirculador de agua para mantener la temperatura constante (Anexo 2).



Fig. 16. Fermentador a 30°C, con columnas en soporte y suministro de aire.

12. La cinética de producción enzimática duró 120 horas, retirando columnas por duplicado cada 24 horas. Las muestras se retiraron de las columnas agregando 10 ml de solución buffer de citratos fosfatos al 0.05 % a pH de 6.5, utilizando un compresor para expulsar el material hacia el exterior de la columna y colocándolo en una bolsa para su posterior compresión y obtener el extracto enzimático.
13. El extracto enzimático se colocó en tubos de 50 ml, para su posterior centrifugación mediante una ultracentrifuga Sorvall RC 6+ a 20000 rpm durante 20 minutos. De esta manera se separó el extracto de las esporas producidas por el hongo durante la fermentación.
14. Esta metodología se aplicó para los sustratos pellets 60° y 70°C.

Posteriormente se realizaron dos condiciones de fermentación complementarias (Tabla 2), debido a los resultados de producción de pectinasas obtenidos en las fermentaciones anteriores. Para ello se lavaron los pellets

secados a 60° y 70°C. Para disminuir la cantidad de azúcares presentes en los pellets (Anexo 3) y así aumentar la producción de pectinasas, por el hongo.

Tabla 2. Condiciones de Fermentación.

Características	Fermentación 1 BC-M 50	Fermentación 2 BC-M 60	Fermentación 3 BC-M 70	Fermentación 4 BCL-M 60	Fermentación 5 BCL-M 70
Sustrato-esporte	Pellet 50°C-BCA (50-50%)	Pellet 60°C-BCA (50-50%)	Pellet 70°C-BCA (50-50%)	Pellet 60°C Inverso-BCA (50-50%)	Pellet 70°C Inverso-BCA (50-50%)
Indicólo	1.306×10^7 esporas/ml	1.185×10^7 esporas/ml	1.98×10^7 esporas/ml	1.351×10^7 esporas/ml	1.58×10^7 esporas/ml
Humedad	75%	75%	75%	75%	75%
Muestra por columna	110 g	110g	105 g	110 g	110 g
Temperatura	30°C	30°C	30°C	30°C	30°C
Tiempo de ósmosis	24 horas a 120 horas	24 horas a 120 horas	24 horas a 120 horas	24 horas a 120 horas	24 horas a 120 horas

Para poder determinar las mejores condiciones de fermentación, se realizó un análisis de varianza factorial ANOVA; el cual descompone la variabilidad enzimática de pectinasa en las contribuciones debidas a los diversos factores que se probaron en este estudio, sustrato, tiempo de fermentación, pH de actividad y temperatura de actividad. Puesto que se eligió la suma de cuadrados tipo III (valor por defecto), se midió la contribución de cada factor eliminando el resto de los factores.

3.3.1 Caracterización bioquímica de los extractos

La caracterización se realizó cuantificando la actividad enzimática para determinar el pH óptimo, temperatura óptima y termoestabilidad (50°, 60° y 70°).

3.3.1.1 DNS

La actividad de pectinasa de los extractos, se determinó utilizando el método de DNS, para la medición de azúcares reductores liberados por la actividad de pectinasa.

Se pesaron 10 g de hidróxido de sodio, 0,5 g de metasulfito de sodio, 200 g de tartrato de sodio y potasio, 2 g de fenol, 10 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico, diluyendo estos compuestos en 1 lt de agua destilada.

3.3.1.2 pH óptimo

Se prepararon soluciones de pectina en buffer de citratos-fosfatos a 0.05% a pH de 3,6, 4,5, 5,0, 6,0 y 6,5. Pesando 1.420 g de fosfato dibásico de sodio diluido en 200 ml de agua destilada, 1.052 g de ácido cítrico en 100 ml de agua.

Una vez obtenidos los buffer a diferentes pH, se tomó de cada una 50 ml y se mezcló con 0.250 g de pectina de manzana.

Preparados los buffer a diferentes pH, se continuó con la siguiente metodología de trabajo para cuantificar la actividad de pectinasa en los extractos:

1. En tubos eppendorf de 1.5 ml se colocaron 150 μ l, del buffer a pH 3,6 y 50 μ l del extracto enzimático para cada una de las columnas.
2. Para el blanco, se agregaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml, 200 μ l del buffer correspondiente.
3. Se incubaron los tubos a 50°C, durante 10 min
4. Posteriormente se agregó a los tubos 300 μ l de DNS y los tubos se colocaron durante 5 min. En agua a ebullición.
5. Se enfriaron los tubos en hielo
6. Se agregó 1 ml de agua destilada y se colocaron 200 μ l de cada muestra en microplacas. Se leyó en un espectrofotómetro Biorad modelo 680 XR lector de microplacas a 540 nm.
7. Estos pasos se realizaron para cada uno de los pH 4,5, 5,0, 6,0 y 6,5.

3.3.1.3 Temperatura óptima

Para el caso de la temperatura se preparó pectina en buffer citratos fosfatos 0.05% en pH de 6,5, determinando la actividad de pectinasa de la forma siguiente:

1. En tubos eppendorf de 1.5 ml se colocaron 150 μ l, del buffer a pH 6,5 y 50 μ l del extracto enzimático para cada una de las columnas.
2. Para el blanco, se agregaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml, 200 μ l del buffer a pH 6,5.

3. Se incubaron los tubos de acuerdo a su temperatura de incubación (35°, 40°, 45°, 50°, 55°, 60°, 65° y 70° C). durante 10 min.
4. Posteriormente se agregaron a los tubos 300 µl de DNS y los tubos se colocaban durante 5 min. En agua a ebullición.
5. Se enfriaron los tubos en hielo
6. Se agregó 1 ml de agua destilada y se colocaron 200 µl de cada muestra en microplacas. Se leyó en un espectrofotómetro Biorad modelo 680 XR lector de microplacas a 540 nm

3.3.1.4 Termoestabilidad

Se preparó pectina en buffer citratos fosfatos 0.05% a pH 6.5, para determinar la termoestabilidad de los extractos con la actividad de pectinasa.

1. En tubos eppendorf de 2 ml se colocaron 2 ml de del extracto enzimático obtenido de cada columna, y se incubaron a la temperatura correspondiente 50°, 60° y 70°C.
2. Cada 30 min se tomaron 50 µl de extracto enzimático y se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 ml, agregando 150 µl de pectina en buffer citratos-fosfatos.
3. Se incubaron los tubos a 50°C durante 10 min.
4. El blanco se preparó agregando 150 µl del buffer, seguido de 300 µl de DNS y 50 µl del extracto enzimático correspondiente de cada columna. Poniendo los tubos en agua en ebullición.
5. Posteriormente se agregaron a los tubos incubados a 50 °C, 300 µl de DNS y los tubos se colocaban durante 5 min en agua en ebullición.
6. Se agregó 1 ml de agua destilada y se colocaba en microplacas 200 µl de cada muestra. Se leyó en un espectrofotómetro Biorad modelo 680 XR lector de microplacas a 540 nm.

Capítulo 4. Resultados y Discusiones

4.1. Obtención de rebanadas deshidratadas complementariamente con microondas.

En la tabla 3, se presentan los resultados de la primera evaluación, correspondiente al efecto de los dos Factores Controlados para cada una de las tres geometrías de rebanadas de mango procesadas: Tiempo de Secado Complementario con microondas, y Peso de la Carga de rebanadas a secar, sobre las variables de respuesta medidas en las rebanadas de mango predeshidratadas osmóticamente.

Tabla 3. Cifras calculadas con base en las interacciones de factores controlados, relacionados con el menor Daño Térmico del Producto.

Variables de Respuesta	Gajos		Tira		Cachete	
		R ²		R ²		R ²
Mínimo de Daño Térmico (%)	0	0.93	50	0.94	20	0.94
Sólidos solubles (grados Brix)	48	0.96	54	0.99	44	0.97
Peso Final (g)	233	0.97	190	0.97	227	0.96
Densidad (g/ml)	0.95	0.94	1.0	0.92	0.98	0.93
Expansión (%)	30	0.97	25	0.98	10	0.97

En la tabla 3 se puede observar que las rebanadas de mango de las geometrías de "Tira" y "Cachete" presentaron Daño Térmico en todas las condiciones de proceso evaluadas, sin embargo, para las rebanadas de mango de la geometría de "Gajos" se encontraron condiciones de proceso donde no se presentó el Daño Térmico. El peso de cada rebanada de mango predeshidratada osmóticamente, antes del secado con microondas, fue de 10 g, 20 g y 25 g, para las geometrías de "Gajos", "Tira" y "Cachete", respectivamente. Las rebanadas con forma de "Tira", presentaron el mayor Daño Térmico, con un mínimo del 50%. Estos resultados indican que a mayor peso individual de la rebanada, mayor

posibilidad de presentar Daño Térmico, esto es, con base a las condiciones de proceso evaluadas.

Para las rebanadas de mango de la geometría de "Gajos" se encontraron condiciones de proceso donde no se presentó el Daño Térmico, el efecto de las condiciones de proceso sobre el Daño Térmico del producto puede observarse en la figura 17, de acuerdo a esta figura, el Daño Térmico es directamente proporcional al Tiempo de Proceso, e inversamente proporcional al Peso de la Carga de rebanadas que se introducen al microondas, para aplicar un secado complementario.

e

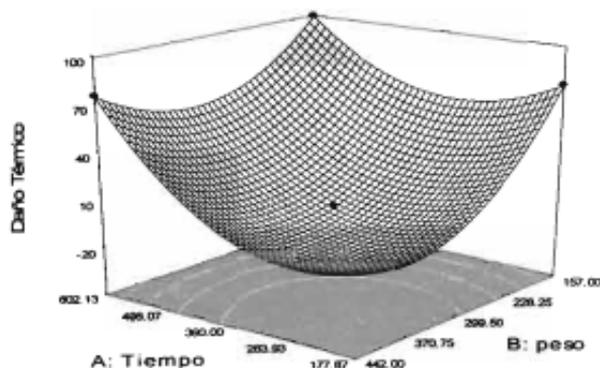


Figura 17: Efecto del Peso de la carga y del Tiempo de Secado Complementario con microondas, sobre el porcentaje de Termo Expansión.

Sin embargo, de acuerdo con el modelo matemático desarrollado, el Daño Térmico se presenta a partir de cargas menores de 300 g, y tiempos de tratamiento térmico superiores a los 415 s. Con base a estos resultados se definieron los niveles de la segunda etapa de optimización del proceso de secado complementario con microondas, aplicado a rebanadas de mango con geometría de "Gajos". La segunda optimización se realizó en función del contenido de sólidos

solubles del producto, ya que este es el principal factor relacionado con la estabilidad microbiológica del mismo.

En la segunda etapa de optimización del proceso de secado complementario, se evaluó el espacio experimental en el intervalo comprendido entre los 300 g - 350 g, para el Peso de la carga, y ente los 394 s - 415 s para el Tiempo de Secado con microondas.

En la figura 18, se muestra la relación entre el porcentaje de termo expansión, y los factores: Tiempo de Secado con microondas y Peso de la Carga a secar. En esta figura se puede apreciar que la termo expansión del producto se incrementó al disminuir el Peso de la Carga a secar, sin embargo a mayor carga de 312 g, la expansión ya no se incrementó. Esto se explica si se considera que a menores cargas la energía de las microondas que incide sobre el producto es mayor, sin embargo la termo expansión del producto tiene un máximo, una vez alcanzado, el reducir el peso de la carga ya no tendrá efecto en la expansión del producto. En esta figura también se puede observar que al incrementar el Tiempo de Secado, se afecta la expansión del producto, lo cual se puede relacionar con la pérdida de masa por evaporación.

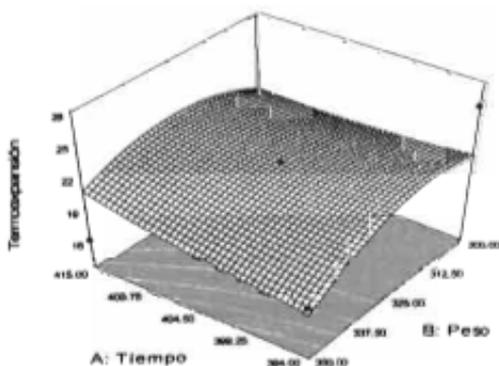


Figura 18: Efecto del Peso de la carga y del tiempo de Secado Complementario con microondas, sobre el porcentaje de Termo Expansión.

Al producto optimizado en la segunda etapa le correspondieron las siguientes condiciones de proceso: Tiempo de Secado con microondas de 394 segundos, Peso de la Carga a secar de 300 gramos. Este producto presentó un contenido máximo de 55 grados Brix ($R^2=0.92$, Figura 19), y las siguientes características: Ausencia de Daño Térmico, peso final de 204g, porcentaje de termo expansión de 26% y densidad de 0.90.

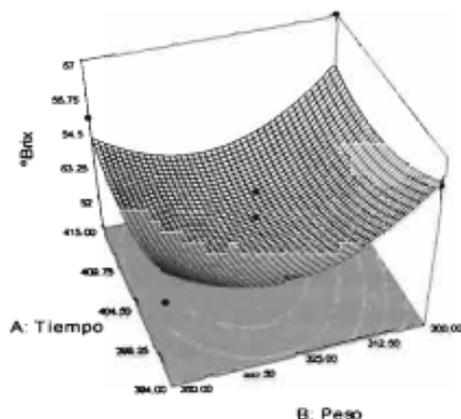


Figura 19: Efecto del Peso de la carga y del tiempo de Secado Complementario con microondas, sobre *Brix.

