

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

“Producción de glucosa a partir de tres concentraciones de hidrolizado alcalino de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*) tratado con celulasas comerciales y diferentes temperaturas”

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORES

Bach. Becerra Sanchez, Aaron Junior

Bach. Soria Gálvez, Manuel Eduardo

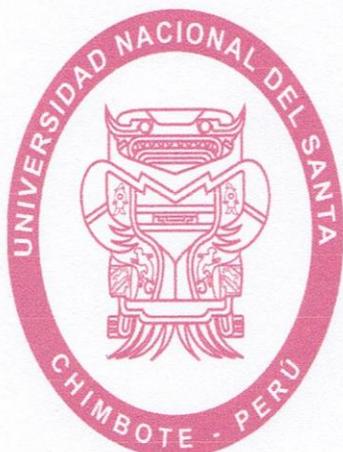
ASESOR

Ms. Villanueva Carlos, José Manuel

ID ORCID:0000-0002-5056-0001

Nuevo Chimbote - Perú, 2025

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGIA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

“Producción de glucosa a partir de tres concentraciones de hidrolizado alcalino de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*) tratado con celulasas comerciales y diferentes temperaturas”

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORES

Bach. BECERRA SANCHEZ AARON JUNIOR

Bach. SORIA GÁLVEZ MANUEL EDUARDO

REVISADO Y APROBADO POR EL ASESOR:

.....
Ms. VILLANUEVA CARLOS JOSÉ MANUEL

DNI: 32783772

ID ORCID:0000-0002-5056-0001

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGIA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

“Producción de glucosa a partir de tres concentraciones de hidrolizado alcalino de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*) tratado con celulasas comerciales y diferentes temperaturas”

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

Revisado y Aprobado por el Jurado Evaluador:

Dr. CAPA ROBLES WILLIAN ROBERT

DNI: 32969285

ID ORCID:0000-0022-3759-8128

Ms. VILLANUEVA CARLOS JOSÉ MANUEL

DNI: 32733772

ID ORCID:0000-0002-5056-0001

Dr. LECCA ZAVALA VICTOR EDUARDO

DNI: 42636735

ID ORCID:0000-0022-3759-8128

ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN DE LA TESIS

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en el Auditorio de la Facultad de Ciencias, siendo las 18:00 horas del día 19 de mayo de 2025, dando cumplimiento a la Resolución N° 478-2024-UNS-CFC, se reunió el Jurado Evaluador presidido por el Dr. Willian Robert Capa Robles, teniendo como miembros al Dr. Víctor Eduardo Lecca Zavaleta (secretario) y al Ms. José Manuel Villanueva Carlos (integrante), para la sustentación de tesis a fin de optar el título de **Licenciado en Biotecnología**, realizado por los tesisistas **Br. Aaron Junior Becerra Sánchez y Br. Manuel Eduardo Soria Gálvez**.

Los tesisistas sustentaron la tesis intitulada: "**Producción de glucosa a partir de tres concentraciones de hidrolizado alcalino de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*) tratado con celulasas comerciales y diferentes temperaturas**".

Terminada la sustentación, la tesista respondió a las preguntas formuladas por los miembros del jurado.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como **APROBADA**, asignándole un calificativo de **17 puntos**, según artículo 62° del Reglamento General de Grados y Títulos vigente (Resolución N° 337-2024-CU-R-UNS).

Siendo las 18:45 horas del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad.



.....
Dr. Willian Robert Capa Robles
Presidente



.....
Dr. Víctor Eduardo Lecca Zavaleta
Secretario



.....
Ms. José Manuel Villanueva Carlos
Integrante

Distribución: Integrantes JE (03), tesisistas (02) y archivo FC (02).



Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por Turnitin. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Jose Villanueva
Título del ejercicio: TESIS
Título de la entrega: "Producción de glucosa a partir de tres concentraciones de hid...
Nombre del archivo: AARON-MANUEL_TESIS-FINAL_2025-TURNITIN-FINAL.pdf
Tamaño del archivo: 2.91M
Total páginas: 77
Total de palabras: 14,672
Total de caracteres: 78,432
Fecha de entrega: 10-sept-2025 09:58p. m. (UTC-0500)
Identificador de la entrega: 2747597244



“Producción de glucosa a partir de tres concentraciones de hidrolizado alcalino de cáscaras de naranja (Citrus sinensis) tratado con celulasas comerciales y diferentes temperaturas”

INFORME DE ORIGINALIDAD

19%	18%	3%	7%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.uns.edu.pe Fuente de Internet	6%
2	es.scribd.com Fuente de Internet	1%
3	Submitted to Universidad Nacional del Santa Trabajo del estudiante	1%
4	repositorio.unapiquitos.edu.pe Fuente de Internet	1%
5	core.ac.uk Fuente de Internet	1%
6	dspace.esoch.edu.ec Fuente de Internet	1%
7	www.researchgate.net Fuente de Internet	1%
8	www.dspace.uce.edu.ec:8080 Fuente de Internet	<1%
9	repository.unad.edu.co Fuente de Internet	<1%
10	hdl.handle.net Fuente de Internet	<1%
11	Submitted to Universidad Nacional del Centro del Peru	<1%

DEDICATORIA

Este presente informe de tesis lo dedicamos en primer lugar a Dios que nos brinda protección, sabiduría y fortaleza para seguir cumpliendo nuestras metas trazadas, a nuestros padres por todo el apoyo y amor infinito, a nuestro asesor José Villanueva Carlos que fue nuestro guía en nuestro desarrollo académico universitario. También se lo dedicamos a nuestra familia, amigos y mentores por su apoyo incondicional, paciencia y confianza porque sin ellos hubiese sido mucho más difícil y complicado de alcanzar nuestras metas y objetivos.

AGRADECIMIENTO

Agradecer al profesor Ms. Jose Manuel Villanueva Carlos por el soporte brindado en el desarrollo brindado en la realización de la presente investigación, resaltar que siempre estuvo presente orientándonos y aclarando toda inquietud durante todo el trayecto de realización de tesis, sin su apoyo y compromiso desinteresado no hubiese sido posible culminar con el proyecto. También mencionar al profesor Dr. William Robert Capa Robles por brindarnos los laboratorios pertinentes para el desarrollo del proyecto. Por ultimo y no menos importante a los docentes, técnicos y amigos de la Escuela Profesional de Biotecnología por coadyuvar con nuestra formación académica durante nuestro trayecto universitaria.

INDICE:

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
INDICE	iii
INDICE DE TABLAS	vi
INDICE DE FIGURAS	vii
INDICE DE ANEXOS	ix
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Descripción y formulación del problema.....	3
1.2. Objetivos de la investigación.....	4
1.2.1. Objetivo general.....	4
1.2.2. Objetivos específicos.....	4
1.3. Formulación de hipótesis	4
1.4. Justificación e importancia	5
II MARCO TEÓRICO.....	6
2.1. Antecedentes	6
2.2. Marco conceptual.....	8
2.2.1. Naranja blanca (<i>citrus sinensis</i>).....	8
2.2.2. Biomasa lignocelulósica	9
2.2.3. Celulosa	10
2.2.4. Hemicelulosa	10
2.2.5. Lignina.....	11
2.2.6. Pretratamiento químico.....	12
2.2.7. Celulasa	12
2.2.8. Hidrólisis enzimática	13
2.2.9. Glucosa	14
2.2.10. Cinética Enzimática	15
III. METODOLOGÍA	16
3.1. Método	16
3.1.1. Diseño de investigación.....	16
3.1.2. Población y muestra.....	17

3.1.3. Operacionalización de variables.....	18
3.1.4. Procedimiento.....	18
3.1.4.1. Obtención y selección de cascara de naranja	19
3.1.4.2. Traslado	20
3.1.4.3. Tratamiento previo de cáscaras de naranja.....	20
3.1.4.4. Triturado y tamizado de cáscaras de naranja.....	20
3.1.5. Análisis de los parámetros físicos de las cáscaras de naranja	21
3.1.5.1. Determinación porcentual de humedad (Método AOAC 14.003)	21
3.1.5.2. Determinación porcentual de Ceniza (Método AOAC 14.006).....	22
3.1.5.3. Determinación de pH.....	23
3.1.5.4. Determinación de Sólidos Solubles (°Brix)	23
3.1.5.5. Determinación de lignina: (Método Klason).....	24
3.1.5.6. Determinación de grasas (Método Soxhlet)	24
3.2. Pretratamiento de las cáscaras de naranja con hidrólisis alcalina	24
3.3. Determinación de la enzima celulasa	26
3.3.1. Obtención de la enzima celulasa	26
3.4. Hidrólisis enzimática	27
3.5. Técnica de recolección de datos.....	29
3.5.1. Cuantificación de glucosa por método DNS	29
3.5.2. Preparación de reactivo.....	29
3.5.3. Método DNS	30
3.6. Método para recolección de datos.....	30
3.7. Análisis estadístico e interpretación de datos.....	30
3.8. Obtención de parámetros cinéticos K_m y V_{max} de Michaelis-Menten.....	31
IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
4.1. Determinación de parámetros físicos a cascara de naranja como etapa previa al pretratamiento alcalino	32
4.2. Concentración y temperatura adecuada de reacción enzimática en cascara de naranja pretratadas con enzimas celulósicas, empleando el método DNS como indicador y leído en espectrofotómetro a 505 nm	32
4.3. Análisis estadísticos.....	39
4.4. Discusión.....	42
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	45
5.1. Conclusiones	45
5.2. Recomendaciones	45