Los resultados del análisis sensorial del producto optimizado corresponden a una escala hedónica semiestructurada donde 0 corresponde a pésimo y 100 a excelente, y estos fueron: Color = 95 (CV de 7 %), Aroma = 81 (CV de 17%), Sabor = 90 (CV de 12%), Textura = 85 (CV de 14%), Agrado General = 88 (CV de 12%).

4.2. Obtención de pellets de la cáscara de mango

El método de separación utilizado consistió en emplear a 20 personas (estudiantes de la UAN), quienes en forma manual realizaron una separación de 100% de las cáscaras y los huesos de mango. Este equipo de trabajo separó 300

kg de cáscaras por hora. Las cáscaras una vez separadas, se colocaron en contenedores plásticos y de acero inoxidable, y se introdujeron de nuevo al cuarto frío. Los huesos se dejaron en cajas de madera para desecharlos.

Al someter a las cáscaras de mango al proceso de reducción de tamaño, se utilizó una rebanadora con motor de 0.5 hp, se obtuvo una pasta "densa, consistente, uniforme y ligeramente pegajosa", a la cual por refractometría se le determinó el contenido de sólidos solubles en 50%.

Posteriormente se esparcieron 2.5 kg de pasta de mango en 30 charolas de lámina galvanizada perforada, con dimensiones de 70 cm x 50 cm, para en seguida someterla a un proceso de secado solar directo en el periodo de 9:00 a.m. a 13:30 p.m.

Una vez obtenida la pasta de cáscara de mango a una humedad de 35%, se colocó en el extrusor el cual se operó a 100 rpm, temperatura ambiente y utilizando un diámetro de salida de 0.5 cm.

Los extrudidos obtenidos se colocaron en charolas metálicas perforadas, y se sometieron a un secado con aire caliente, a 65 °C, en estas condiciones el tiempo requerido para alcanzar un contenido de humedad del 12 %, fue de 2.5 horas.

También se evaluó el tiempo requerido para alcanzar un contenido de humedad del 12 %, el cual fue de 6 horas de insolación directa, de 9 a 15 horas.

4.1.1 Caracterización de propiedades de los extrudidos de cáscara de mango

Los resultados de composición química de los extrudidos de cáscara de mango se presentan en el Tabla 4.

Tabla 4. Composición proximal (% B,S) de los extrudidos de la cáscara de mango

COMPONENTE	Porcentaje (%)	C.V. (%)
HUMEDAD	7.79	3
CENIZA	4.9	2
PROTEÍNA CRUDA	7.79	2
GRASA CRUDA	2.84	3
FIBRA CRUDA	16.36	1
EXTRACTO LIBRE DE NITRÓGENO	61.34	1

De acuerdo al análisis realizado a los extrudidos de cáscara de mango se observó un contenido de proteínas de 7.7% superior al de los forrajes de caña 2%, avena 3%, yuca 5%, limón 7%, algodón 7%, chícharo 4%, cebada 4%, y similar cáscara de plátano 7.7%. Los extrudidos resultaron relativamente bajos en grasa 3%, pero superior a la de los forrajes de algodón 1%, chícharo 2% o cebada %. El contenido de fibra 16% resultó más alto que al reportado para las fibras de salvado de arroz 7%, maíz 15% o cáscara de cacao 16%. Sin embargo, puede considerarse que los extrudidos contienen un contenido de fibra relativamente bajo, en comparación con los forrajes como el bagazo de piña con 66% de fibra, o la cáscara de café con el 69%. El contenido de cenizas 5% resulto relativamente bajo en comparación con cáscaras como la de plátano 16 %, pero similar al de contenido de cenizas del algodón 3% o el chícharo 5% (Anexo 1).

Lo más importante que se observó en los extrudidos de cáscara de mango fue el alto contenido de extracto libre de nitrógeno 61%, similar al de los forrajes de papa 60% o de harina de yuca 72%, o salvado de maíz 61%, que son forrajes relativamente caros.

4.1.2 Prueba de Paleabilidad

Se realizaron pruebas preliminares de aceptación de los extrudidos de cáscara de mango en función de sus atributos sensoriales. En esta evaluación se observó la respuesta de ganado vacuno, caprino y porcino de la localidad de Llano de la Cruz, Nayarit, al incorporar en su dieta regular una porción de 3 kg de extrudidos de cáscara de mango. Como resultado se encontró que el 100% de la porción de extrudidos, ofrecida a estas especies fue consumida.

4.1.3 Evaluación de color

Tabla 5. Color y Luminosidad de extrudidos de cáscara de mango a diferentes tiempos de almacenamiento

Días	Color (24 bits)			Model RGB				Model Lab						
	Media (Hex)	F**	CV	R	G	B	Luminosidad Media	Std Dev	Lightness Media	Std Dev	a Media	Std Dev	b Media	Std Dev
0	809062*	98	11.0	138	157	90	120	10.4	158.1	8.7	113	1.8	156	6.5
10	72885A*	84	9.7	114	141	90	109	8.4	141.6	8.0	110	1.4	152	4.8
30	748358*	91	11.7	110	131	88	103	5.8	134.3	11.5	116	2.5	149	5.7
45	787058*	85	8.8	128	124	88	101	4.7	139.8	7.8	124	1.2	148	2.5
90	827254*	75	6.6	98	114	94	93	7.8	126.2	7.7	117	1.0	143	3.8

*Análisis de medias por t Student (p<0.05) ** F. Frecuencia relativa del color en una escala de 24 bits.

Se realizó un análisis digital del color de los extrudidos a los 0, 10, 30, 45 y 90 días de almacenamiento a temperatura ambiente, de acuerdo a los resultados obtenidos en la Tabla 5, muestra una ligera pérdida de los tonos rojos y verdes presentes en los colores de la cáscara de mango, y una ligera reducción de la luminosidad medias. Sin embargo, con base a los resultados del análisis estadístico aplicado, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p < .05$). Estos resultados indican que los pigmentos de la cáscara de mango son relativamente estables en cuanto a color, en un periodo evaluado de 90 días.

4.2 Condiciones de Fermentación en Estado Sólido

Las fermentaciones para la producción de pectinasas se siguieron por una cinética enzimática y caracterización bioquímica de los extractos. Se llevó a cabo una cinética para determinar el tiempo de fermentación necesario para obtener la mayor actividad enzimática. Se obtuvieron los extractos de 2 columnas a 24, 48, 72, 96 y 120 horas. A cada extracto se les midió la actividad de pectinasa a diferentes pH, temperaturas y termoestabilidad; midiendo los azúcares reductores liberados en cada reacción (método de Miller) y así poder determinar el extracto con mayor actividad enzimática.

4.2.1 pH óptimo

En la Tabla 6, se presentan los resultados para el pH óptimo de los extractos enzimáticos producidos al utilizar pellets de cáscara de mango secados a 50°C, se puede observar que la máxima actividad presentada es 1,717 UI/ml, en un tiempo de fermentación de 120 horas y pH de 6.5. También se muestra que las mayores actividades que van desde 0,905 hasta la máxima de 1,717 UI/ml, se presentan a pH de 6 y 6.5, en horas de fermentación desde 24 a 120 horas.

Tabla 6. Resultados en pH óptimo para pellets a 50°C para FES 1

Fermentación	pH 3.6	pH 4.5	pH 5.0	pH 6.0	pH 6.5
24 horas	0,000	0,299	0,510	0,905	1,286
48 horas	0,000	0,775	0,475	1,082	1,402
72 horas	0,124	0,909	0,598	0,394	0,983
96 horas	0,459	0,436	0,110	0,280	0,419
120 horas	0,677	0,946	0,918	1,036	1,717

Caso contrario se observa en el Tabla 7, disminuye considerablemente la actividad de pectinasa con un valor 0,278 UI/ml a pH 6.5 para las primeras 24 horas de incubación. Se observa que a las 48 horas de incubación, la actividad de pectinasa va desde 0,060 UI/ml a pH 3.6 hasta 0,278 UI/ml a pH de 6.5 indicando un incremento de actividad conforme disminuye la acidez del pH. La baja actividad

de pectinasa para el FES 2, pudiera deberse a la cantidad inoculada del microorganismo, la cual, fue la menor cantidad de esporas inoculada para cada una de las FES realizadas.

Tabla 7. Resultados de pH óptimo para Pellet a 60°C para FES 2

Fermentación		pH 3.6	pH 4.5	pH 5.0	pH 6.0	pH 6.5
24 horas	UI/ml	0,055	0,000	0,087	0,142	0,278
48 horas		0,060	0,127	0,129	0,153	0,218
72 horas		0,000	0,030	0,036	0,044	0,069
96 horas		0,022	0,079	0,075	0,085	0,064
120 horas		0,083	0,120	0,049	0,081	0,100

La tabla 8, se muestran los resultados de actividad de pectinasa obtenidos a diferentes pH para la FES 3, en donde se puede observar valores similares a los encontrados en la FES 1. Los valores que están en el rango los 0,639 a 1,603 UI/ml, para las primeras 48 horas de fermentación, y obteniendo la máxima actividad a las 24 horas con 1,603 UI/ml.

Tabla 8. Resultados pH óptimo para pellet a 70°C para FES 3

Fermentación		pH 3.6	pH 4.5	pH 5.0	pH 6.0	pH 6.5
24 horas		1,154	0,639	1,322	1,477	1,603
48 horas		1,001	0,663	0,904	1,081	1,182
72 horas	UI/ml	0,461	0,354	0,536	0,505	0,600
96 horas		0,371	0,319	0,354	0,430	0,499
120 horas		0,344	0,276	0,354	0,371	0,415

Estos resultados, se analizaron estadísticamente para poder determinar las mejores condiciones de fermentación utilizando como sustrato bagazo de caña y pellets de cáscara de mango; de acuerdo a las condiciones de fermentación descritas para las FES 1, 2 y 3.

La Tabla 9 muestra los resultados del análisis de varianza factorial ANOVA; el cual descompone la variabilidad de la actividad enzimática de pectinasa

en las contribuciones debidas a varios factores (sustrato, tiempo de fermentación y pH de actividad). Puesto que se ha elegido la suma de cuadrados Tipo III (valor por defecto), se ha medido la contribución de cada factor eliminando los efectos del resto de los factores. Los p-valores comprueban la importancia estadística de cada uno de los factores.

Tabla 9. Análisis de la Varianza para actividad enzimática de pectinasa medida a diferentes pH.

Análisis de la Varianza para Actividad Uiporeal - Sumas de Cuadrados de Tipo III					
Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:pH actividad	1.45925	4	0.364813	4.02	0.0057
B:Sustrato	5.80159	2	2.9008	31.98	0.0000
C:Tiempo Ferm	1.5388	4	0.384701	4.24	0.0042
RESIDUOS	5.80581	64	0.0907157		
TOTAL (CORREGIDO)	14.6055	74			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Dado que 3 p-valores son inferiores a 0.05, estos factores tienen efecto estadísticamente significativo en la actividad enzimática de pectinasa medida a diferentes pH para un 95.0%.

Estos resultados indican que la actividad de pectinasa producida por *A. awamori* tiene una diferencia significativa con respecto al tiempo de fermentación. Para los 3 sustratos utilizados en las FES 1, 2 y 3; se encontró que a las 24 horas de fermentación, se produce la mayor actividad de pectinasa, por lo que no es necesario llevar la fermentación a más de 24 horas (Figura 17).

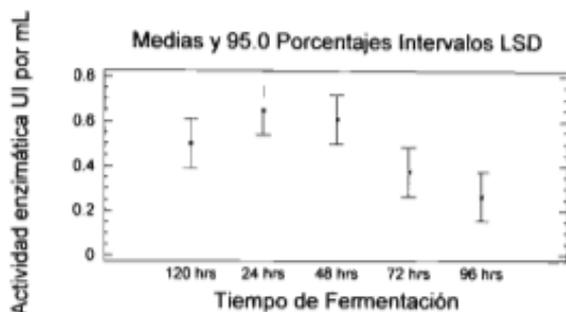


Figura 17. Efecto del tiempo de fermentación sobre la producción de actividad de pectinasa por *A. awamori* en FES 1, 2 y 3.

Por otro lado, en la Figura 18, se observa el efecto del sustrato sobre la producción de actividad pectinasa. Es evidente que hay una diferencia significativa al utilizar bagazo de caña con pellets secados a 60°C (BC-M 60), menor producción de pectinasas, con respecto a las otras dos combinaciones de sustratos; bagazo de caña y pellets secados a 50 y 70°C (BC-M 50 y BC-M 70, respectivamente). Esto puede ser debido a la menor cantidad de esporas utilizadas para inocular la FES 2. Además puede observarse, que no hay una diferencia significativa entre la actividad enzimática producida al utilizar BC-M 50 y BC-M 70. Por lo que podemos concluir que la fermentación puede ser llevada a cabo utilizando cualquiera de las combinaciones de sustratos.

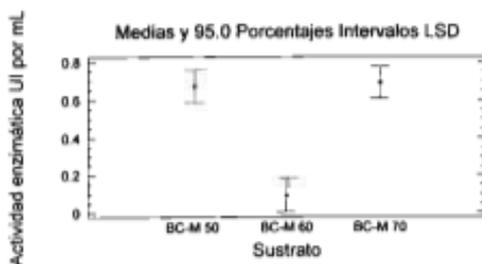


Figura 18. Efecto de los diferentes sustratos sobre la producción de actividad de pectinasa por *A. awamori* en FES 1, 2 y 3.

En la Figura 19 se observa que, estadísticamente el pH óptimo para la actividad de pectinasa es de 6.5 considerando las tres fermentaciones; a este pH se observa la máxima actividad; sin embargo, no hay una diferencia significativa con el pH 6.0.

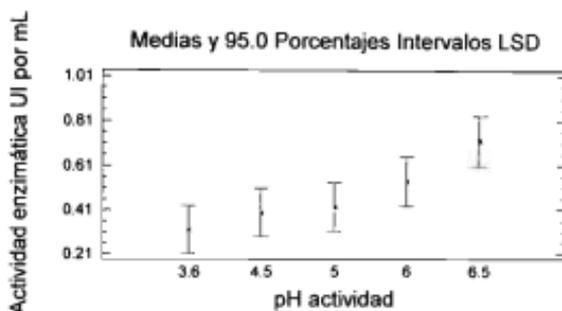


Figura 19. Efecto de los diferentes pH sobre la actividad de pectinasa producida por *A. awamori* en FES 1, 2 y 3.

En la Tabla 10 se observan los valores obtenidos de pH para pellets lavados y secados a 60°, en los cuales se aprecia un incremento significativo en la actividad de pectinasa para las primeras 48 horas de fermentación, disminuyendo su actividad conforme aumentaron las horas de incubación. La mayor cantidad de pectinasa se obtuvo a pH de 6.5 con 1,638 UI/ml, para las primeras 24 horas de fermentación.

Tabla 10. Resultados pH óptimo para pellet lavado, secado a 50°C en FES 4.

Fermentación		pH 3.6	pH 4.5	pH 5.0	pH 6.0	pH 6.5
24 horas		1,228	1,425	1,493	1,524	1,638
48 horas		0,958	1,105	1,206	1,219	1,231
72 horas	UI/ml	0,512	0,622	0,709	0,658	0,515
96 horas		0,407	0,556	0,522	0,543	0,479
120 horas		0,427	0,498	0,523	0,510	0,446

Resultados similares resultados se presentaron para el pH en pellet lavado y secado a 70°C, en la FES 5 (Tabla 11). Obteniendo durante las primeras 24 horas de fermentación la máxima actividad de pectinasa de 1,344 UI/ml a un pH de 6.5, disminuyendo un poco la actividad en las 48 horas, a 1,230 UI/ml en pH de 6.5.

Tabla 11. Resultados pH óptimo para pellet lavado, secado a 70°C en FES 5.

Fermentación		pH 3.6	pH 4.5	pH 5.0	pH 6.0	pH 6.5
24 horas	UI/ml	0,833	1,384	1,470	1,490	1,344
48 horas		0,578	1,013	1,128	1,185	1,230
72 horas		0,314	0,519	0,558	0,627	0,572
96 horas		0,281	0,393	0,428	0,470	0,332
120 horas		0,229	0,387	0,362	0,431	0,286

Analizados los resultados anteriores de pH, se encontró que durante las primeras 24 horas se obtuvo la máxima actividad de pectinasa, a un pH óptimo de 6.5. Con respecto a la temperatura de secado de los pellets, la actividad se ve favorecida con el secado a altas temperaturas, esto es para el pellet secado a 70°C, cuando se lava el pellet se obtiene actividades similares pero aumentando el rango de secado de 60 y 70°C. Siendo el pH óptimo entre 6.0 y 6.5, para temperatura de secado de 70° y lavando los pellets, temperaturas de 60 y 70°C, esto para las primeras 24 horas de fermentación.

Estos resultados, se analizaron estadísticamente para poder determinar las mejores condiciones de fermentación utilizando como sustrato bagazo de caña y pellets de cáscara de mango; de acuerdo a las condiciones de fermentación descritas para las FES 4 y 5. De esta manera se pudieron determinar si los resultados obtenidos son realmente significativos.

La Tabla 12 muestra los resultados del análisis de varianza factorial ANOVA; para determinar el efecto de varios factores (sustrato, tiempo de

fermentación y pH de actividad) sobre la actividad de pectinasa producida bajo las condiciones de fermentación ya mencionadas.

Tabla 12. Análisis de varianza para actividad enzimática a diferentes pH.

Análisis de la Varianza para actividad enzimática UI por mL - Sumas de Cuadrados de Tipo III					
Fuente	Suma de cuadrados	Gl Cuadrado	Medio	Cociente-F	P-Valor
EFECTOS PRINCIPALES					
A: pH actividad	0.518428	4	0.129607	16.29	0.0000
B: Sustrato	0.232835	1	0.232835	29.26	0.0000
C: Tiempo de Ferme	7.3887	4	1.84717	232.16	0.0000
RESIDUOS	0.318259	40	0.00795647		
TOTAL (CORREGIDO)	8.45822	49			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Dado que 3 valores son inferiores a 0.05, estos factores tienen efecto estadísticamente significativo en Actividad UI/mL para un 95.0%. Estos resultados indican que la actividad de pectinasa producida por *A. awamori* tiene una diferencia significativa con respecto al tiempo de fermentación. Para los 2 sustratos utilizados en las FES 4 y 5; se encontró que a las 24 horas de fermentación, se produce la mayor actividad de pectinasa, por lo que no es necesario llevar la fermentación a más de 24 horas (Figura 20). Estos resultados son similares a los obtenidos a las FES 1, 2 y 3.

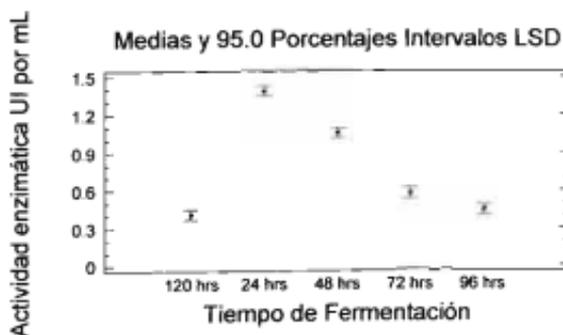


Figura 20. Efecto del tiempo de fermentación sobre la producción de actividad de pectinasa por *A. awamori* en FES 4 y 5.

Por otro lado, en la Figura 21, se observa el efecto del sustrato sobre la producción de actividad pectinasa para las FES 4 y 5. Es evidente que hay una diferencia significativa al utilizar bagazo de caña con pellets lavados y secados a 60°C (BCL-M 60), mayor producción de pectinasas, con respecto a la combinación de sustratos bagazo de caña y pellet lavado y secado a 70°C (BCL-M 70). Además, puede observarse que el pH óptimo encontrado para estos extractos es de 6.0; sin embargo no hay una diferencia significativa con respecto al pH 5.0 (Figura 22).

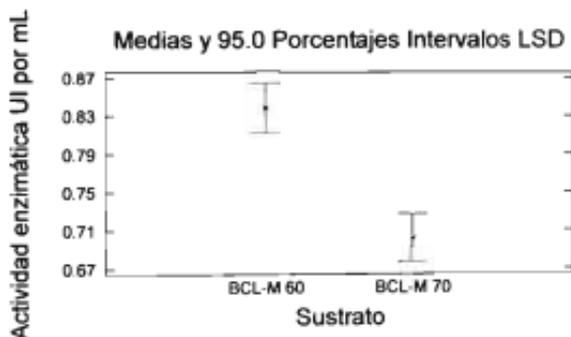


Figura 21. Efecto del sustrato de fermentación sobre la producción de actividad de pectinasa por *A. awamori* en FES 4 y 5.

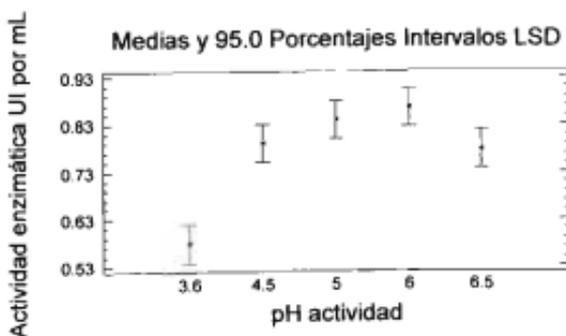


Figura 22. Efecto del pH sobre la actividad de pectinasa producida por *A. awamori* en FES 4 y 5.

4.2.2 Temperatura óptima

En la Tabla 13, se presentan los resultados obtenidos para temperatura óptima para la FES1. Cabe señalar que la variabilidad en los perfiles de actividad a las diferentes temperaturas, se atribuye a que los extractos obtenidos en las diferentes fermentaciones son extractos crudos; es decir, la actividad de pectinasas observada puede ser debida a la presencia de más de 1 pectinasa cuyas temperaturas óptimas sean diferentes. Este comportamiento se puede observar en el extracto obtenido a las 24 horas en la FES 1; observándose 2 picos de máxima actividad a los 50 y 70°C.

Tabla 13. Resultados. Temperatura óptima para pellet a 50°C para FES 1

Fermentación	35°	40°	45°	50°	55°	60°	65°	70°
24 horas	0,318	0,662	0,751	1,682	1,114	0,197	0,970	1,024
48 horas	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
72 horas	0,762	0,470	0,616	0,000	0,000	0,373	0,464	0,432
96 horas	0,580	0,462	0,441	0,968	0,000	0,247	0,028	0,000
120 horas	1,107	1,607	1,389	0,000	1,109	0,839	1,064	1,803

Un comportamiento similar se observó para los extractos obtenidos en las fermentaciones FES 2 (Tabla 14) y FES 3 (Tabla 15). Por ejemplo, se detectaron 3 picos de máxima actividad de pectinasa a 35, 50 y 65 °C para los extractos obtenidos a las 48 horas y 24 horas, en la FES 2 y FES 3, respectivamente.

Tabla 14. Resultados de temperatura óptima para pellet a 50°C para FES 2

Fermentación	35°	40°	45°	50°	55°	60°	65°	70°
24 horas	0,096	0,098	0,071	0,114	0,034	0,000	0,000	0,000
48 horas	0,175	0,140	0,113	0,160	0,076	0,019	0,360	0,334
72 horas	0,116	0,092	0,077	0,106	0,050	0,003	0,206	0,151
96 horas	0,072	0,057	0,060	0,092	0,051	0,000	0,165	0,104
120 horas	0,061	0,060	0,062	0,099	0,033	0,000	0,192	0,104

"Aprovechamiento de la pulpa, cáscara de mango (Mangifera Indica L.) y Bagazo de caña, para la obtención de productos de interés Agroindustrial"

Tabla 15. Resultados Temperatura óptima para pectat a 70°C para FEB 3.

Fermentación	35°	40°	45°	50°	55°	60°	65°	70°
24 horas	1,682	1,599	1,497	1,753	1,695	1,699	1,728	1,443
48 horas	1,220	1,096	0,874	1,175	1,159	1,170	1,072	0,961
72 horas	0,626	0,545	0,374	0,526	0,605	0,597	0,556	0,498
96 horas	0,479	0,428	0,342	0,455	0,513	0,439	0,492	0,361
120 horas	0,377	0,416	0,310	0,438	0,447	0,398	0,406	0,312

Debido al perfil característico que se observa al medir el efecto de la temperatura sobre la actividad de pectinasa, en extractos crudos; el análisis estadístico arroja como resultado que la temperatura no tiene un efecto significativo sobre la actividad enzimática (Tabla 16 y Figura 23).

Tabla 16. Análisis de varianza de la actividad de pectinasa a diferentes temperaturas.

Análisis de la Varianza para Actividad UI por ml - Sumas de Cuadrados de Tipo III					
Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Sustrato	18.5899	2	5.29496	34.94	0.0000
B: Temperatura de a	0.168537	7	0.0240768	0.16	0.9924
C: Tiempo Fermentac	4.81436	4	1.20359	7.94	0.0000
RESIDUOS	16.062	106	0.151528		
TOTAL (CORREGIDO)	31.6348	119			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

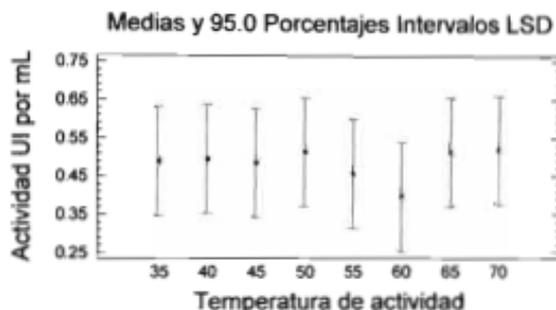


Figura 23. Efecto de la temperatura sobre la actividad de pectinasa producida por *A. awamori* en FES 1, 2 y 3.

En las Tablas 17 y 18 se observan los resultados del efecto de la temperatura sobre la actividad de pectinasa de los extractos crudos obtenidos en las FES 4 y 5. El perfil observado es similar al obtenido para los extractos obtenidos en las FES 1, 2 y 3. Se pueden observar 4 picos de máxima actividad a los 35, 45, 60 y 70 °C para los extractos obtenidos a las 24 y 48, para las FES 3 y 4.

Tabla 17. Resultados Temperatura óptima para perfil levado, secado a 60°C en FES 4

Fermentación	35°	40°	45°	50°	55°	60°	65°	70°
24 horas	1,766	0,983	1,605	1,593	1,350	1,539	1,448	1,731
48 horas	1,525	0,767	1,139	1,103	0,946	1,270	1,161	1,434
72 horas	0,785	0,500	0,581	0,464	0,441	0,642	0,537	0,710
96 horas	0,698	0,347	0,482	0,399	0,304	0,544	0,409	0,560
120 horas	0,648	0,340	0,396	0,427	0,238	0,470	0,390	0,517

Tabla 18. Resultados Temperatura óptima para pellet lavado, secado a 70°C en FES 5.