VI REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y VIRTUALES	47
VII ANEXOS.....	52

INDICE DE TABLAS

Tabla 01: Caracterización fisicoquímica de limón (<i>Citrus limón</i>), mandarina (<i>Citrus reticulata</i>) y naranja (<i>Citrus sinensis</i>)	9
Tabla 02: Operacionalización de variables con respecto a la producción de glucosa, empleando cascaras de naranja (<i>Citrus sinensis</i>) por medio de hidrolisis alcalina e hidrolisis enzimática utilizando DNS como indicador	18
Tabla 03: Interacción de concentración porcentual de cascaras de naranja con 3 diferentes temperaturas (40°C, 45°C y 50°C)	28
Tabla 04: Parámetros físicos (%) de la cascara de naranja (humedad, cenizas, pH, solidos solubles (°Brix), grasa, lignina) evaluados dentro del laboratorio de la UNS	32
Tabla 05: Resultados de las concentraciones de glucosa g/L expresadas en el tiempo por el método DNS, utilizando cáscaras de naranja hidrolizadas como materia prima	33
Tabla 06: Intercepción de la inversa del sustrato y la velocidad de reacción enzimática de la enzima celulasa comercial	37
Tabla 07: Parámetros cinéticos de la enzima celulasa comercial.....	39
Tabla 08: Análisis estadístico de los tratamientos de tres concentraciones de cascaras de naranja (2%, 3.5% y 5%) y 3 diferentes temperaturas (40°C, 45°C y 50°C)	40
Tabla 09: Comparación múltiple de Tukey	41

INDICE DE FIGURAS

Figura 01: Productos hidrolizados de celulosa y hemicelulosa	9
Figura 02: Secuencia de pasos seguidos con el fin de obtener glucosa partiendo de hidrolisis alcalina e hidrolisis enzimática con cascaras de naranja como sustrato y DNS como indicador.....	19
Figura 03: Retención y selección de partículas (2mm) usando tamiz N°10.....	21
Figura 04: Cascaras de naranja pesadas antes y después del análisis de determinación porcentual de humedad.....	22
Figura 05: Cascaras de naranja pesadas antes y después del análisis de determinación porcentual de ceniza	23
Figura 06: Preparación de solución de hidróxido de sodio NaOH al 8%.....	25
Figura 07: Cascaras de naranja pretratadas lavadas con agua destilada.....	25
Figura 08: Cascaras de naranja pretratadas, pesadas y almacenadas.....	26
Figura 09: Uso de enzimas celulasas dentro de la cámara de seguridad.....	26
Figura 10: Preparación buffer acetato	27
Figura 11: Toma de muestras en shock térmico (5 minutos de ebullición seguido de 5 minutos de reposo en agua helada)	29
Figura 12: Producción de glucosa en el tiempo de diferentes temperaturas y concentraciones de cascara de naranja.....	34
Figura 13: Producción de glucosa en el tiempo a 40°C y usando concentraciones de	

cáscara de naranja pretratadas al 2%, 3.5% y 5%.....35

Figura 14: Producción de glucosa en el tiempo a 45°C y usando concentraciones de cáscara de naranja pretratadas al 2%, 3.5% y 5%36

Figura 15: Producción de glucosa en el tiempo a 50°C y usando concentraciones de cáscara de naranja pretratadas al 2%, 3.5% y 5%37

Figura 16: Intercepción de la inversa de velocidad y la inversa de concentración de cascaras de naranja pretratadas al 2%, 3.5% y 5%38

Figura 17: Obtención de Km y Vmax por medio de la ecuación de linealización.....38

INDICE DE ANEXOS

Anexo 01: Operaciones realizadas para la obtención de glucosa	52
Anexo 02: Ficha técnica de enzima celulasa de la empresa Novozyme.....	53
Anexo 03: Incubadoras a 120RPM y diferentes temperaturas.....	63
Anexo 04: Absorbancia convertida en g/L.....	64
Anexo 07: Curva patrón para cuantificación de glucosa por el método DNS 3,5 - ácido dinitrosalisilico (DNS) (Miller, 1959)	65
Anexo 08. ISO 17025:2005	66

RESUMEN

En el presente estudio, se tuvo como objetivo principal evaluar la producción de glucosa en función de tres concentraciones de hidrolizado alcalino (2%, 3.5% y 5%) de cascaras de naranja (*Citrus sinensis*) tratadas con celulasas comerciales (5% p/v según ficha técnica del comerciante) y diferentes temperaturas (40°C, 45°C y 50°C). El diseño experimental consta de 9 experimentos, con dos variables dependientes (producción de glucosa y temperatura) y una variable independiente (concentración de cascara de naranja). En la primera etapa, las cascaras de naranja fueron introducidas dentro de cuatro botellas de vidrio de 250 mL, estas se sometieron a una hidrolisis alcalina empleando NaOH al 8% durante 60 minutos a una temperatura de 120°C en autoclave, el objetivo de la presente etapa es disminuir la concentración de lignina y así facilitar la interacción entre la celulosa y celulasas comerciales. En la segunda etapa, determinado por la hidrolisis enzimática, se usó la celulosa comercial al 5% p/v por 24 hrs a 120 rpm en shaker. Se procedieron hacer muestreos de 2 mL a diferentes tiempos (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 y 24 horas), posteriormente se realizó la centrifugación de muestras a 5000 rpm por 15 min. Al finalizar la hidrolisis se cuantifico la producción de glucosa por el método DNS en espectrofotómetro a 505 nm. El uso de la cascara de naranja como sustrato es una alternativa frente a la alta demanda de consumo de glucosa en alimentos envasadas, dándole un valor agregado y mejorando la sostenibilidad ambiental. Finalmente, con las gráficas de producción de glucosa se logró demostrar que la hipótesis planteada sobre el mejor rendimiento de producción de glucosa es adecuada bajo las condiciones de temperatura 45°C con 3.5% de concentración de cascaras de naranja pretratadas obteniendo 1.2g/L. Cada muestra procesada se realizó por triplicado, los datos que se recolectaron de las respuestas del diseño experimental factorial 3^2 aplicado en este trabajo fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia menor al 0.5; dichos cálculos se realizarán empleando el software IBM SPSS versión 27 con un nivel de confianza del 95 %, Los resultados según el análisis ANOVA fueron los siguientes: la concentración de cáscara de naranja tuvo un efecto significativo sobre la producción de glucosa ($p < 0.05$), mientras que la temperatura no presentó efecto significativo ($p = 0.288$).

Palabras claves: Glucosa; hidrolisis alcalina; hidrolisis enzimática; celulasas; cascaras de naranja.

ABSTRACT

In the present study, the main objective was to evaluate glucose production as a function of three concentrations of alkaline hydrolysate (2%, 3.5% and 5%) of orange peels (*Citrus sinensis*) treated with commercial cellulases (5% w / v according to the merchant's technical sheet) and different temperatures (40 ° C, 45 ° C and 50 ° C). The experimental design consists of 9 experiments, with two dependent variables (glucose production and temperature) and one independent variable (orange peel concentration). In the first stage, the orange peels were introduced into four 250 mL glass bottles, these were subjected to alkaline hydrolysis using 8% NaOH for 60 minutes at a temperature of 120 ° C in an autoclave, the objective of this stage is; to reduce the concentration of lignin and thus facilitate the interaction between cellulose and commercial cellulases. In the second stage, determined by enzymatic hydrolysis, commercial cellulose was used at 5% w/v for 24 hrs at 120 rpm in a shaker. 2 mL samples were taken at different times (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 and 24 hours), subsequently the samples were centrifuged at 5000 rpm for 15 min. At the end of the hydrolysis, glucose production was quantified by the DNS method in a spectrophotometer at 505 nm. The use of orange peel as a substrate is an alternative to the high demand for glucose consumption in packaged foods, giving it added value and improving environmental sustainability. Finally, with the glucose production graphs it was possible to demonstrate that the hypothesis proposed about the best glucose production yield is adequate under the conditions of 45 ° C with 3.5% concentration of pretreated orange peels, obtaining 1.2 g / L. Each sample processed was done in triplicate. The data collected from the responses of the 3²-factor experimental design applied in this work were evaluated by means of an analysis of variance (ANOVA) with a significance level less than 0.5; these calculations will be performed using IBM SPSS version 27 software with a confidence level of 95%. The results according to the ANOVA analysis were as follows: the concentration of orange peel had a significant effect on glucose production ($p < 0.05$), while temperature had no significant effect ($p = 0.288$).

Keywords: Glucose; alkaline hydrolysis; enzymatic hydrolysis; cellulase; orange peles.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Descripción y formulación del problema.

En el 2022, la producción de naranja en nuestro país fue de 591 mil toneladas; siendo Junín (51% de participación), San Martín (15%), Lima (6,1%) e Ica (5,5%) las principales zonas productoras según el informe del MIDAGRI 019-2023. Estos son exportados e importados en el país para distintos tipos de negocios con diferentes destinos de los cuales sobresalta la producción de jugo de naranja. De esta forma, cada año se generan toneladas de residuos agrícolas como las cáscaras de naranja desechadas por pequeños comercios y grandes industrias.

Debido a los sucesos mencionados, se planteó la idea de utilizar material de desecho de asequible obtención y muy copioso, en este caso, cascaras de naranja, con el objetivo de producir glucosa, compuesto de gran interés en la industria alimentaria.

Dándose este panorama, se requiere buscar alternativas biotecnológicas que permitan la transformación de estos residuos agrícolas a azúcares fermentables. Por medio de la aplicación de hidrolisis alcalina e hidrolisis enzimática bajo ciertas condiciones biocatalíticas (concentración y temperatura) apropiadas para un adecuado rendimiento.

En el trabajo de Cenicaña (Cenicaña et al.,2007) se determinó parámetros experimentales a través de modelos cinéticos (modelo de Michaelis-Menten) usando hidrólisis enzimática empleando residuos orgánicos como sustrato. La disposición de materia orgánica celulósica en modo de residuos agroindustriales nos afianza sustrato en abundancia y austero.

La meta es evaluar la producción de glucosa a partir de diferentes concentraciones de hidrolizado alcalino de cascaras de naranja previamente tratadas con celulasas comerciales a diferentes niveles de temperaturas. Se trabajo con estas variables debido a que el monitoreo de estas mismas es de fácil acceso, no se requiere de un laboratorio complejo y tampoco el uso de EPPS (equipo de protección personal).

Se utilizó la cascara de naranja como sustrato debido a que es un material de desecho de asequible obtención y muy copioso en los centros de abastos además de contener una importante cantidad de biomasa lignocelulosa (celulosa, lignina y hemicelulosa) en comparación a otros cítricos (mandarina y/o limón), con el objetivo de producir glucosa, compuesto de gran interés en la industria alimentaria.

Por lo consiguiente, planteamos la siguiente pregunta ¿Cuál de las tres concentraciones (2%, 3.5% y 5%) de hidrolizado alcalino de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*) tratadas con celulasas comerciales al 5% a diferentes temperaturas (40°C, 45°C y 50°C) permitirán obtener una mayor producción de glucosa?

1.2. Objetivos de la investigación:

1.2.1. Objetivo general:

- Evaluar la producción de glucosa a partir de tres concentraciones (2%, 3.5% y 5%) de hidrolizado alcalino de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*) tratado con celulasas comerciales al 5% y diferentes temperaturas (40°C, 45°C y 50°C).

1.2.2. Objetivos específicos:

- Identificar parámetros físicos a cáscaras de naranja (humedad, cenizas, pH, Brix, lignina y grasas) como etapa previa al pretratamiento alcalino.
- Determinar la mejor concentración cáscaras de naranja pretratadas y temperatura de reacción enzimática con celulasa, empleando el método DNS como indicador en espectrofotómetro.
- Determinar los parámetros cinéticos de la reacción enzimática (K_m y V_{max}) mediante el modelo de Michaelis-Menten, en condiciones óptimas de temperatura y concentración.

1.3. Formulación de hipótesis:

El tratamiento de cascara de naranja (*Citrus sinensis*) con celulasas comerciales al 5% bajo diferentes concentraciones de hidrolizado alcalino (2%, 3.5% y 5%) y temperaturas (40°C, 45°C y 50°C), influye significativamente en la producción de glucosa, esperándose un mayor rendimiento en condiciones intermedias de concentración y temperatura.

1.4. Justificación e importancia:

La razón esencial del presente trabajo de investigación recae en la valorización de la cascara de naranja (*Citrus sinensis*), en el aspecto ambiental consta en parte del problema de la contaminación por el arrojado de residuos sólidos orgánicos, la descomposición de estas genera gases como por ejemplo CO₂ y CH₄ sumado de una pestilencia al entorno y la propagación de vectores, tal caso la mosca (*Musca domestica*).

En el presente trabajo de investigación, la cascara de naranja fue sometida a un proceso de hidrólisis alcalina e hidrólisis enzimática con el objetivo de obtener glucosa. Mediante los procesos mencionados, logramos nuevas alternativas de solución ambiental.

En el aspecto social estamos contribuyendo en la investigación empleando cascara de naranja como sustrato, material orgánico cuantioso en compuesto lignocelulósico, otorgándole un valor agregado con el fin de obtener glucosa (postura económica), componente esencial y altamente requerido en productos envasados debido a su bajo costo, mejora la textura y el sabor de los alimentos. En este trabajo se usará la enzima celulasa; la cual, ayudará al proceso de obtención del producto glucosa. Esta enzima se puede obtener de microorganismos que nos brinden procesos más rápidos y con mayor rendimiento.

II MARCO TEÓRICO:

2.1. Antecedentes.

Para Chico y Sandoval (2015), su objetivo fue definir concentraciones de enzimas β -Glucosidasa y celulasas con el fin de adquirir azúcares fermentables partiendo de cascarilla de arroz como sustrato. Las cascarillas de arroz fueron pretratadas con NaOH al 8% por un espacio de 85 minutos en autoclave a 121°C con el propósito de reducir el porcentaje de lignina de la capa superficial de cascarilla de arroz. En la siguiente etapa, referente a la hidrólisis enzimática, se usó enzima celulasa (1%-5%) y enzima β -Glucosidasa (0.2%-0.6%), dichas enzimas trabajan de modo paralelo en cada medio de reacción, se ejecutaron 12 tratamientos por un espacio de 48 horas. Al finalizar el proceso de hidrólisis se cuantificó los azúcares reductores por el método DNS y análisis estadístico. Dando como resultado las condiciones óptimas de hidrólisis; celulasa al 5% y enzima β -Glucosidasa al 0.2% a una temperatura de 45°C. La cuantificación de azúcares reductores por DNS son las siguientes: 8.99g/L para glucosa y 2.83g/L para xilosa. Los valores mostrados reflejan las condiciones óptimas del ensayo experimental indicando una alta afinidad de la enzima por el sustrato y una proporción baja de reactividad.

Autores como Alikasturi, A. S., Shaharuddin, S., Anuar, M. R., Mohamad Radzi, A. R., Mohd Asnawi, A. S. F., Husin, A. N., Aswandi, N. A., & Mustapha, A. I. (2018), extrajeron glucosa mediante hidrólisis alcalina partiendo de tres variedades de cascaras de fruta, piña (*Ananas Comosus*), mango (*Mangifera Indica*) y plátano (*Musa Sapientum*), con el fin de comparar el porcentaje de extracción de glucosa entre dichas cascaras de frutas, cabe mencionar que existe abundancia de desechos lignocelulósicos en Asia debido a la crecida de áreas agrícolas. El tratamiento alcalino se empleó con el objetivo de eliminar la lignina presente en la pared celular de los tejidos vegetales, antes de ello se realizó un pretratamiento a las muestras (lavado con disolventes inertes). El proceso inicia mezclando las muestras de manera individual a diferentes concentraciones de NaOH (1%, 2% y 3%) y una concentración de sustrato (1, 2, 3 gr) a una temperatura de 80°C por un espacio de 12 horas, pasado dicho tiempo las muestras se agitaron a 700 rpm. Se dio paso a la neutralización, filtración y se finalizó con un análisis por medio de un espectroscopio UV-Vis a una longitud de onda de 265 nm. Dando como resultado que la mayor incidencia en extracción de glucosa proviene de la cascara de mango (4.752 mg/mL) al 2% de NaOH con

3 gr de sustrato, sucesivamente mencionar a la cascara de plátano (3.824 mg/mL) y a la cascara de piña (2.179 mg/mL) a una proporción de 3% de NaOH con 2 gr de sustrato ambas respectivamente. Por otra parte, la menor concentración de glucosa extraída fue de la cascara de piña (0.992 mg/mL) a 1% de NaOH con 1gr de sustrato. Esto indica que la concentración de glucosa extraída depende del aumento en concentración de sustrato y NaOH.