Fermentación	35°	40°	45°	50°	55°	60°	65°	70°
24 horas	0,960	0,716	0,928	0,755	0,741	0,921	0,642	0,778
48 horas	0,659	0,517	0,721	0,499	0,499	0,722	0,378	0,563
72 horas	0,315	0,409	0,353	0,191	0,234	0,309	0,167	0,220
96 horas	0,249	0,201	0,290	0,111	0,133	0,226	0,238	0,170
120 horas	0,230	0,187	0,222	0,079	0,106	0,177	0,136	0,143

Es importante mencionar que para los extractos obtenidos a las 72, 96 y 120 horas, estos perfiles cambian. Este comportamiento puede ser atribuido a la aparición de proteasas en el sistema de fermentación que degradan, entre otras proteínas, a las pectinasas que se sintetizaron en las primeras 24 horas de fermentación. Finalmente, comparando los datos de las 5 fermentaciones y haciendo un análisis estadístico global, se puede determinar que la combinación soporte-sustrato utilizada (ver Tabla 2) para obtener la actividad de pectinasas no tiene una diferencia significativa; por lo que se puede utilizar cualquier combinación para llevar a cabo la producción de pectinasas (Figura 24). Cabe señalar que el sustrato BC-M 60 se sale de esta comparación, probablemente debido a la utilización de menor cantidad de esporas para inocular las columnas de fermentación.

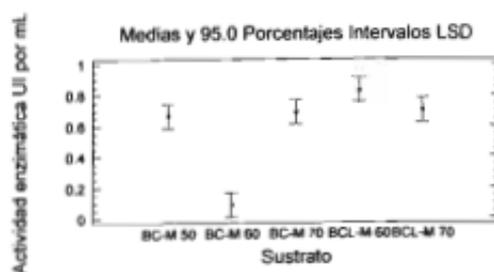


Figura 24. Efecto del soporte sobre la actividad de pectinasa producida por *A. awamori* en FES 1, 2, 3, 4 y 5.

De igual manera, se confirma que el tiempo necesario para obtener la máxima actividad de pectinasa con *Aspergillus awamori*, utilizando bagazo de caña y pellets de cáscara de mango como soporte-sustrato, es de 24 horas (Figura 25). A pesar de que en esta gráfica, los resultados para el soporte BC-M 50 se salen de esta aseveración, en las análisis estadísticos por grupo de soporte, FES 1,2 y 3 (Figura 17), se puede observar que el tiempo de fermentación ideal para este grupo de soportes es de 24 horas.

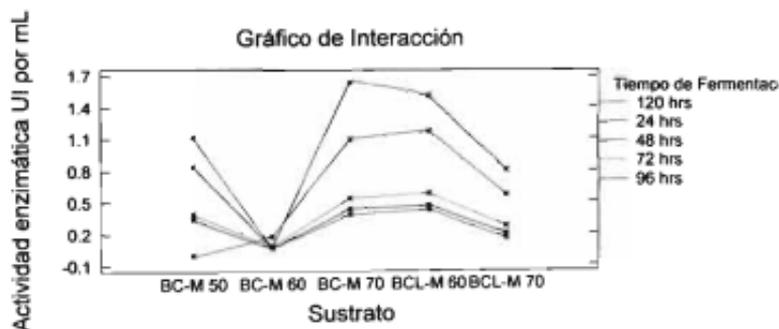


Figura 25. Interacción entre el efecto del tiempo de fermentación y el sustrato utilizados para producción de pectinasas.

4.2.3 Termoestabilidad

La termoestabilidad de un extracto enzimático crudo es difícil de determinar; ya que el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de pectinasas no es sobre una sola enzima; sino sobre todas aquellas pectinasas que se hayan producido durante la fermentación. En este caso, al igual que en las determinaciones de pH y temperaturas óptimas, no se puede observar un típico comportamiento en la determinación de termoestabilidad; es decir, un decaimiento de la actividad de pectinasa con respecto al tiempo.

4.2.3.1 Termoestabilidad 50°C

En las Tablas de la 19 a la 23, se muestran los resultados de termoestabilidad a 50°C para la FES 1, 2, 3, 4 y 5. En todos los casos la estabilidad de los extractos presenta variaciones en cuanto a la actividad residual con respecto al tiempo. Tomando como base los extractos obtenidos a las 24, 48 y 72 horas, todos presentan actividad residual a los 300 min; a pesar de que para algunos extractos la actividad residual resultó de 0 después de cierto tiempo (210 min para el extracto de 48 horas de la FES 1).

Tabla 19. Resultados de Termoestabilidad a 50°C para pellet a 50°C para FES 1

Fermentación	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min	210 min	240 min	270 min	300 min
24 horas	0,162	0,299	0,289	0,285	0,272	0,251	0,262	0,273	0,256	0,223
48 horas	0,154	0,157	0,128	0,079	0,043	0,038	0,000	0,033	0,110	0,154
72 horas	0,045	0,063	0,115	0,036	0,100	0,053	0,066	0,027	0,044	0,035
96 horas	0,054	0,045	0,114	0,060	0,111	0,048	0,079	0,042	0,038	0,029
120 horas	0,152	0,112	0,063	0,124	0,136	0,133	0,108	0,073	0,055	0,041

Tabla 20. Resultados de termoestabilidad 50°C para pellet a 50°C para FES 2

Fermentación	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min	210 min	240 min	270 min	300 min
24 horas	0,000	0,000	0,000	0,000	0,155	0,000	0,112	0,108	0,000	0,138
48 horas	0,019	0,015	0,046	0,000	0,169	0,025	0,179	0,021	0,104	0,132
72 horas	0,036	0,000	0,032	0,000	0,065	0,037	0,024	0,082	0,000	0,030
96 horas	0,059	0,022	0,000	0,023	0,054	0,026	0,001	0,003	0,000	0,000
120 horas	0,224	0,000	0,000	0,000	0,000	0,011	0,000	0,000	0,000	0,000

Tabla 21. Resultados Termoeestabilidad a 50°C para pellet a 70°C para FES 3

Fermentación	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min	210 min	240 min	270 min	300 min
24 horas	0,400	0,379	0,604	0,807	0,765	0,000	0,705	0,000	0,924	0,384
48 horas	0,667	0,691	0,653	0,683	0,435	0,143	0,399	0,017	0,691	0,354
72 horas	0,289	0,147	0,125	0,466	0,166	0,299	0,275	0,086	0,379	0,211
96 horas	0,287	0,301	0,362	0,437	0,352	0,209	0,270	0,040	0,200	0,149
120 horas	0,237	0,269	0,316	0,390	0,215	0,234	0,256	0,033	0,216	0,117

Tabla 22. Resultados Termoeestabilidad a 50°C para pellet lavado, secado a 50°C en FES 4

Fermentación	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min	210 min	240 min	270 min	300 min
24 horas	0,140	0,025	0,039	0,091	0,041	0,004	0,382	0,000	0,000	0,136
48 horas	0,117	0,000	0,167	0,000	0,132	0,000	0,208	0,080	0,019	0,138
72 horas	0,054	0,000	0,031	0,011	0,024	0,098	0,083	0,042	0,000	0,154
96 horas	0,056	0,000	0,023	0,097	0,000	0,041	0,272	0,000	0,000	0,016
120 horas	0,058	0,024	0,069	0,018	0,015	0,027	0,065	0,000	0,000	0,011

Tabla 23. Resultados Termoeestabilidad a 50°C para pellet lavado, secado a 70°C en FES 5

Fermentación	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min	210 min	240 min	270 min	300 min
24 horas	0,000	0,000	0,000	0,044	0,021	0,075	0,092	0,036	0,044	0,091
48 horas	0,012	0,007	0,006	0,014	0,016	0,033	0,039	0,031	0,059	0,037
72 horas	0,014	0,027	0,019	0,008	0,000	0,025	0,001	0,000	0,127	0,108
96 horas	0,002	0,000	0,029	0,001	0,000	0,028	0,038	0,008	0,053	0,056
120 horas	0,000	0,000	0,024	0,000	0,020	0,050	0,008	0,004	0,035	0,018

A pesar de la dificultad para analizar estos resultados; se realizó un análisis estadístico ANOVA (Tabla 24); de acuerdo a este análisis, el tiempo de incubación para medir la termoeestabilidad de los extractos a 50°C, no tiene un efecto significativo sobre la actividad residual.

Tabla 24. Análisis de varianza de la termoestabilidad de los extractos enzimáticos a 50°C.

Análisis de la Varianza para Actividad residual UI por mL - Sumas de Cuadrados de Tipo II

Fuente	Suma de cuadrados	Gl. Cuadrado	Medio Cuadrado	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Bagazo	1.54042	4	0.385106	16.28	0.0000
B: Tiempo minutos	0.272252	9	0.0302503	1.28	0.2819
RESIDUOS	0.851794	36	0.023661		
TOTAL (CORREGIDO)	2.66447	49			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

De este análisis también se puede determinar que los extractos producidos al utilizar bagazo de caña y pellets de cáscara de mango secados a 70°C (BC-M 70), son más estables a 50°C que el resto de los extractos (Figura 26).

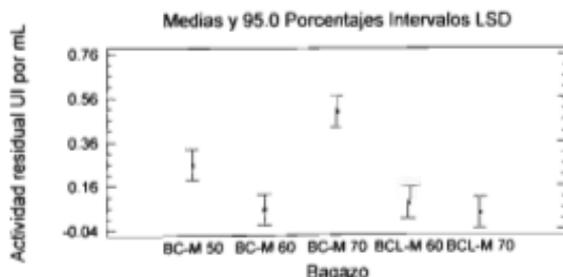


Figura 26. Medias de la Actividad residual de pectinasa en los diferentes extractos. Termoestabilidad a 50 °C.

4.2.3.2 Termoestabilidad a 60°C

En las Tablas 25, 26, 27, 28 y 29 se muestran los resultados obtenidos para la termoestabilidad a 60°C, para la FES 1, 2, 3, 4 y 5. Al igual que para la termoestabilidad medida a 50°C, en todos los casos la estabilidad de los extractos presenta variaciones en cuanto a la actividad residual con respecto al tiempo.

Tabla 25. Resultados de Termoestabilidad a 50°C para pellet a 50° C para FES 1

Fermentación	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min	210 min	240 min	270 min	300 min
24 horas	0,192	0,154	0,269	0,283	0,277	0,237	0,276	0,272	0,307	0,284
48 horas	0,021	0,011	0,031	0,021	0,018	0,040	0,061	0,054	0,018	0,011
72 horas	0,079	0,091	0,082	0,116	0,106	0,149	0,098	0,116	0,105	0,095
96 horas	0,054	0,045	0,114	0,060	0,111	0,048	0,079	0,042	0,038	0,024
120 horas	0,243	0,243	0,212	0,297	0,232	0,273	0,252	0,255	0,254	0,244

Tabla 26. Resultados de termoestabilidad 60°C para pellet a 60°C para FES 2

Fermentación	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min	210 min	240 min	270 min	300 min
24 horas	0,281	0,017	0,056	0,090	0,670	0,000	0,408	0,364	0,000	0,012
48 horas	0,177	0,101	0,169	0,226	0,072	0,103	0,282	0,706	0,000	0,000
72 horas	0,054	0,081	0,035	0,079	0,099	0,042	0,195	0,251	0,058	0,000
96 horas	0,082	0,022	0,055	0,040	0,020	0,056	0,078	0,241	0,000	0,008
120 horas	0,042	0,120	0,108	0,038	0,068	0,042	0,220	0,213	0,087	0,043

Tabla 27. Resultados Termoestabilidad a 60°C para pellet a 10°C para FES 3

Fermentación	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min	210 min	240 min	270 min	300 min
24 horas	0,000	0,000	0,000	0,095	0,472	0,068	0,106	0,076	0,174	0,290
48 horas	0,000	0,187	0,016	0,126	0,455	0,088	0,107	0,232	0,646	0,516
72 horas	0,000	0,080	0,043	0,164	0,256	0,046	0,055	0,017	0,226	0,279
96 horas	0,014	0,028	0,032	0,092	0,179	0,082	0,006	0,025	0,123	0,238
120 horas	0,000	0,084	0,037	0,110	0,164	0,065	0,028	0,077	0,006	0,172

Tabla 28. Resultados Termoestabilidad a 60°C para pellet lavado, secado a 60°C, en FES 4

Fermentación	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min	210 min	240 min	270 min	300 min
24 horas	0,124	0,189	0,000	0,970	0,100	0,000	0,000	0,026	0,104	0,000
48 horas	0,213	0,046	0,029	0,781	0,062	0,000	0,000	0,068	0,014	0,041
72 horas	0,087	0,036	0,004	0,368	0,000	0,006	0,000	0,000	0,013	0,019
96 horas	0,057	0,031	0,000	0,253	0,011	0,000	0,000	0,172	0,000	0,004
120 horas	0,034	0,084	0,000	0,209	0,035	0,000	0,003	0,009	0,000	0,000

"Aprovechamiento de la pulpa, cáscara de mango (Mangifera Indica L.) y Bagazo de caña, para la obtención de productos de interés Agroindustrial"

Tabla 29. Resultados Termoestabilidad a 50°C para pectín lavado, secado a 70°C, en FES 5

Fermentación	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min	210 min	240 min	270 min	300 min
24 horas	0,385	0,072	0,000	0,729	0,128	0,039	0,004	0,116	0,000	0,024
48 horas	0,326	0,045	0,004	0,834	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
72 horas	0,100	0,000	0,000	0,126	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,000
96 horas	0,017	0,018	0,001	0,319	0,000	0,000	0,014	0,008	0,009	0,000
120 horas	0,084	0,000	0,007	0,315	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000

De acuerdo al análisis estadístico de estos datos, para la termoestabilidad a 60 °C no hay diferencia significativa de ninguno de los factores analizados (tiempo de incubación, sustratos) sobre la actividad residual de pectinasa (Tabla 30).

Tabla 30. Análisis de varianza de la termoestabilidad de los extractos enzimáticos a 60°C.

Análisis de la Varianza para Actividad residual UI por ml. - Sumas de Cuadrados de Tipo I

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente F	P-valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Sustrato	0.8758158	4	0.218954	0.42	0.7928
B: Tiempo minutos	0.630014	9	0.0700015	1.55	0.1673
RESIDUOS	1.62388	36	0.0450855		
TOTAL (CORREGIDO)	2.32891	49			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

En la Figura 27, se puede observar que para la termoestabilidad a 60°C, ninguno de los extractos con actividad de pectinasa, es más estable con respecto a los otros al no ver una diferencia significativa entre las medias de las actividades residuales.