Así mismos autores como Alcántara y Correa (2018), evaluaron el efecto que tiene la temperatura en el pretratamiento biológico del bagazo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en fermentación sumergida con *Pleurotus ostreatus* en fermentación sumergida, y así conocer la síntesis de celulasas por *Trichoderma harzianum*; el cual, estuvo cultivado en placa. Realizaron esta investigación con 4 temperaturas (26°C, 28°C, 30°C y 32°C), luego, recuperaron el bagazo y emplearon como fuente de carbono para la sinterización de las enzimas deseadas cultivados en placa. Obteniendo finalmente que a 30°C se logró mayor actividad enzimática y síntesis de celulasas (1.726±0.030 U/mL).

Autores como Ali, N., Che Aziz, C. A., & Hassan, O. (2015) tuvieron como objetivo en su estudio, determinar la cantidad de glucosa extraída a partir de la pulpa de coco y racimos vacíos de esta misma por medio de hidrolisis acida. En la etapa de pretratamiento con hidróxido de sodio se llevó mediante diferentes concentraciones (5%, 10%, 15%, 20% v/v) por un espacio de tiempo de 2 horas a 70°C. La determinación del pretratamiento optimo se da por medio del análisis de infrarrojos, método de Fourier (FTIR). Según ello se determinó que el tratamiento optimo y/o ideal es al 20% v/v de NaOH. Por consiguiente, las muestras optimas se hidrolizaron a concentraciones de 5%, 10%, 15% y 20% de ácido sulfúrico con variadas temperaturas de 30°C, 50°C, 70°C y 90°C por un espacio de 2 horas para luego ser centrifugados a 5000 rpm por 15 minutos, dicha concentración de glucosa se analizó empleando un espectrofotómetro. A continuación, se menciona las concentraciones altas de glucosa, obteniendo un 0.895 g/L para la pulpa de coco y 0.550 g/L para el racimo vacío de coco respectivamente, con una concentración del 20% v/v con una temperatura ideal de 90°C.

Para Sánchez y Vázquez (2017), su objetivo fue evaluar el efecto que ocasiona la hidrólisis ácida en las cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*); y así, convertir la celulosa en carbohidratos reductores; en ello, utilizaron ácido sulfúrico 0.25-1.0 %v/v, 110-125 °C, y tiempos de 10-30 min. Continuando con su procedimiento; el cual, dispusieron del análisis bromatológico resultando las siguientes cantidades: celulosa (9.93%p/p), hemicelulosa (26.45%p/p), lignina (2.81%p/p) y proteína (7.59%p/p). Así mismo, para observar cualquier modificación física o estructural por el proceso de la hidrólisis, emplearon el análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectroscopía infrarroja (FT-IR) de la biomasa. Finalmente, para la determinación de azúcares se ejecutó el análisis por fotolorimetría y ácido dinitrosalicílico (DNS), concluyen con resultados eficientes de ácido sulfúrico 0.50 y 0.75 % durante 30 min. de reacción a 125 °C, obteniéndose como máximo 0.38 gr de AR/gr biomasa seca.

Asimismo, existen autores con el mismo objetivo de aprovechar los recursos; por ejemplo, en México – Durango, poseen este abundante aserrín de madera (pino); por ello, López et al. (2009), realizaron como pretratamiento el método alcalino, ácido y explosión con vapor a 121°C (temperatura de autoclave); por consiguiente, utilizando la hidrólisis enzimática, con el fin de recuperar los azúcares que posee esta materia prima, inició con NaOH 8% a 120°C por 60 min., obteniendo mejores resultados a comparación de los otros pretratamientos de ácido sulfúrico diluido 2% o por explosión a vapor, para esta optimización emplearon superficie de respuesta. Finalmente, obtuvieron 48% de azúcares reductores con 4.5 de pH por 240 hrs y con hidrólisis enzimática 25 UPF/g de carbohidratos totales. Haciendo que estos resultados sean eficientes para el aprovechamiento de esta materia prima.

2.2. Marco conceptual.

2.2.1. Naranja blanca (*Citrus sinensis*).

La naranja blanca (*Citrus sinensis*) perteneciente a la familia de *Rutáceae* es una fruta cítrica de alto contenido lignocelulósico, utilizada como materia prima en este estudio por su disponibilidad y composición estructural. Es un árbol de tamaño entre los 3 y 10 metros de alto, muy sensible a las bajas temperaturas (no menor a 10°C) y con una alta demanda de agua (20L de agua por día en temporada de calor) y luz (10,000 y 40,000 lx), para poder

florecer y producir sus frutos. Posee hojas amplias y espinas; por lo general, en los primeros meses del año, mayormente en el mes de marzo empieza la brotación y floración, donde usualmente son los meses que se presentan mayor aumento de temperatura. Las flores, también llamadas “Azahar,” son muy populares por su agradable aroma y se pueden encontrar tanto solas como agrupadas, rodeadas o no por hojas y en particular las que presentan forma acampanada son las que mejores frutos producen. Se nombró naranja blanca para diferenciarlas de las variedades Navel o de las de sangre. Las principales características son la carencia de ombligo en sus frutos, una acidez inferior (1.3%-1.9% acides titulable) a las de otros grupos de variedades y la ausencia de sabor amargo en su zumo. Las cáscaras de los cítricos suelen representar más del 50% del peso de la fruta. (Tejada, et al 2010).

Tabla 01. Caracterización fisicoquímica de limón (*Citrus limón*), mandarina (*Citrus reticulata*) y naranja (*Citrus sinensis*).

Biomasa	Humedad (%)	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Limón	79,0	21,6	6,0	8,9
Mandarina	77,5	20,2	7,8	9,1
Naranja	69,4	23,5	10,4	7,6

Nota. La tabla detalla la composición química de los principales cítricos comercializados en el Perú. Tomado de Tejada (2014).

2.2.2. Biomasa lignocelulósica.

La lignocelulosa se encuentra presente dentro de la estructura de la pared celular de las plantas, esta es la fuente de carbono renovable más prometedora para solucionar los problemas actuales de energía y materias primas como por ejemplo la contaminación y agotamiento de recursos (Álvarez et al, 2012)

Para el aprovechamiento del material lignocelulósico se requiere métodos de fraccionamiento de sus compuestos estructurales principales (como lo son la celulosa, hemicelulosa y lignina). A continuación, se presenta los siguientes métodos: método de hidrólisis, consiste en el uso de enzimas o ácidos empleadas en el tratamiento de material lignocelulósico, extrayendo la celulosa para convertirse en azúcares fermentables, el éxito de ello dependerá de ciertas condiciones óptimas (concentración, temperatura y pH). Por último, el método de lignificación, referido al método o técnica por el cual se localiza, examina o induce la lignificación, comprendido como la síntesis de lignina, parte fundamental de las paredes celulares de plantas. (Barroso, 2010)

2.2.3. Celulosa.

Las características fisicoquímicas de la celulosa están regidas por su estructura molecular y conducta frente a su entorno de acuerdo a patrones físicos y químicos, la celulosa consta de una composición química (polisacárido constituido por uniones de glucosa a través de enlaces β (1 \rightarrow 4)). La celulosa es la sustancia que se encuentra con más habitualidad en la estructura de las paredes de la célula vegetales. Presenta varios usos según su tratamiento, entre ellos destacan la fabricación de explosivos (el más conocido es la nitrocelulosa o "pólvora para armas"), celuloide, seda artificial, barnices y se utiliza como aislamiento térmico y acústico, como producto derivado del papel reciclado triturado. (Young, Rowell 1986).

La celulosa contiene una estructura lineal o fibrosa, en la que se establecen diversos puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de distintas cadenas yuxtapuestas de glucosa, haciéndolas impenetrables al agua, lo que hace que sea insoluble en agua, y originando fibras compactas que constituyen la pared celular de las células vegetales. (Taiz & Zeiger; 2002).

2.2.4. Hemicelulosa.

Las hemicelulosas son polisacáridos compuestos por más de un tipo de azúcar de cadenas cortas, que contienen azúcares como hexosas, pentosas y dependiendo de la planta de las que provenga, que se relacionan de manera cercana tanto con la lignina como con la celulosa. Los polímeros principales que se pueden encontrar son: xilosa, arabinosa, galactosa, glucosa y ácido glucurónico; que forman una cadena ramificada. (Olvera, 2003)

2.2.5. Lignina.

La lignina es un compuesto que repele sustancias líquidas como por ejemplo el agua, característica muy usual en los compuestos aromáticos. Por ello, no puede ser disuelto en un medio acuoso, a menos que se coloquen en su estructura grupos polares opuestos mediante reacciones químicas. Este procedimiento se lleva a cabo en ocasiones, haciendo reaccionar la lignina con compuestos derivados del azufre, que introducen sustituyentes sulfonados en la estructura de la lignina, haciéndola entonces soluble (Chiaramonti, et al 2012).

La lignina cumple con tres funciones específicas: Proteger a la celulosa del ataque microbiano, conferir resistencia e impermeabilidad al material y mantener unidas las fibras celulósicas.

Chiaramonti, et al 2012, argumentaron que es necesario eliminar la lignina para la preservación de polisacáridos como hemicelulosa y celulosa porque de allí provienen los azúcares reductores, ya que son los mejores indicadores de la degradación y conversión del tejido vegetal a azúcares fermentables.

La deslignificación consiste en una fracción muy importante que afecta directamente en el rendimiento de azúcares, Salcedo (2013) determinó la influencia de contenido de lignina con respecto a la facultad de hidrolizar los sustratos para las diferentes enzimas, dando como idea general que la lignina puede comportarse como un inhibidor en la reacción de hidrólisis enzimática de los residuos orgánicos, debido a esto es necesario el empleo de pretratamientos efectivos: la cascara de naranja presenta en su matriz una serie de compuestos lignocelulósicos que requieren ser deslignificados a través de diversos mecanismos, por ejemplo el alcalino usando NaOH, la cual actúa rompiendo los enlaces hemicelulosa-lignina, generando una reducción en la capacidad de lignina y hemicelulosa de la biomasa pretratada, este procedimiento conlleva a la alteración de la estructura de la lignina residual por ende aumentando el nivel o capacidad de porosidad en la superficie interior de la biomasa, de manera particular cae el nivel de cristalinidad de la celulosa adecuando la penetración de las partículas de agua en el interior de las capas de agua en la biomasa: generando una ayuda al momento de ocurrir la interacción de biomasa con

enzima celulasas (Silverstein et al.,2007). En el presente trabajo de investigación se adecuo al uso de un pretratamiento alcalino ya que por bibliografía resulta mucho más ventajoso debido a la generación de azúcares reductores y lo adecuado que resulta en la separación de biomasa con el producto.

2.2.6. Pretratamiento químico.

El propósito de un pretratamiento es realizar la preparación de la materia prima, para maximizar el aprovechamiento y eficiencia en la etapa de hidrólisis enzimática sobre las cáscaras de naranja. El principal objetivo del pretratamiento es eliminar la lignina, separándose de la hemicelulosa, reducir la región cristalina de la celulosa y aumentar la porosidad de los materiales (Ahuja, 2011).

Hay dos diferentes métodos de pretratamiento químico, el ácido y el alcalino. Sus objetivos son desnaturalizar a la hemicelulosa y romper la estructura de lignina para que la celulosa esté más manipulable para la siguiente etapa que es de hidrólisis. El pretratamiento ácido es una reacción muy fuerte y efectiva para la hidrólisis de la celulosa, pero los ácidos concentrados son tóxicos, corrosivos, peligrosos y se requieren reactores de materiales resistentes a la corrosión, por lo que el costo del pretratamiento es demasiado elevado (Kumar et al, 2009).

El pretratamiento alcalino (mayormente se usa el hidróxido de sodio), es el único pretratamiento que se puede realizar a bajas temperaturas y presiones. Es posible llevar a cabo el proceso a condiciones ambientales, pero puede tardar muchas horas o incluso varios días (Hendricks & Zeeman, 2009).

2.2.7. Celulasa.

Las celulasas son conocidas como enzimas fundamentales en el procesamiento de desechos lignocelulósicos, por ejemplo, residuos agrícolas, madera y otros compuestos facultativos de celulosa. Dichas enzimas tienen el potencial de descomponer la celulosa, comprendido como un polímero sofisticado compuesto por moléculas de glucosa emparejadas por enlaces β -1,4-glicosídicos. Los desechos lignocelulósicos son comprendidos como un compuesto importante de biomasa para la síntesis de productos en la cual la celulosa se desprende para convertirse en azúcares fermentables.

Las celulasas son un complejo multienzimático que consiste en tres enzimas principales (tales como las endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa), estas enzimas actúan al hidrolizar la celulosa hasta sus monómeros más simples como es la glucosa. Primero, suele actuar la endo-1,4-b-D-glucanasa al azar, entre fibras de celulosa para generar extremos reductores y no reductores, en donde también intervienen exo-celobiohidrolasa, liberando celobiosa (dímeros de glucosa unidos por enlaces β -1,4 glicosídicos). Por último, la celobiosa es degradada por la β -glucosidasa en monómeros de glucosa, siendo ese su producto final (Pandey et al., 2017).

Las celulasas han experimentado un incremento muy eficiente en su demanda en el mercado desde 1995, sus principales aplicaciones industriales son: detergentes, industria textil, alimentación animal e industria alimentaria, industria papelera e industria de los biocombustibles (Pandey et al., 2017).

2.2.8. Hidrólisis enzimática.

La hidrólisis enzimática se realiza mediante el uso de enzimas, las cuales actúan por naturaleza y rompen los enlaces de cadenas largas y complejas, permitiendo la liberación de moléculas más simples.

En este trabajo se realizó la hidrólisis enzimática usando la enzima celulasa para obtener glucosa. Los costos de utilidad en este proceso de hidrólisis son bajos porque se realizaron bajo condiciones medias (como pH de 5 y temperaturas entre 40 - 50 °C) y no produce problemas de corrosión, como si pasaría en una hidrólisis acida (Blume, 1991).

Celulasa cataliza la hidrólisis de la celulosa, tiene su origen en hongos (*Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*, etc) y bacterias tanto aerobias como anaerobias (*Cytophaga*, *Clostridium*, *Cellevibrio*, etc), aunque algunos protozoos también poseen capacidad para sintetizar celulasas como *Trychonympha* (Schinner & Von Mersi, 1990).

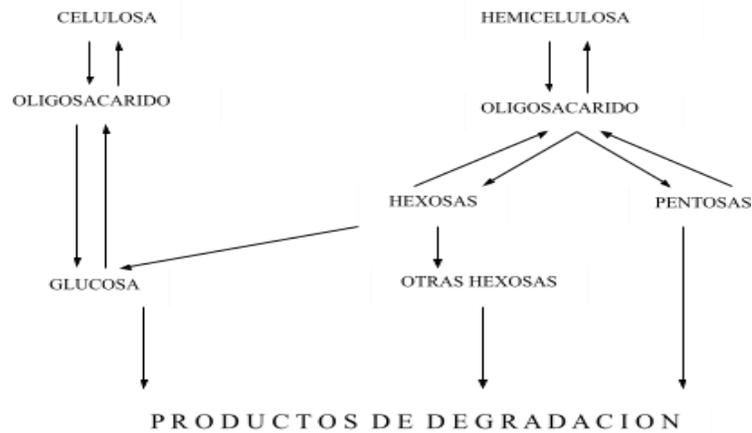


Figura 01. *Productos hidrolizados de celulosa y hemicelulosa*

Nota. En la figura se visualiza los diferentes productos hidrolizados tanto de la celulosa y la hemicelulosa. Adaptado de Ahuja et al. (2011).

2.2.9. Glucosa.

La glucosa corresponde a un monosacárido, con fórmula química $C_6H_{12}O_6$ y masa molecular 180,16 g/mol. Concierno a una aldohexosa por ello recibe el nombre de D-glucopiranososa, consta de un equilibrio en soluciones a temperaturas por debajo de $50^{\circ}C$. La glucosa se produce esencialmente por hidrolisis enzimática y/o hidrolisis acida a partir del almidón de maíz (usado como sustrato), refleja las siguientes características; su poderío edulcorante es menor en comparación a la sacarosa y consta de un extenso interés en el mercado debido a su precio asequible, en el sector de alimentos, productos farmacéuticos y bebidas (Vandamme, 1983).

Todas las frutas contienen cierta cantidad de glucosa, que puede ser extraída y concentrada para obtener un azúcar alternativo. Pero a nivel industrial, tanto la glucosa líquida (jarabe de glucosa) como la dextrosa (glucosa en polvo) se producen a partir de la hidrólisis química y/o enzimática del almidón de cereales como por ejemplo del trigo o maíz, cereales cultivados a gran escala debido a su bajo costo y menor consumo hídrico. (Zhang, 2006)

2.2.10. Cinética Enzimática.

La actividad cinética de las enzimas se explica a través de la ecuación de Michaelis-Menten, mientras que V_{max} y K_m son las constantes significativas asociadas a esta ecuación. Cada tipo de enzima posee valores concretos para estas constantes, los cuales deben ser determinados a través de ensayos experimentales. La representación lineal, como por ejemplo Lineweaver-Burk ofrece la forma más fácil de adaptar datos experimentales que pueden estar sesgados al error a la fórmula de Michaelis-Menten. La velocidad de una reacción catalítica nos muestra la proporción de sustrato agotado o producto elaborado por unidad de tiempo. De acuerdo al sistema internacional se denomina por la vocal "U" (ente de actividad enzimática) y compete a los μ moles de sustrato empleado en un lapso de tiempo de 1 minuto. (Cunningham & López, 1994)

Ritchie y Prvan (1996), el valor de K_m da idea de la similitud de la enzima por el sustrato: mientras menos sea el K_m , mayor será la afinidad de la enzima por el sustrato, y a mayor K_m , menos será su afinidad (interacción idónea entre enzima y sustrato). Además, si la K_m es muy baja comparada con la concentración de sustrato, la enzima siempre estará, casi completamente saturada, y las variaciones en la concentración de sustrato tendrán poco efecto. Si la K_m es demasiado alta, la enzima tendrá mayor sensibilidad a los cambios en la concentración de sustrato, igual podría operar, pero solamente una pequeña fracción de su capacidad catalítica.