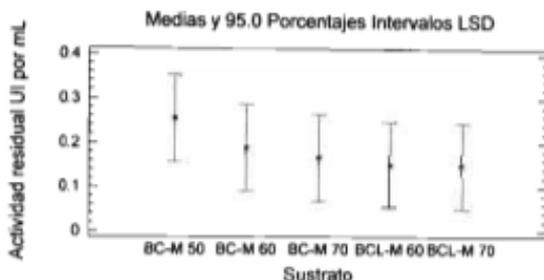


Figura 27. Medias de la Actividad residual de pectinasa en los diferentes extractos. Termoestabilidad a 60 °C.

4.2.3.3 Termoestabilidad 70°C

En las Tablas 31, 32, 33, 34 y 35 se muestran los resultados obtenidos para la termoestabilidad a 70°C, para la FES 1, 2, 3, 4 y 5. La medición de la termoestabilidad a 70°C, presenta el mismo comportamiento que para las termoestabilidades medidas a 50 y 60°C, en todos los casos la estabilidad de los extractos presenta variaciones en cuanto a la actividad residual con respecto al tiempo; esto como ya se mencionó debido a que se trabajó con extractos crudos.

Tabla 31. Resultados de termoestabilidad a 70°C para pellet a 50°C para FES 1

Fermentación	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min	210 min	240 min	270 min	300 min
24 horas	0,163	0,219	0,087	0,142	0,071	0,071	0,018	0,044	0,035	0,027
48 horas	0,138	0,180	0,190	0,243	0,300	0,241	0,344	0,229	0,270	0,226
72 horas	0,026	0,068	0,036	0,660	0,063	0,113	0,141	0,049	0,042	0,037
96 horas	0,000	0,033	0,059	0,078	0,055	0,101	0,122	0,077	0,032	0,048
120 horas	0,165	0,123	0,070	0,153	0,144	0,135	0,100	0,101	0,060	0,085

Tabla 32. Resultados Termoestabilidad a 70°C para pellet a 60°C, para FES 3

Fermentación	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min	210 min	240 min	270 min	300 min
24 horas	0,000	0,106	0,147	0,125	0,164	0,611	0,521	0,480	0,029	0,490
48 horas	0,103	0,274	0,523	0,095	0,107	0,286	0,316	0,536	0,000	0,323
72 horas	0,114	0,188	0,193	0,075	0,041	0,090	0,125	0,254	0,010	0,218
96 horas	0,094	0,050	0,215	0,077	0,054	0,053	0,087	0,130	0,077	0,308
120 horas	0,134	0,074	0,201	0,024	0,039	0,000	0,111	0,068	0,016	0,061

Tabla 33. Resultados Termoestabilidad a 70°C para pellet lavado, secado a 60°C, para FES 4

Fermentación	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min	210 min	240 min	270 min	300 min
24 horas	0,049	0,043	0,000	0,172	0,033	0,352	0,144	0,193	0,096	0,087
48 horas	0,152	0,033	0,031	0,016	0,016	0,066	0,098	0,268	0,080	0,000
72 horas	0,019	0,012	0,080	0,103	0,019	0,047	0,119	0,066	0,117	0,047
96 horas	0,088	0,000	0,090	0,015	0,018	0,009	0,020	0,078	0,059	0,033
120 horas	0,050	0,000	0,061	0,069	0,017	0,000	0,004	0,054	0,927	0,007

Tabla 34. Resultados Termoestabilidad a 70°C para pellet lavado, secado a 70°C, para FES 5

Fermentación	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min	210 min	240 min	270 min	300 min
24 horas	0,341	0,000	0,085	0,095	0,162	0,065	0,066	0,030	0,181	0,087
48 horas	0,190	0,017	0,045	0,007	0,004	0,026	0,083	0,126	0,011	0,220
72 horas	0,086	0,138	0,052	0,018	0,022	0,088	0,014	0,045	0,002	0,005
96 horas	0,039	0,051	0,001	0,008	0,007	0,010	0,028	0,039	0,007	0,011
120 horas	0,018	0,013	0,015	0,000	0,012	0,027	0,047	0,010	0,013	0,011

De acuerdo al análisis estadístico de estos datos, hay diferencia significativa en la termoestabilidad de los extractos obtenidos al utilizar el sustrato BC-M 70 para su producción (Tabla 35); siendo más estables con respecto a los extractos obtenidos al utilizar BC-M 50, BCL-M 60 y BCL-M 70. Sin embargo, no hay una diferencia significativa al compararlo con la termoestabilidad de los extractos obtenidos al utilizar BC-M 60 (Figura 28).

Tabla 35. Análisis de varianza de la termoestabilidad de los extractos enzimáticos a 70°C.

Análisis de la Varianza para Actividad Residual UI por mL - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Sustrato	0.224768	4	0.0561919	2.45	0.0638
B:Tiempo Minutos	0.239067	9	0.0265631	1.16	0.3507
RESIDUOS	0.826333	36	0.0229537		
TOTAL (CORREGIDO)	1.29017	49			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

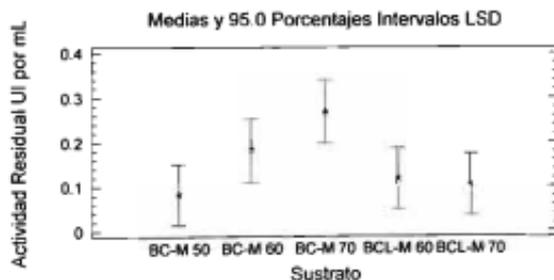


Figura 28. Medias de la Actividad residual de pectinasa en los diferentes extractos. Termoestabilidad a 70 °C.

Los resultados más relevantes anteriores se cotejan y se muestran en el Tabla 36, en donde se muestra las unidades totales por gramo obtenidas para cada caracterización realizada en las cinéticas enzimáticas.

Tabla 36. Resultados de cinéticas enzimáticas expresados en Unidades totales por columna		
24 horas		
FES 1		
pH óptimo	6.5	38,39 U
Temp. Óptima	50°C	50,22 U
Termoestabilidad 60°C	120-240 min	96 %
FES 2		
pH óptimo	6.5	7,99 U
Temp. Óptima	50°C	3,22 U
Termoestabilidad 70°C	180-240 min	78 %
FES 3		
pH óptimo	6.5	48,12 U
Temp. Óptima	50°C	52,62 U
Termoestabilidad 70°C	180-300 min	78 %
FES 4		
pH óptimo	6.5	57,24 U
Temp. Óptima	35°C	61,72 U
Termoestabilidad 70°C	180-300 min	27 %
FES 5		
pH óptimo	6.5	62,09 U
Temp. Óptima	35°C	44,35 U
Termoestabilidad 60°C	120-240 min	17 %

En la Tabla 36, se observan los mejores resultados para cada una de las cinéticas realizadas, en donde se muestra, que en la FES 1 la producción máxima de actividad pectinasa es 24 horas con pH de 6.5 y temperatura óptima de 70°C, obteniendo 38,39 U y 50,22 U, pero teniendo su termoestabilidad con 10,27 U. esto puede deberse a la activación y desactivación de pectinasas, por ejemplo en la Figura 29, que nos muestra los picos de respuesta para termoestabilidad en 24 horas para la FES 1. En dicha figura la actividad de pectinasa presenta altibajos en actividad de pectinasa que pudiera deberse a la desactivación y activación enzimática.

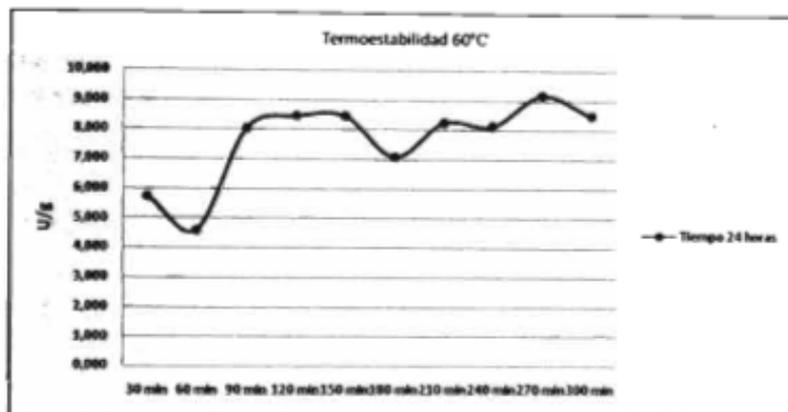


Fig. 29. Termoestabilidad a 60°C para la FES 1

En la FES 2, la actividad de pectinasa disminuyó a 7,99 U, siguiendo el pH en 6.5, con la diferencia de que se presenta este valor a 24 horas de fermentación, la temperatura óptima es a 50°C con 3,22 U y la termoestabilidad a 60°C de la reacción es en 270 min con 8,69 U. Para la FES 3 los resultados presentan uniformidad en cuanto al tiempo de fermentación de 24 horas, teniendo los valores máximos de la cinética, a pH 6.5 con 48,12 U, temperatura óptima de 50°C con 52,62 U, siendo la termoestabilidad a 60°C y a los 120 min en donde se presenta la mayor actividad con 27,73 U.

Se continúa con la presencia de mayor actividad en 24 horas de la cinética enzimática, en la FES 4, los valores máximos obtenidos son a pH 6.5 con 57,24 U, temperatura óptima de 35°C con 61,72 U/g y una estabilidad térmica en 60°C a los 120 min, con 33,90 U. valores similares se encontraron en la FES 5, en donde los valores máximos se encontraron a las 24 horas montada la cinética, a pH de 6.5 con 62,09 U, temperatura óptima de 35°C con 44,35 U y la estabilidad térmica fué de 60°C a los 120 min con 38,53 U.

En la Figura 30, se muestran la actividad de pectinasa para el pH de 6.5, el cual, es el pH en donde todas las cinéticas enzimáticas presentaron su máxima actividad de pectinasa.

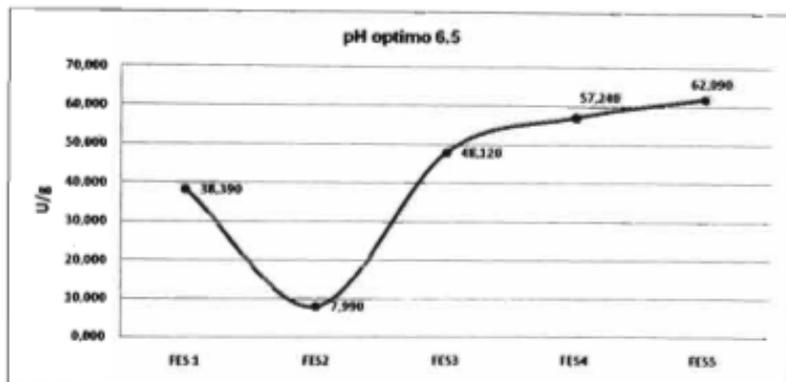


Fig.30. pH óptimo de cinéticas de Fermentación

De estos resultados mencionados anteriormente se toman como las mejores cinéticas de producción de pectinasa la FES 4 y FES 5. Existen reportes de investigadores que han estudiado la producción de diferentes enzimas pectinolíticas, así como la utilización de diferentes desechos agroindustriales, así como el microorganismo productor de las enzimas. Estos reportes se muestran a continuación:

Nagai y cols. (2000), reportaron una producción de enzima endopoligalacturonasa de 487 U/mg, en un pH óptimo de 5.0, temperatura óptima de 40°C, incubándose a 30 °C por 12 horas *Aspergillus awamori* en medio de soya. **Blandino y cols** (2002), obtuvieron 20-25 U/g de pectinasas utilizando *Aspergillus awamori*, en salvado de trigo.

Patil y Dayanand (2006b), observaron un incremento gradual de endopectinasa dando valores que van desde los 5.1 U/g a 17.1 U/g, utilizando cascarilla de girasol a pH de 5.0 y *Aspergillus niger* como productor de pectinasas, siendo a las 96 horas cuando se presentó el máximo valor de 17.1

U/g en FES. También (2006a), demostraron que el pH 5.0 y temperatura de 34°C, eran óptimos para la producción máxima de endo y exopectinasas en cáscara de girasol, tanto en condiciones del estado sólido como en sumergido.

Silva y cols. (2002), obtuvieron el valor de actividad máximo de poligalacturonasa (Pg) (30 U/g), usando el salvado de trigo como la fuente de carbono. También utilizaron bagazo de naranja obteniendo el máximo de valor de pectina liasa de 2000 U/g. Al combinar desechos como bagazo de naranja y salvado de trigo, aumentaron la producción de Pg a 55 U/g, en un pH de 5.0 y temperatura de 55°C, siendo estable a 40°C durante 60 min, y PI de 3540 U/g, alcanzado esta actividad a pH de 10.5 y temperatura de 50°C, siendo estable a 35°C durante 60 min.

Xia y cols. (2009) en un experimento de fermentación reveló que el *Aspergillus niger*, produjo protopectinasa 106,17 U/g a las 36 horas, en una condición de fermentación de 35°C, pH de 5. La producción de pectina en la condición óptima es el 24.5 %, tan alta como la producción de otros métodos físicos y químicos hasta ahora descritos.

Jayani y cols. (2005), reportaron que, la poligalacturonasa purificada producida por *Streptomyces lydicus* expuso la actividad máxima en el pH 6.0 y la temperatura 50°C. (Jayani et al., 2005). **Kumar y cols.** (2010), optimizaron un medio compuesto de cáscara de mango, peptona, NH₄NO₃, MgSO₄, ZnSO₄ y KH₂PO₄, en el cual el rendimiento de la producción de poligalacturonasa por *F. moliniforme* fue de 43,2 U/g, a una temperatura de 30°C y pH a 4.5.

Fawzi (2009), demostró que la pectina liasa purificada de FES, utilizando como sustrato lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) y como productor de pectina liasa *Penicillium velutinum* expresaba su actividad máxima en 50 °C y pH de 5.5, mostrando estabilidad buena en la gama de pH de 5.5 a 6.0 y su punto de temperatura era de 65°C después de 45 min.

Estos resultados de los investigadores nos dan la pauta para poder optimizar el medio de fermentación sólida, así como aplicar las mejores

condiciones físicas y químicas para poder aumentar más la actividad de pectinasa por este sustrato utilizado.

También tomamos como referencia algunos reportes de investigadores que estudiaron otras enzimas pero utilizando el bagazo de caña como sustrato. **Rodríguez y cols.** (2006), reportaron la actividad de lipasa producida por *Rh. homothallicus* utilizando bagazo de caña y adicionando C y N como oligoelementos en FES, fue de 826 U/g en 12 de incubación. **Solórzano y Pereira** (2002) reportaron, la obtención de endoxilanas (100 U/ml y betaxilosidasa (3.5 U/ml), utilizando bagazo de caña como principal fuente de carbono en el tratamiento por FES, encontrando estos valores a un pH de 5.0 y una temperatura óptima de 60 °C para la endoxilanas y pH de 5.0 y temperatura de 55 °C para la betaxilosidasa.

Capítulo 5. Conclusiones

Una manera de aprovechar los esquilmos de mango en Nayarit, es aplicando un proceso de lavado, extruido y aplicando un tratamiento térmico de secado de bajo costo de implementación, tal es el caso de la obtención de pellets de cáscara de mango.

La cáscara y hueso de mango que componen los esquilmos, requieren procesos de separación mecánica para poder utilizarlos de manera independiente, debido a que esta separación es tardada y se requieren varias personas para poder separar grandes cantidades de esquilmos, sin embargo, deben desarrollarse equipos de alta capacidad, que permitan altos volúmenes de separación.

El método desarrollado en este proyecto, para la obtención de extrudidos de cáscara de mango, permitió la obtención de un producto estable por tres meses, almacenado a temperatura ambiente, y con un alto nivel de aceptación sensorial en las especies en las cuales se realizaron las pruebas de palatabilidad. Para generar una estabilidad de 2 años y dar por consiguiente un valor agregado a los pellets, se tendría que optimizar el proceso.

La caracterización proximal de los principales constituyentes de los extrudidos de cáscara de mango señaló que este producto es superior a numerosos forrajes que actualmente se comercializan como: los de caña, avena, algodón, chicharo, cebada, salvado de arroz, de maíz o cáscara de cacao. Así mismo por su alto contenido en carbohidratos simples, sin contar fibra, los extrudidos de cáscara de mango resultaron similares al forraje de papa o de harina de yuca.

El método desarrollado en este proyecto, para la obtención de extrudidos de cáscara de mango es un método que puede ser implementado fácilmente, con maquinaria económica y de uso generalizado, y con relativos bajos costos de proceso. Los pellets de cáscara de mango son una alternativa, para la obtención

de enzimas de interés alimenticia, obteniendo a partir de ellos enzimas pectinolíticas, aplicación con en la industria forrajera, como ingrediente en la alimentación de ganado, o bien, como ingrediente en la fabricación de harinas.

Con respecto a la obtención de enzimas, los pellets y el Bagazo de caña de azúcar, utilizados como fuente de carbono para el hongo *Aspergillus awamori* en fermentación en Estado sólido, permiten obtener extractos crudos que al caracterizarlos bioquímicamente presentan actividad de pectinasa.

De las fermentaciones en Estado sólido realizadas, una vez caracterizados el tiempo de la cinéticas es de 24 horas como máxima producción de actividad, continuadas las cinéticas no se genera mayor actividad. El pH óptimo es de 6.5, para todas las fermentaciones. La temperatura óptima es de 35°C y la estabilidad de la actividad enzimática se encuentra en los 120 min.

La fermentación que en la cual se tienen mayores actividades es la Fermentación en Estado sólido 5, que estaba constituida bagazo de caña y pellet de cáscara de mango lavada y secada a 70°C, en proporción de columna de 50-50%, en una temperatura de incubación de 30°C, humedad del 75 % y cantidad de sustrato por columna de 110 g y una inoculación de esporas de 1.59×10^7 esporas por ml.

5.1 Perspectivas

El proceso anteriormente usado en el proyecto sirve como base o antecedente para poder optimizar la obtención de pellets, para efectos de obtener mayor cantidad de actividad enzimática con respecto a las pectinasas, es necesario partir desde el proceso de formación de los pellets, optimizando la separación de los esquilmos de mango, aplicarles algún método para disminuir la cantidad de azúcares presentes en los pellets. Disminuir el porcentaje de humedad hasta 5%, lo que facilitaría la molienda y tamizado de los pellets para obtener el tamaño de partícula necesaria para la fermentación. Cada una de estas mejoras a realizar, se enfocarían para futuros trabajos de investigación en la producción de enzimas a partir de este importante esquimo.

Este proyecto de aprovechamiento de los esquilmos industriales de Nayarit, abre un panorama complejo para la producción de enzimas, con estos resultados preliminares, se pueden modificar las condiciones de fermentación, la utilización de cáscara de diferentes variedades de mango, utilizar diferentes hongos productores de enzimas, combinar porcentajes de sustratos, utilizar diferentes temperaturas de incubación, así como comparar las producción de enzimas con las fomentaciones en estado sólido y sumergido.

Otra perspectiva es la diseñar, crear un fermentador es medio sólido por columnas que permita llevarse a cabo la producción de enzimas a nivel piloto, y así poder escalar a nivel industrial.

El proceso de formación de pellets y de fermentación en estado sólido, llevados a nivel piloto e industrial, con implementación de estos procesos a bajo costo, el costo-beneficio de los productos de estos procesos es la alternativa de aprovechamiento de los esquilmos industriales generados en Nayarit.

Capítulo 6. Literatura Citada

- ☞ Acuña-Argüelles, M., M. Gutiérrez-Rojas, G. Viniegra-González and E. Favela-Torres, 1994. Effect of water activity on exo-pectinase production by *Aspergillus niger* CH4 on solid state fermentation. *Biotechnol. Let.*, 16: 23-28.
- ☞ Acuña-Argüelles, M.E.; Gutiérrez-Rojas, M.; Viniegra-González, G.; Favela-Torres, E. (1995) Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solidstate fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 48:808-814
- ☞ Aguilar, C.N., A. Aguilera-Carbó, J.C. Contreras- Esquivel, A.R. Vidal and H. De La Garza-Toledo. (1996). Effect of the in situ activation of pectinmethylesterase on changes of color and texture of fried potatoes strips. *Iberoam. Applied Biotechnol. CIIDIR*, 3: 7-14.
- ☞ Aguilar, C.N., C. Augur, E. Favela-Torres and G. Viniegra-González, 2001. Induction and repression patterns of fungal tannase in solid-state and submerged cultures. *Process Biochem.*, 36: 565-570.
- ☞ Aguilar, C.N., J.C. Contreras-Esquivel, E. Favela-Torres, 2002. Production of pectinase. In: *Concise Encyclopedia on Bioresource Technology*. Humana Press.
- ☞ Aguilera-Carbó, A.F., J.C. Montañez, A. Anzaldúa-Morales, M.L. Reyes, J.C. Contreras-Esquivel and C.N. Aguilar, 1999. Improvement of color and limpness of fried fries potatoes by in situ pectinesterase activation. *Eur. Food Res. Technol.*, 210: 49-52.
- ☞ Aikorta, I., Garbisu, C., Llama, M. J. and Serra, J. L. (1998). Industrial applications of pectic enzymes: A review. *Process Biochemistry* 33, 21-28.
- ☞ Ashokkumar, B., Kayaivizhi, n. and Gunasekaran, P. 2001. Optimization of media for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. *Process Biochem.* 37: 331-338.
- ☞ Badui, S., 1996. *Chemistry of the Foods*. Ed. Mexican Alhambra. México, pp: 281-326.
- ☞ BeMiller, J. N. (1986). *An introduction to pectins: structure and properties*. Fishman, M. L. and Jen, J. J. (eds.). *Chemistry and Fuction of pectins*. Washington (DC): American Chemical Biely, P.;
- ☞ Bernardini N., Knodler M., Schieber A., Carle R., (2005). Utilization of mango peels as a source of pectin and polyphenolics. *Innov Food Sci Emerg Technol* 6:442-452.
- ☞ Berovic, M. and H. Ostrovernik, 1997. Production of *Aspergillus niger* pectolytic enzymes by solid state bioprocessing of apple pomace. *J. Biotechnol.*, 53: 47-53.

- ☒ Blandino, A., Iqbalsyah, T., Pandiella, S. S., Cantero, D., Webb, C., (2002). Polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* on wheat in solid-state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 164-169.
- ☒ Bonnin, E.; Renard, C.; Thibault, J.-F.; Ducroo, P. (1997) Les enzymes de dégradation des parois végétales: mode d'action et utilisations alimentaires. Dan: *Enzymes an Aggro-Alimentaire*. Laneta- Gya, V. (Ed.). Tech et Doc Lavoisier. Paris. pp.167-200.
- ☒ Society, 2-12.
- ☒ Brown, I. E., Mailen, M. H., Charnock, S. J., Davies, G. J. and Black, G. w. (2001). Pectate lyase 10A from *Pseudomonas cellulosa* is a modular enzyme containing a family 2a carbohydrate-binding module. *Biochemical Journal* 355, 155-165.
- ☒ Bruhlmann, F., Kim, K. S., Zimmerman, W. y Fiechter, a. (1994). Pectinolytic enzymes from actinomycetes for the degumming of ramie bast fibers. *Applied and Environmental Microbiology.* 60, 2107-2112.
- ☒ Budiatman, S. and B.K. Lonsane. 1987. Cassava fibrous waste residue: A substitute to wheat bran in solid state fermentation. *Biotechnol. Lett.*, 9: 597-600.
- ☒ Castilho, L.R., Polato, C.M.S., Baruque, E.A., Sant'Anna Jr, G.L. & Freire, D.M.G. (2000). Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. *Biochem. Eng. J.* 4, 239-247
- ☒ Cavalitto, S.F.; Arcas, J.A.; Hours, R.A. (1996) Pectinase production profile of *Aspergillus foetidus* in solid state cultures at different acidities. *Biotechnology Letters*, 18:251-256.
- ☒ Chávez, S.Ns., H. De La Garza-Toledo, A. Aguilera-Carbó, J.C. Montañez-Sáenz, J.C. Contreras-Esquivel and C.N. Aguilar. 1998. Effect of not ordinary blanchings on physicochemical and microbiological quality of fried potato strips. *Ind. Alimen.*, 20: 19-22.
- ☒ Cheetham, P. S. J. (1985) Aplicación de las enzimas en la industria. Wiseman, A. (ed.) *Manual de Biotecnología de las Enzimas*. Acribia. España. 269-368.
- ☒ Chundakkadu Krishna (2005); Solid-State Fermentation systems—An overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, Vol. 25, No. 1-2, pages 1-30.
- ☒ Contreras-Esquivel, J.C., R.A. Hours, C.N. Aguilar, M.L. Reyes-Vega and J. Romero. 1997. Microbial and enzymatic extraction of pectin: A review. *Arch. Latinoamer. Nutr.*, 47: 208-216.
- ☒ Couri, S. and A.X. Farias. 1995. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. *Rev. Microbiol.*, 26: 314-317.
- ☒ Couto, S. R., and Sanromán, M. A. (2006). Application of solid-state fermentation to food industry: A Review. *J. Food Eng.* 76, 291-302.

- ☞ Daas, P. J. H., Meyer-Hansen, K., Schols, H. A., De Ruiter, G. A. and Voragen, A. G. J. (1999). Investigation of the non-esterified galacturonic acid distribution in pectin with endopolygalacturonase. *Carbohydrate Research* 318, 135-145.
- ☞ Darvill, A., McNeil, M., Albersheim, P. and Delmer, D. P. The primary cell walls of flowering plants. Stumpf, P. K. and Conn, E. E. (eds.). *The Biochemistry of Plants*. San Diego (Calif.): Academic Press, (1980), Vol I, 91-161.
- ☞ de Vries, R. P. and Visser, J. (2001). *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 65, 497-522.
- ☞ de Vries, R. P.; Visser, J. ; de Graaff, L.H. (1999). A modulates the XlnR induced expression on xylose of *Aspergillus niger* genes involved in xylan degradation. *Research in Microbiology*, 150:281-285.
- ☞ Dhillon, S. S., Gill, R. K., Gill, S. S., and Singh, M. (2004). Studies on the utilization of citrus peel for pectinase production using fungus *Aspergillus niger*. *Inter. J. Environ.* 61, 190-210.
- ☞ Diaz-Godínez G., Soriano-Santos J., Augur C., Viniestra-González G., (2001) Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid state and submerged fermentation: a comparative study. *J Ind Microbiol Biotechnol* 26:271-275.
- ☞ Dien B. S., Cotta M. A., Jeffries T. W. 2003. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 258-266.
- ☞ Domínguez, A., Costas, M., Longo, M.A. & Sanroman, A. (2003). A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol Lett* 25, 1225-1229
- ☞ ELLEIAH, P., ADINARAYANA, K., BHAVANI, Y., PADJAMA, P. & SRINIVASULU, B. 2002. Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species. *Process Biochem.* 38: 615-620.
- ☞ Favela-Torres, E., J. Córdova-López, M. García- Rivero and M. Gutiérrez-Rojas, 1998. Kinetics of growth of *Aspergillus niger* during submerged, agar surface and solid state fermentations. *Process Biochem.*, 33: 103-107.
- ☞ Favela-Torres, E., S. Huerta, S. Roussos and M. Gutiérrez-Rojas, 1989. International Seminar on biotechnology in coffee agroindustry, Roussos, S., R. Licona and M. Gutiérrez-Rojas, (Eds.). Jalapa, to See, Mexico, pp: 145-155.
- ☞ Fawzi Eman M. (2009). Purification and characterization of the pectin lyase and protease producidos por *Penicillium velutinum* grown on *eichhornia crassipes* under solid state fermentation. *Annals of Microbiology* 59, 755-761.