III. METODOLOGÍA

3.1. Método.

La presente investigación es de tipo aplicada, con diseño experimental puro, de nivel explicativo, orientado a evaluar el efecto de dos variables independientes (concentración y temperatura) sobre la producción de glucosa a partir de cascara de naranja, desarrollado dentro de los laboratorios de investigación y biotecnología vegetal de la E.A.P de Biotecnología de la Universidad Nacional del Santa. El propósito es evaluar la producción de glucosa a partir de tres concentraciones (2%, 3.5% y 5%) de hidrolizado alcalino de cáscaras de naranja (*citrus sinensis*) tratado con celulasas comerciales al 5% y diferentes temperaturas (40°C, 45°C y 50°C). De inmediato se precisa los elementos principales de la metodología como también el método empleado.

El procedimiento empleado en esta presente investigación es de carácter experimental puro lo que constituye una ejecución vigilada de las condiciones del proyecto. En el presente proyecto de investigación, la concentración de cáscaras de naranja (2% - 3.5% - 5%) así como la temperatura (40°C - 45°C - 50°C) fueron operadas como variables independientes. Este panorama nos faculta observar dichos efectos sobre la producción de glucosa, correspondiente a la variable dependiente.

3.1.1. Diseño de investigación.

Se uso un diseño experimental factorial 3^2 , el cual tiene dos factores, cada uno con tres niveles, obteniendo un total de 9 tratamientos diferentes, ello nos posibilita la estimación del efecto de dos variables independientes (temperatura y concentración de cascara de naranja) en la producción de glucosa empleando tres niveles diferentes por cada factor. La aplicación del modelo experimental se aplicó teniendo en cuenta las variables independientes para luego generar replicas para cada tratamiento (3 repeticiones por tratamiento) seguido de una asignación de manera aleatoria con el objetivo de reducir sesgos. Por último, se recolecto datos, de acuerdo a cada combinación de unidades experimentales con fin de calcular el rendimiento de la variable dependiente. Los efectos principales fueron identificados mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia menor al 0.5; los cálculos se realizaron empleando el software IBM SPSS versión 27 con un nivel de confianza del 95%.

El modelo estadístico para el diseño experimental 3^2 se puede escribir considerando el efecto individual de cada factor y de la interacción entre ambos, utilizando la ecuación propuesta por Porras et al. (2000) como se presenta a continuación:

$$y_{ijk} = \mu + a_i + B_j + (aB)_{ij} + E_{ijk}$$

Fuente: Lara Porras, 2000

donde:

y_{ijk} : es el valor del i-ésimo nivel del factor A, j-ésimo nivel del factor B, y k-ésimo bloque (repetición).

μ : es la media general.

a_i : es el efecto del i-ésimo nivel del factor A.

B_j : es el efecto del j-ésimo nivel del factor B.

$(aB)_{ij}$: es el efecto de la interacción entre ambos factores.

E_{ijk} : es error aleatorio.

Donde los errores E_{ijk} tienen distribución normal (N) de media 0 y varianza σ^2 constante.

3.1.2. Población y muestra.

La población de análisis del presente experimento fue la cascara de naranja (*Citrus sinensis*) reconocida por su alto valor lignocelulósico, esta materia orgánica fue recolectada de un puesto de jugos familiar altamente concurrido del mercado “Buenos Aires” en el distrito de Nuevo Chimbote. La muestra está compuesta de 800 gr de cascara de naranja (*Citrus sinensis*) debidamente deshidratada y molida (partículas pequeñas de 2 mm).

3.1.3. Operacionalización de variables.

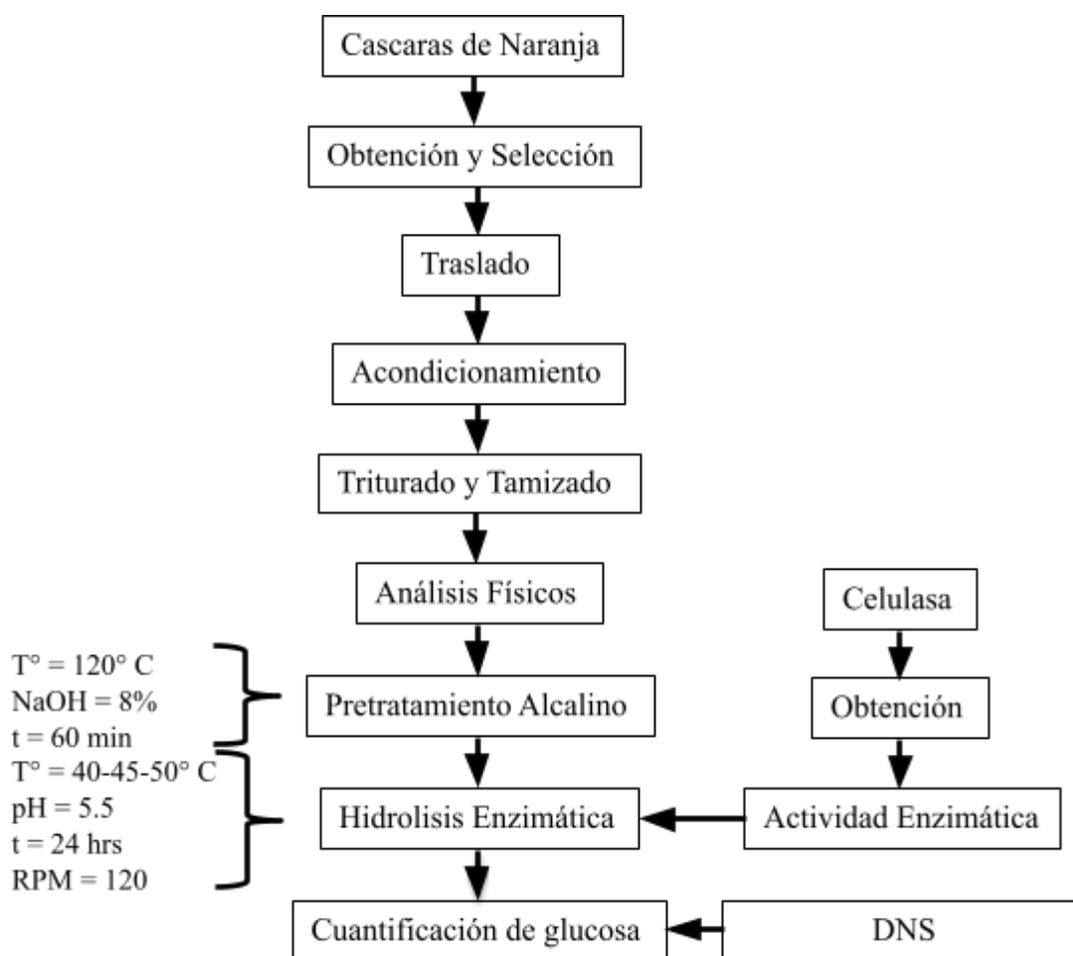
Tabla 02: Operacionalización de variables con respecto a la producción de glucosa, empleando cascaras de naranja (*Citrus sinensis*) por medio de hidrolisis alcalina e hidrolisis enzimática utilizando DNS como indicador

Variable Independiente	Dimensiones	Indicador	Instrumento de recolección de datos
Concentración de cascara de naranja	Concentración de azucares reductores por litro de solución	% (2, 3.5, 5)	Análisis volumétrico
Temperatura	Grados °C empleado a los tratamientos	40°C, 45°C y 50°C	Sensor digital interno de incubadora
Variable dependiente	Dimensiones	Indicador	Instrumento de recolección de datos
Producción de glucosa	Concentración de azucares reductores	gr/L	Espectrofotómetro

3.1.4. Procedimiento.

En el siguiente trabajo experimental puro, se desarrolló dentro de las instalaciones de la facultad de ciencias de la Universidad Nacional del Santa, siguiendo las pautas mencionadas por el método científico. Por ende, se señalan los pasos seguidos con el fin de obtener glucosa partiendo de hidrolisis alcalina e hidrolisis enzimática con cascaras de naranja como sustrato.

Figura 02. Secuencia de pasos seguidos con el fin de obtener glucosa partiendo de hidrolisis alcalina e hidrolisis enzimática con cascaras de naranja como sustrato y DNS como indicador.



3.1.4.1. Obtención y selección de cascara de naranja.

Se obtuvo la cascara de naranja del centro de abastecimiento “Buenos Aires”, distrito de Nuevo Chimbote, provincia del Santa, departamento de Ancash. En el cual, se eligió un puesto familiar, de juguería de frutas altamente concurrido. Se recolecto las cáscaras de naranja dentro de una bolsa plástica de material polipropileno; para ello, se usaron guantes quirúrgicos. Al realizar este procedimiento, se tuvo en cuenta su estado de descomposición; por ello, las cáscaras seleccionadas fueron las que no estuvieron expuestas al entorno o ambiente durante un lapso de tiempo no mayor de 24 horas; así se evitó el uso de material no apto. (Cardona y Pinzón, 2008).