- ☞ Freitas, P. M., Martín, N., Silva, D., da Silva, R., and Gomes, E. (2006). Production and partial characterization of polygalacturonases produced by thermophilic *Monascus* sp. N8 y by thermotolerant *Aspergillus* sp. N12 on Solid-state fermentation. *Braz. J. Microbiol.* 37, 302-306.
- ☞ Fonseca, M.J.V.; Said, S.; The pectinase produced by *Tubercularia vulgaris* in submerged culture using pectin or orange-pulp pellets as inducer. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 42: 32-35, 1994.
- ☞ Galiotou-Panayotou, M.; Rodis, P.; Kapantai, M. Enhanced polygalacturonase production by *Aspergillus niger* NRRL-364 grown on supplemented citrus pectin. *Let. Appl. Microbiol.*, 17: 145-148, 1993.
- ☞ Garza, Y.G., M.G. Rodríguez, C.L. Hernández y J.M. Rodríguez, 2000. Optimization of aspartate ammonia lyase production by *Bacillus cereus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 25: 225-228.
- ☞ Garzon, C.G. and R.A. Hours, 1992. Citrus waste: An alternative substrate for pectinase production in solid-state culture. *Bioresource Technol.*, 39: 93-95.
- ☞ George, S., V. Raju, V. Subramanian and K. Jayaraman, 1997. Comparative study of protease production in solid substrate fermentation versus submerged fermentation. *Bioprocess Eng.*, 16: 381-382.
- ☞ Gerharts, W. (1990). Industrial uses of enzymes. *Enzymes in Industry. Production and Applications.* Weinheim: VCH, 77-149.
- ☞ Ghildyal, N.P., S.V. Ramakrishna, P.N. Devi, B.K. Lonsane and H.N. Asthana, 1981. Large scale production of pectolytic enzyme by solid state fermentation. *J. Food Sci. Technol.*, 18: 248-51.
- ☞ Giridhari L, Siddappa GS, Tyon GL (1998) Preservation of fruits and vegetables. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi, pp 265-272
- ☞ Guevara, M. A., González-Jaen, M. T. and Estévez, P. (1997). Multiple forms of pectic lyases and polygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*: regulation of their synthesis by galacturónico acid. *Canadian Journal of Microbiology.* 43, 245-253.
- ☞ Guimaraes CM, Gíao MS, Martínez SS, Pintado AI, Pintado ME, Bento LS, Malcata FX (2007) Antioxidant activity of sugar molasses, including protective effect against DNA oxidative damage. *J Food Sci* 72:C39-C43.
- ☞ Falony G., Coca Armas, JulioC. Dustet Mendoza and José L. Martínez Hernández. 2006. Production of extracellular lipase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation. 44: 235-240.

- ☒ Hag, I., Idrees, S. & Rajoka, (2002). M.I. Production of lipases by *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. *Process Biochem* 37, 637-641
- ☒ Henriksson, G., Akin D. E., Hanlin, R. T., Rodriguez, C., Archibald D. D., Rigsby, L. L. and Eriksson, K. E. E. (1997). Identification and retting efficiencies of fungi isolated from dew-retted flax in the Unites States and Europe. *Applied and Environmental Microbiology*. 63, 3950-3956.
- ☒ Heredia, A., Jiménez, A. and Guillén, R. (1995). Composition of plant cell wall. *Zeitschrift fur lebensmittel-untersuchung und-forschung*. 200, 24-31.
- ☒ Hesseltine, C.W., 1977. Solid-state fermentation. *Process Biochem.*, 12: 22-24.
- ☒ Holker, U., Hofer, M. & Lenz, J. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* , 64, 175-186
- ☒ Hoonchal, G. S., Twari, R. P., Tewari, R., Dahiya, N. and Beg, Q. K. (2002). Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: A review. *Applied Microbiology and Biotechnology*.59, 409-416.
- ☒ Horikoshi, K. (1999). Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 63, 735-750.
- ☒ Hours, R.A., C.E. Voget and R.J. Ertola, 1988a. Apple pomace as raw material for pectinases production in solid state culture. *Biological Wastes*, 23: 221-226.
- ☒ Hours, R.A., C.E. Voget and R.J. Ertola, 1988b. Some factors affecting pectinase production from apple pomace in solid-state cultures. *Biological Wastes.*, 24: 147-157.
- ☒ Huerta, S., E. Favela, R. López-Ulibarri, A. Fonseca, G. Viniestra-González and M. Gutiérrez-Rojas, 1994. Adsorbed substrate fermentation for pectinase production with *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Tech.*, 8: 837-842.
- ☒ Hugouvieux-Cotta-Pattat, N., Condemine, G., Nasser, W. and Reverchon, S. (1996). Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annual review of Microbiology*. 50, 213-257.
- ☒ Ingram L. O., Gomez P.F., Lai X., Moniruzzaman M., Wood B. E., Yomano L. P., York S. W. 1998. Metabolic engineering of bacteria for ethanol production. *Biotechnol. Bioeng* 58: 204-214.
- ☒ Jarvis, M. C., Forsyth, W. and Duncan, H. J. (1998). A survey of the pectic content of nonignified monocot cell walls. *Plant Physiology*. 88, 309-314.
- ☒ Jayani, R.S., Saxena, S., Gupta, R., 2005. Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochem*. 40, 2931-2944.
- ☒ Joshi VK, Mukesh P, Neerja SR (2006) Pectin esterase production from apple pomace in solid-state and submerged fermentations. *Food Technol Biotechnol* 44:253-256

- ☞ Kapoor M, Kuhad RC (2002) Improved polygalacturonase production from *Bacillus* sp. MG-cp-2 under submerged (SmF) and solid state (SSF) fermentation. *Lett Appl Microbiol* 34:317-322
- ☞ Kashyap, Dr. Vohra, P. K., Chopra, s. and Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: A review. *Bioresource Technology*. 77, 215-227.
- ☞ Kashyap DR, Soni SK, Tewari R (2003) Enhanced production of pectinase by *Bacillus* sp. DT7 using solid state fermentation. *Bioresour Technol* 88:251-254.
- ☞ Kilara, A. (1982). Enzymes and their uses in the processed apple industry. A Review. *Process Biochemistry*. 17, 35-41.
- ☞ Kozianowski, G., Canganella, F., Rainey, F. A., Hippe, H. and Antranikian, G. (1997). Purification and characterization of thermostable pectate-lyases from a newly isolated thermophilic bacterium, *Thermoanaerobacter italicus* sp. nov. *Extremophiles* 1, 171-182.
- ☞ Kravtchenko, T. P., Voragen, A. G. J. and Pilnik, W. (1992). Analytical comparison of three industrial pectin preparations. *Carbohydrate Polymers*. 18, 17-25.
- ☞ Kumar YS, Prakasam RS, Reddy OVS (2009) Optimization of fermentation conditions for mango (*Mangifera indica* L.) wine production by employing response surface methodology. *Int J Food Sci Technol* 44:2320-2327.
- ☞ Kumar Y. S., Varakumar S. and Reddy O. V. S., (2010). Production and optimization of polygalacturonase from mango (*Mangifera indica* L.) peel using *Fusarium moniliforme* in solid state fermentation.
- ☞ Lang C, Domenburg H (2000) Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. *Appl Microbiol Biotechnol* 53:366-375.
- ☞ Larrauri, J.A. Rupérez, P., Borroto, B., and Saura-Calixto, F. (1996). Mango peel as a new tropical fibre: preparation and characterization. *Lebensm. Wiss. U. Technol.* 29, 729-733.
- ☞ Laukevics, J.J., A.F. Apsite, U.E. Viesturs and R. Tengerdy, 1984. Solid substrate fermentation of wheat straw to fungal protein. *Biotechnol. Bioeng.*, 26: 1465-1474.
- ☞ Lekha, P.K. and B.K. Lonsane, 1994. Comparative titres, location and properties of tannin acyl hydrolase produced by *Aspergillus niger* PKL104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations. *Proceeding Biochem*, 29: 497-503.
- ☞ Maldonado, M.C. and A.M. Strasser Of Saad, 1998. Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 20: 34-38.
- ☞ Maldonado, M.C., A. Navarro and D.A.S. Callieri, 1986. Production of pectinases by *Aspergillus* sp. using differently pretreated lemon peel as the carbon source. *Biotechnol. Lett.*, 8: 501-504.

- ☞ Martínez A., Rodríguez M. E., York S. W., Preston J. F., Ingram L. O. 2000. Effects of Ca(OH)₂ treatments (overliming) on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysate. *Biotechnol. Bioeng.* 69: 526-536.
- ☞ Mejía, A., J. Barrios-González and G. Viniegra- González, 1998. Overproduction of rifamycin B by *Amycolatopsis mediterranei* and its relationship with the toxic effect of barbital on growth. *J. Antibiotics*, 51: 58-63.
- ☞ Mitchell, D.A.; Do, D.D.; Greenfield, P.F.; Doelle, H.W. A semimechanistic mathematical model for growth of *Rhizopus oligosporus* in a model solid-state fermentation system. *Biotechnol. Bioeng.*, 38: 353-362, 1991.
- ☞ Mitchell, D.A.; Krieger, N.; Stuart, D.M.; Pandey, A. New developments in solid-state fermentation. II. Rotational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. *Process. Biochem.*, 35: 1211-1225, 2000.
- ☞ Moo-Young, M., A. Moreira y R. Tengerdy, 1983. Principles of solid state fermentation. In: *Fungal Biotechnology*, Smith, J., D. Berry and B. Kristiansen (Eds.). Edward Arnold Publishers, London, pp: 117-144.
- ☞ Mudgett, R., 1986. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Demain, A. and N. Solomon (Eds.). American Society for Microbiology, Washington, AD., pp: 66-83.
- ☞ MULJMANI, V.H. & RAMALINGAM, G.N.P. 2000. α -Amylase production by solid state fermentation: a new practical approach to biotechnology courses. *Biochem. Educ.* 28: 161-163.
- ☞ MURADO, M.A., GONZALES, M.P., TORRADO, A. & PASTRAN, L.M. 1997. Amylase production by solid state culture of *Aspergillus oryzae* on polyurethane foams: some mechanistic approaches from an empirical model. *Process Biochem.* 32: 35- 42.
- ☞ Naidu, G. S. N. and Pandey, T. (1998). Production of pectolytic enzymes. A Review. *Bioprocess Engineering.* 19, 355-361.
- ☞ Nair SR, Rakshit SK, Panda T (2004) Effect of carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus*. *Bioprocess Biosys Eng* 13:37-40.
- ☞ Nagai M., Katsuragi T., Terashita T., Yoshikawa K. and Sakai T. (2000). Purification and Characterization of an Endo-Polygalacturonase from *Aspergillus awamori*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64, 1729-1732.
- ☞ Najafpour G. (2007). *Biochemical Engineering and biotechnology*, Elsevier. Impreso en Holya. ISBN-13:978-0-444-52845-2

- ☐ Ooijkaas, L.; Weber, F.J.; Buitelaar, R.M.; Tramper, J.; Rinzema, A. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *Trends Biotechnol.*, 18: 356-360, 2000.
- ☐ Oriol, E.; Schettino, B.; Viniestra-Gonzales, G.; Raimbaut, M. Solidstate culture of *Aspergillus niger* on support. *J. Ferment. Technol.*, 66: 57-62, 1988.
- ☐ Palma, M.B., A.L. Pinto, A.K. Gombert, K.H. Seitz, L.R. Castilho and D.M.G. Freire, 2000. Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate. *Applied Biochem. Biotechnol.*, 84/86: 1137-1145.
- ☐ Pandey A., (1992). Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochemistry* 27
- ☐ Pandey A. (1994). Solid-state Fermentation, In- *Solid-state Fermentation*, Pandey A (ed), Wiley Eastern, New Delhi, pp 3-10.
- ☐ Pandey A. (2003). Solid-state fermentation, *Biochemical Engineering Journal*, 14, 81-84
- ☐ Pandey A, and Soccol C. R., (1998). Bioconversion of biomass: A case study of lingo-cellulosics bioconversions in solid-state fermentation, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 41,379-390.
- ☐ Pandey A, and Soccol C.R., (2000). Economic utilization of crop residues for value addition - A futuristic approach, *Journal of Scientific and Industrial Research*, 59, 12-22.
- ☐ Pandey A., Ashakumary L, and Selvakumar P., (1995). Copra waste- A novel substrate for solid-state fermentation, *Bioresource Technology*. 51, 217-220.
- ☐ PANDEY, A., NIGAM, P., SOCCOL, C.R., SOCCOL, V.T., SINGH, D. & MOHAN, R. 2000a. Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31: 135-152.
- ☐ Pandey A., Selvakumar P., Soccol C. R., and Nigam P., (1999). Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes, *Current Sciences*, 77, 149-162.
- ☐ Pandey A., Soccol C. R., and Mitchell D., (2000b). New developments in solid-state fermentation. I bioprocesses and products, *Process Biochemistry*. 35, 1153-1169.
- ☐ Pandey A., Soccol C. R., Nigam P., and Soccol V. T., (2000c). Biotechnological potential of agroindustrial residues: I Sugarcane bagasse, *Bioresource Technology*. 74, 69-80.
- ☐ Pandey A., Soccol C. R., Nigam P., Soccol V. T., Vyenberge L. P. S., and Mohan R., (2000d). Biotechnological potential of agro-industrial residues: II Cassava bagasse. *Bioresource Technology*, 74, 81-87.
- ☐ Patil RS, Dayany A (2006a) Optimization of process for the production of fungal pectinase from deseeded sunflower head in submerged y solid state conditions. *Bioresour Technol* 97:2340-2344.