3.1.4.2. Traslado.

Se realizó el traslado del material lignocelulósico (cáscaras de naranja) empleando una bolsa plástica hermética y un cooler de 10 L.; previamente desinfectado con alcohol 75 %, cabe señalar que dentro del cooler se incorporó gel pack con el objetivo de perdurar componentes esenciales de las cáscaras de naranja (tiempo no mayor a 5 horas, pasado dicho tiempo, las cascaras comienzan a tomar una coloración inusual, propia de la descomposición). Se colocó una etiqueta en una parte visible de la bolsa, en el cual, se detalla: nombre del responsable (persona quien ejecuta la recolección), fecha, hora y puesto donde se realizó la recolección; los procedimientos mencionados son parte de la norma ISO/IEC 17025:2005 (Véase Anexo 09).

Las muestras fueron llevadas al laboratorio de investigación de la escuela profesional de Biotecnología en la facultad de ciencias de la Universidad Nacional del Santa, Nuevo Chimbote.

3.1.4.3. Tratamiento previo de cáscaras de naranja.

Se tomó 1 kg. aproximadamente de toda la muestra obtenida. Luego se lavó con agua potable, 3 veces, con el objetivo de eliminar impurezas y compuestos solubles (taninos, resinas y restos de fertilizantes). Posteriormente, se tuvo un segundo lavado con agua destilada, frotando manualmente con guantes quirúrgicos, con la finalidad de eliminar impurezas que aún perduran en la parte superficial de la cáscara de naranja.

Finalmente, se realizó cortes a las cáscaras con un cúter previamente desinfectado, se pesaron en una balanza digital y se procedió a secar en estufa a 60°C por 45 min, con el propósito de remover el agua y uniformizar la muestra para las siguientes etapas. Al finalizar se trasladó las cáscaras de naranja a un desecador para evitar que la muestra adquiera humedad del ambiente.

3.1.4.4. Triturado y tamizado de cáscaras de naranja.

Se realizó esta etapa con un molidor manual, el cual, redujo el tamaño de las cáscaras de naranja, para que se logre tamizar (tamizador 8" N.º 10 – 2 mm con malla de acero inoxidable), hubo ocasiones que se encontró trozos grandes, en donde se tuvo que repetir

el procedimiento, hasta tener una muestra homogénea.



Figura 03. Retención y selección de partículas (2mm) usando tamiz N°10.

3.1.5. Análisis de los parámetros físicos de las cáscaras de naranja.

Los siguientes procedimientos se realizaron 3 veces, siguiendo los protocolos estandarizados por Métodos Oficiales de análisis de Alimentos (AOAC, 1990)

3.1.5.1. Determinación porcentual de humedad (Método AOAC 14.003)

Se pesó y colocó 10 gr de muestra húmeda (cascaras de naranja) en un crisol chico de porcelana, luego se trasladó a la estufa con una temperatura de entre 100 - 105°C por un periodo de 40min. (Véase Fig. 4) Por último, se determinó el contenido porcentual de humedad con la siguiente ecuación (AOAC, 1990):

$$\%H = \frac{W_{inicial\ de\ muestra} - W_{final\ de\ muestra}}{W_{inicial\ de\ muestra}} \times 100$$

Fuente: Asociación Oficial de Químicos Analíticos, 1990.



Figura 04. Cáscaras de naranja pesadas antes y después del análisis de determinación porcentual de humedad.

3.1.5.2. Determinación porcentual de Ceniza (Método AOAC 14.006)

Se pesó 10 g de muestra seca en un crisol de porcelana, se colocó el crisol en una mufla y se dejó calcinar por 2 hrs. Después de la calcinación se dejó enfriar en un desecador por 24hrs. (Véase Fig. 5) Finalmente se determinó el porcentaje de cenizas mediante la siguiente ecuación:

$$\%C = \frac{W_{ceniza}}{W_{inicial\ de\ muestra}} \times 100$$

Fuente: Nielsen, 2003.



Figura 05. Cáscaras de naranja pesadas antes y después del análisis de determinación porcentual de ceniza.

Nota. Las cáscaras de naranja en ambas modalidades fueron pesadas en la balanza analítica del laboratorio de investigación de la Universidad Nacional del Santa

3.1.5.3. Determinación de pH.

La determinación de pH se realizó en una muestra homogenizada al 10% en medio de agua destilada empleando un potenciómetro. Se procedió a pesar 5 gramos de muestra seca de cáscara de naranja, esta muestra fue tamizada para obtener partículas finas, posteriormente se añade 45 ml de agua destilada, se homogenizo utilizando una varilla de vidrio. Se dejó en reposo por unos minutos antes de proceder la inserción del sensor dentro del vaso precipitado. También existe la posibilidad de utilizar bandas indicadoras, pero para el análisis cuantitativo no resulta adecuado.

3.1.5.4. Determinación de Sólidos Solubles (°Brix).

Antes de proceder al análisis, se ajustó el Refractómetro, se colocó unas gotas de agua destilada entre ambos prismas, el valor adecuado debe reflejar 1.33, si no resulta dicho valor es necesario limpiar dichos prismas. En un vaso precipitado se preparó una solución al 5 %, 5 gramos de materia seca de cáscara de naranja y 45 ml de agua destilada, con la

ayuda de un gotero se colocó unas gotas encima del prisma, inmediatamente se midió y registro la concentración de azúcar de nuestra muestra de cáscara de naranja. (Peter Rein, 2012)

3.1.5.5. Determinación de lignina: (Método Klason).

Se pesó 1 gr de muestra (cascaras de naranja), se mezcló bien con 15 ml de H₂SO₄ 72% y se dejó reposar por un periodo de 24 horas. Se trasladó el contenido del vaso a un matraz de 1000 ml y se añadió 560 ml de agua destilada para bajar su concentración de H₂SO₄ al 72% a H₂SO₄ al 3%; se mantuvo en ebullición por 4 horas, al finalizar el tiempo se esperó que pueda sedimentar el sólido para posteriormente realizar el filtrado en una placa filtrante. El sólido filtrado se lavó con agua destilada caliente hasta que el pH del agua de lavado no fue ácido (con la ayuda de tiras de pH), se secó en una estufa a una temperatura de 105°C por un periodo de 12 horas y se colocó en la balanza. Pesamos unos 100 mg de sólido y se calcinó en mufla a una temperatura de 430°C por un periodo de 24 horas, obteniéndose así un porcentaje en materia orgánica (MOling).

3.1.5.6. Determinación de grasas (Método Soxhlet).

El presente método es una adecuación descrita por A.O.A.C (*Association of Official Analytical Chemists et al., 2016*). Se colocó 4 gramos de la muestra previamente secada en un cono de papel filtro para luego incorporar en el extractor Soxhlet. Antes de realizar el procedimiento en cuestión se pesó el balón para luego ser llenado con hexano, a una cantidad necesaria con el objetivo que realice el sifoneo. La extracción tuvo un tiempo de 4 horas, se dio por terminado el análisis cuando el disolvente que emergía por el sifón se convirtió en incoloro.

3.2. Pretratamiento de las cáscaras de naranja con hidrólisis alcalina.

Se preparo 150 mL de hidróxido de sodio al 8% en un vaso precipitado de 500 mL y se distribuyó en 03 botellas de vidrio de 300 mL cada una. (Véase Fig. 6) Las cáscaras de naranja trituradas y tamizadas se colocaron en las botellas de vidrio antes mencionadas y se dispuso en un horno a una temperatura elevada, a 120°C, por 60 min.; la materia prima fue lavada con agua destilada, hasta obtener pH neutro. (Véase Fig. 7)



Figura 06. Preparación de solución de Hidróxido de sodio NaOH al 8%.

Nota: Se preparo la solución de hidróxido de sodio bajo criterios de seguridad empleando EPP anti quemaduras.



Figura 07. Cáscaras de naranja pretratadas lavadas con agua destilada.

Nota: Se realiza un lavado exhaustivo hasta obtener un pH neutro sin remanentes de hidróxido de sodio.

Luego, se procedió a secar en la estufa a 60 °C por 12 hrs, con el fin de eliminar agua residual. Posteriormente, se pesó las cáscaras de naranja pretratadas obtenidas y almacenadas a 3°C en viales de laboratorio estériles hasta su uso en la siguiente etapa (Véase Fig. 8)



Figura 08. Cáscaras de naranja pretratadas, pesadas y almacenadas.