- ca Patil, S.R. and Dayanand A. (2006b). Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions. *Bioresource Technology*, 97, 2054-2058.
- ca Pereira SS, Torres FE, Gonzalez GV, Rojas MG (1993) Effect of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* on submerged and solid state fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 39:36-41.
- ca Pérez, S., Mazeau, K. and Du Penhoat, C. H. (2000). The Three dimensional structures of the pectic polysaccharides. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38, 37-45.
- ca Pilnik, W. and Voragen, A.G.J. (1993) Pectic enzymes in fruit and vegetable juice manufacture. In: *Enzymes in Food Processing*, pp: 363-399.
- ca Raghavarao, Ranganathan, Karanth. 2003. Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochem Eng. Journal*, Vol (13):127-135.
- ca RAHARDJO, V.S.P., WEBER, F.J., HAEMERS, S., TRAMPER, J. & RINZEMA, A. 2005. Aerial mycelia of *Aspergillus oryzae* accelerate α -amylase production in a model solid-state fermentation system. *Enzyme Microb. Technol.* 38: 900-902.
- ca Ramesh, M.V. and B.K. Lonsane. 1991. Ability of to solid state fermentation technique to significantly minimize catabolic repression of α -amylase production by *Bacillus licheniformis* M27. *Applied Microbiol. Biotechnol.*, 35: 591-593.
- ca Rao Narsimha M (1996) Pectinases from molds: their production, purification, characterizations and applications. Ph.D. Thesis University of Pune, India
- ca Rimbault, M., 1998. General and microbiological aspects of solid state fermentation. *Electronic J. Biotechnol.*, 1: 3-21.
- ca Rimbault, M. and Alazardd., 1990. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *Eur. J. Applied Microbiol. Biotechnol.*, 9: 199-209.
- ca Rees, D. A., Morris, e. R., Thom, D. and Madden, J. K. (1982). Shapes and interactions of carbohydrate chains. Aspinall, G. O. (ed.). *Polysaccharides*. Nueva York: academic Press. 195-200.
- ca Reid, I. and Ricard, M. (2000). Pectinase in papermaking: solving retention probes in mechanical pulps bleached with hydrogen peroxide. *Enzyme and Microbial technology* 26, 115-123.
- ca Revista Claridades Agropecuarias: La política agropecuaria en México; Escenarios de la agricultura Mexicana. ASCA-SAGARPA, Julio del 2006. 33-40.
- ca Rodríguez J.A., Mateos J.C., Nungaray J., González V., Bhagnagar T., Roussos S., Córdova J. and Baratti J., (2006). Improving lipase production by nutrient source modification using

- Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. *Process Biochemistry* 41, 2264-2269.
- ☞ Rosales E, Couto S, E and Sanroman M. A. (2005). Reutilization of food processing wastes for production of relevant metabolites: application to laccase production by *Trametes hirsute*, *Journal of Food Engineering*, 66, 419-423.
- ☞ Ruijter, G.J.G.; Visser, J. (1997) Carbon repression in *Aspergilli* (minireview). *FEMS. Microbiol. Lett.* 151:103-114.
- ☞ SAGARPA, (2009). Superficie sembrada and cosechada volumen y valor de producción agrícola por tipo de cultivo y principales cultivos, Nayarit.
- ☞ Sakai, T., Sakamoto, t., Hallaert, J. and Vyamme, E. J. (1993). Pectin, Pectinase and protopectinase: production, properties, and applications. *Advances in applied Microbiology* 39, 213-294.
- ☞ Salazar, L. and Jayasinghe, U. (1999). Fundamental of purification of plant viruses. *Techniques in plant virology*. Perú: CIP training Manual 5.0, Virus purification, Internal potato center, 1-10.
- ☞ Sanzo, A.; Hassan, S.D.M.; Costa, J.A.; Bertolin, T.E. (2001) Enhanced glucoamylase production in semicontinuous solid state cultivation of *Aspergillus niger* NRRL 3122. *Ciência & Engenharia*, 10:59-62.
- ☞ Sawada, K., Suzumatsu, A., Kobayashi, T. and Ito, s. (2001). Molecular cloning y sequencing of the gene encoding an exopolysaccharuronase of a *Bacillus* isolate and properties of its recombinant enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1568, 162-170.
- ☞ Schols H.A. and A.G.J. Voragen, 1996. Complex pectins: Structure elucidation using enzymes. *Proceedings of an international symposium on Pectins y Pectinases*, DEC. 3-5, Wageningen, the Netherlys, pp: 990.
- ☞ Serra, J. L., Alkorta, I., Llama, M. J. and Alaña, A. (1992). Aplicación industrial de las enzimas pécicas. Producción, purificación, inmovilización and algunas propiedades de la pectina lisa de *Penibacillum italicum*. *Alimentación. Equipos y tecnología*. 11, 127-134.
- ☞ Shary-Bagnon, V., P. Lozano, G. Saucedo- Castañeda and S. Roussos. 2000. Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* in liquid and solid state cultures. *Process Biochem.* 36: 103-109.
- ☞ Siessere V, Said S (1989) Pectic enzymes production in solid-state fermentation using citrus pulp pellets by *Talaromyces flavus*, *Tubercularia vulgaris* y *Penicillium charlessi*. *Biotechnol Lett* 11:343-344.
- ☞ Silva D., Martins E., da Silva R. and Gomes E., (2002). Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33, 318-324.

- ☞ Socol, C., B. Marin, M. Rimbault and J. Lebeault, 1994. Breeding and growth of *Rhizopus* in raw cassava by solid state fermentation. *Applied Microbiol. Biotechnol.*, 41: 330-336.
- ☞ Socol, C., J.R. Leon, B. Marin, S. Roussos and M. Rimbault, 1993. Growth kinetics of *Rhizopus arrhizus* in solid state fermentation of treated cassava. *Biotechnology Techniques*, 7: 563-568.
- ☞ SODHI, H.K., SHARMA, K., GUPTA, J.K. & SONI, S.K., 2005. Production of a thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. *Process Biochem.* 40: 525-534.
- ☞ Solís-Pereira, S., Favela-Torres, E., Viniestra-Gonzales, G.; Gutierrez-Rofas, M. Effects of different carbon source on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 39: 36-41, 1993.
- ☞ Solís-Pereira, S.; Favela-Torres, E.; Gutiérrez-Rojas, M.; Roussos, S.; Saucedo-Castafeda, G.; Viniestra-González, G. (1996) Production of pectinases by *Aspergillus niger* in solid state fermentation at high initial glucose concentration. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 12:257-260.
- ☞ Srinagarajan AN, Shrikhye AJ (1976) Characterization of mango peel pectin. *J Food Sci* 42:279-280.
- ☞ Sudhakar, D.V. and Maini, S.B. (2000). Isolation and Characterization of mango pectin peel pectins. *J. Food Processing Preservation*, 24:209-227.
- ☞ Thakur, B. R., Singh, R. K. and Hya, A. K. (1997). Chemistry and uses of pectin: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 37, 47-73.
- ☞ Turquois, t., Rinaudo, M., Taravel, F. R. and Heyraud, A. (1999). Extraction of highly gelling pectic substances from sugar beet pulp and potato pulp: influence of extrinsic parameters on their gelling properties. *Food Hydrocolloids*. 13, 255-262.
- ☞ Van Buren, J. P. (1991). Function of pectin in plant tissue structure and firmness. Walter, R. H. (ed.), *The Chemistry and Technology of Pectins*. San Diego (calif.): Academic Press, Inc., 1-22.
- ☞ Viikari, L., Tenkanen, M. and Suurmakki, A. (2001). Biotechnology in the pulp and paper industry. Rehm, H. J. (ed.). *Biotechnology*. Weinheim: Wiley-VCH. Vol 10, 523-546.
- ☞ Villegas, E., S. Aubague, L. Alcantara, R. Auria and S. Revah, 1993. Solid State Fermentation: Acid protease production in controlled CO₂ and O₂ environments. *Biotechnol. Adv.*, 11: 387-397.
- ☞ Viniestra-González, G., E. Favela-Torres, C.N. Aguilar, S. Romero-Gomez, G. Diaz-Godínez and C. Augur, 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid systems. *Biochem. Eng. J.*, 13: 157-167.

- ca Voragen, A.G.J. and Pilnik, W. (1988) Pectin-degrading enzymes in fruit and vegetable processing. En *Biocatalysis in Agricultural Biotechnology*. Ed. Whitaker, J.R. and Sonnet, P.E. ACS Symp. Series 389. Washington, D.C.: Am. Chem. Soc. pp 93-114.
- ca Wubben, J.P.; ten Have, A.; van Kan, J.A.L.; Visser, J. (2000) Regulation of endopolygalacturonase gene expression in *Botrytis cinerea* by galacturonic acid, ambient pH y carbon catabolite repression. *Current Genetics*, 37:152-157.
- ca XIA Jin-lan, MENG Hao, WANG Run.min, ZHANG Cheng-gui, XIONG Jing, NIE Zhen-yuan, QIU Guan-Zhou. (2009). Identification and fermentation optimization of protopectinase-overproducing strain *Aspegillus niger* CD-01for Pectin Production. *J.Cent. South Univ. Technol.* 16:0053-0060

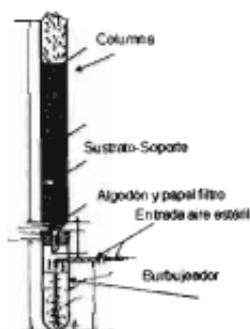
ANEXO: 1

Composición porcentual de los principales desechos agropecuarios.

DESECHOS AGRÍCOLAS	PROTEÍNA	GRASAS	FIBRA CRUDA	CENZAS	ELN
Bagazo de caña de azúcar	2.06	0.94	50.27	5.32	41.41
Bagazo maguey aguamielero	5.13	6.03	30.12	10.51	48.21
Bagazo de piña	20.98	3.66	65.88	9.28	0.00
Bagazo de destilería de uva	44.73	1.70	41.53	10.68	1.35
Bagazo de uva	7.50	15.37	26.15	8.96	41.92
Bagazo de cervocería	9.96	3.18	13.16	4.09	69.60
Cáscara de cacao	13.32	18.09	16.48	3.92	48.19
Cáscara de limón agrio	6.73	4.76	21.63	7.69	58.18
Cáscara de naranja	11.05	3.44	26.70	7.34	51.46
Cáscara de plátano	11.49	8.16	11.38	19.54	49.43
Cascarilla de algodón	6.53	1.28	65.33	2.76	24.10
Cascarilla de arroz	16.05	19.19	7.18	12.12	45.45
Cascarilla de grano de cacao	14.62	13.57	8.05	6.70	57.06
Cascarilla de café	27.61	0.62	68.93	1.61	1.22
Copa de coco	2.73	16.16	1.98	0.60	78.33
Follaje de papa	13.21	1.57	14.37	11.30	59.56
Forraje verde de avena forrajera	2.50	3.70	34.05	4.39	55.36
Forraje de orzada forrajera	3.50	1.03	45.34	16.15	33.99
Forraje de chicharo	4.30	2.20	46.59	4.59	42.32
Forraje de maíz elotero	16.75	3.97	32.35	16.98	29.94
Forraje verde de sorgo forrajero	11.96	5.98	25.19	9.96	46.89
Forraje verde de yuca	16.23	8.61	15.89	9.71	49.55
Forraje verde de ebo o veza	25.58	1.14	13.12	3.15	57.01
Harina de alfalfa	13.39	1.43	40.53	9.72	34.93
Harna de yuca	3.22	1.52	20.45	3.04	71.77
Pulpa de café	9.99	11.30	35.14	7.50	36.27
Pulpa de henequén	4.53	1.92	24.92	15.99	52.64

Pulpa de yuca	4.53	0.65	6.80	3.56	64.47
Rastrojo de maíz	4.97	6.38	40.08	5.98	42.90
Salvado de maíz	12.92	4.32	15.10	6.91	60.74
Tamo de café	10.07	2.28	27.46	8.92	51.27
Tamo de henequén	5.62	5.82	32.42	9.37	46.76
Tubérculo de yuca	2.54	3.95	2.48	2.42	88.61
Cabeza de camarón	94.38	0.09		2.41	
Gallinaza	20.79	0.65	16.49	19.00	
Harina sangre y huesos bovino	95.31	0.60	0.13	3.45	
Harina de pescado	60.20	18.14	4.09	18.61	
Polinaza	5.40	0.63	10.93	66.51	
Vacaça	9.95	3.18	13.15	4.53	

Anexo 2. Componentes principales de una Fermentación en Estado Sólido (FES)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT



SISTEMA DE BIBLIOTECAS



Anexo 3. Azúcares reductores totales presentes en pelles de cascara de mango.

Muestra	Sacarosa (g/Kg)	Glucosa (g/Kg)	Fructosa (g/Kg)
Pellet 50C extracto	2.81	0.67	1.58
Pellet 60C extracto	4.04	1.06	2.41
Pellet 70 extracto	5.72	1.7	4.02
Pellet 50C extracto lavado	—	2.68	2.75
Pellet 60C extracto lavado	0.54	5.50	7.84
Pellet 70C extracto lavado	1.61	3.86	5.94