3.3. Determinación de la enzima celulasa.

3.3.1. Obtención de la enzima celulasa.

Se obtuvo la enzima celulasa de la empresa Novozyme; cabe señalar que, su traslado fue en cooler con gel pack y permaneció en refrigeración a 3° C, el protocolo para el traslado fue determinado por el ISO 17025:2005, se colocó 3mL de enzima celulasa en viales estériles para una fácil manipulación en el siguiente proceso de hidrólisis enzimática. (Véase Fig. 9)



Figura 09. Uso de enzimas celulasas dentro de la cámara de seguridad

Nota: Distribución de la enzima en pequeños viales de 20 ml para su uso póstumo.

3.4. Hidrólisis enzimática.

Se preparó buffer acetato a pH 5.5 en un matraz de 250 mL usando solución A (8.8 mL de solución de ácido acético), solución B (41.2 mL de solución de acetato de sodio) y agua destilada (50 mL). Se verificó su pH y se guardó el buffer acetato en un frasco de vidrio estéril. (Véase Fig. 10)



Figura 10. Preparación buffer acetato.

Las cáscaras de naranja pretratadas con hidrólisis alcalina fueron distribuidas en 09 matraces de 250 mL, se consideraron 03 diferentes concentraciones de cascara de naranja (2%, 3.5% y 5%) (Novozyme - Anexo 02) en relación con el medio reactante - solución buffer acetato (60 mL para cada tratamiento). Se realizó por triplicado cada una de las concentraciones antes mencionadas, debido que cada concentración fue expuesta a diferente temperatura (temperaturas de 40°, 45° y 50°C) durante todo el proceso de hidrólisis enzimática (véase Tabla 03), se mantuvo con un pH 5.5. (Blume, 1991)

Tabla 03: Interacción de concentración porcentual de cáscaras de naranja con 3 diferentes temperaturas (40°C, 45°C y 50°C)

	Temperatura °C	Concentración de cáscaras de naranja %
1	40	2
2	45	2
3	50	2
4	40	3.5
5	45	3.5
6	50	3.5
7	40	5
8	45	5
9	50	5

Por consiguiente, cada matraz Erlenmeyer de 250 mL contuvo cáscaras de naranja pretratadas con enzima celulasa al 5% p/v por 24 hrs a 120 rpm en incubadora (Salazar, 2012) a temperaturas de 40°, 45° y 50°C. (Anexo 03)

Cada 3 hrs se tomó 2 mL de muestra colocándolos en diferentes viales y siendo introducidos en un vaso con agua en ebullición por 5 min y luego en un cooler con agua helada por 5 min más (Véase Figura 11); después, se centrifugo a 5 000 rpm durante 15 min; el sobrenadante de cada muestra (1 mL aproximadamente), se distribuyó en tubos Eppendorf para cuantificación de producción de glucosa, siguiendo el método DNS.



Figura 11. *Toma de muestras en Shock térmico (5 minutos de ebullición seguido de 5 minutos de reposo en agua helada).*

3.5. Técnica de recolección de datos.

La técnica siguiente de recolección de datos serán aplicadas en la captura de datos y su posterior análisis estadístico.

3.5.1. Cuantificación de glucosa por método DNS.

Se determinó la cantidad de glucosa de las muestras hidrolizadas utilizando el método de DNS, para poder evaluar cuales son las mejores condiciones en las que se produjo mayor cantidad de glucosa.

3.5.2. Preparación de reactivo.

En un beaker (A) de 250 mL de capacidad se introdujo 30mL de agua destilada y se colocó en un calentador con agitación magnética moderada y constante (200 rpm), se agregó lentamente 30 gr de tartrato de sodio y potasio. En otro beacker (B) de 100 mL de capacidad se introdujo 20 mL de agua destilada y se agregó 1.6 gr de hidróxido de sodio. En un tercer beacker (C) de 100 ml de capacidad se colocó 30 mL de agua destilada y se disolvió 1 gr de reactivo DNS. En el beaker (A) estando en el calentador y agitador se adicono el contenido del beaker (B) luego se agregó el contenido del beaker (C), se mantuvo esta mezcla en calor y agitación hasta lograr una homogeneidad. Finalmente, estando la mezcla homogénea fue colocada en una probeta de 100 mL de capacidad y se aforo hasta 100 mL con agua destilada. Así estuvo listo el reactivo para ser guardado en un recipiente ámbar dentro del laboratorio hasta su pronto uso.

3.5.3. Método DNS.

Primero, se realizó curva patrón para la determinación de glucosa (gr/L); el cual, en un matraz erlenmeyer (250 mL) se preparó 50 mL con 5 g/L (solución madre de glucosa) a 505 nm. (véase Anexo 05). De las muestras reservadas en tubos eppendorf (1 mL), se tomó 0.25 mL de estos sobrenadantes centrifugados y se colocó en tubos de ensayo; además, se agregó 0.25 mL de DNS y 2.5 mL de agua destilada a cada tubo de ensayo para luego llevarlo a 300 rpm logrando así su homogenización. Después las muestras se colocaron en baño maría a 37°C por 5 min, luego se procedió a leerlas en el espectrofotómetro con una longitud de onda de 505 nm y se calculó la concentración de glucosa presente en cada tubo (Véase Anexo 04).

3.6. Método para recolección de datos.

El método desarrollado en esta investigación y la buena recopilación de datos nos otorgó información clave para alcanzar los objetivos específicos. La cáscara de naranja, seca, hecha partículas y tamizada (2mm), se estudió para obtener datos iniciales antes de empezar los experimentos. La muestra se guardó en un frasco hermético con el objetivo de preservar sus condiciones idóneas. La cáscara de naranja se sometió a hidrólisis alcalina e hidrólisis enzimática, adecuándose a los niveles mencionados en la tabla de variaciones.

3.7. Análisis estadístico e interpretación de datos.

Se adoptó un análisis de varianza (ANOVA) con un grado de significancia menor al 0.5; dichos cálculos se realizaron empleando el software IBM SPSS versión 27 con un nivel de confianza del 95 %, con el fin de decretar la significancia estadística de efectos de dichas variables independientes (concentración de cascara de naranja y temperatura) y sus interacciones originando la variable de respuesta (producción de glucosa). La hipótesis determinara si cada factor influye o no, en el efecto significativo referente a la producción de glucosa. Cada muestra se hizo por triplicado, 9 muestras en total, se determinó dicha cantidad de muestras con el objetivo de reducir el nivel de error, los datos que se recolectaron de las respuestas del diseño experimental factorial 3^2 (entendiéndose que posee 2 factores con 3 niveles) fueron evaluados por ANOVA y el Software IBM SPSS versión 27. La prueba post hoc de Tukey se utilizó después de ANOVA para determinar

cuáles grupos son significativamente diferentes entre sí.

Se explica que los niveles de la temperatura, así como también la interacción de los niveles de la temperatura con la concentración de cascara de naranja no afectaron en la producción de glucosa, puesto que el valor $p > 0,05$, sin embargo, los niveles de la concentración de cascara de naranja influyo de manera significativa en la producción de glucosa, ($p < 0,05$).

3.8. Obtención de parámetros cinéticos Km y Vmax de Michaelis-Menten.

La velocidad a la que los sustratos se transforman en productos durante una reacción enzimática que se lleva a cabo en condiciones de estado estacionario depende tanto de las concentraciones de la enzima como de los sustratos. Esta relación se puede expresar de manera matemática a través de la ecuación de Michaelis-Menten:

$$V_0 = \frac{(V_{max} * [S])}{(K_m + [S])}$$

Donde:

V₀= Velocidad inicial.

V_{max}= Velocidad máxima.

S= Sustrato.

K_m= Constante de Michaelis.

La forma más común de obtener estos datos es mediante mediciones de la velocidad inicial de reacción en diferentes concentraciones de las sustancias que la influyen. La estrategia más efectiva para hacerlo consiste en linealizar las ecuaciones cinéticas. Mediante la medición del intercepto o de la pendiente de la recta resultante, se pueden evaluar los parámetros Km y Vmax.

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación de parámetros físicos a cascaras de naranja como etapa previa al pretratamiento alcalino.

El análisis de los parámetros físicos de las cascaras de naranja se realizó en la Universidad Nacional del Santa, dentro de los laboratorios de la facultad de ciencias, dando como resultado la siguiente tabla.

Tabla 04: *Parámetros físicos (%) de la cascara de naranja (humedad, cenizas, pH, solidos solubles (°Brix), grasa, lignina) evaluados dentro del laboratorio de la UNS*

Parámetro	Valor
Humedad	87.7%
Cenizas	1.28%
pH	3.93
Solidos Solubles (°Brix)	7.1
Grasa	0.2
Lignina	3.2

4.2. Concentración y temperatura adecuada de reacción enzimática en cascaras de naranja pretratadas con enzimas celulosas, empleando el método DNS como indicador y leída en espectrofotómetro a 505 nm

Los resultados de la hidrólisis enzimática de las cascaras de naranja en el espectrofotómetro se obtuvo en absorbancia (véase anexo 04). Para saber la concentración de glucosa obtenida bajo diferente concentración de sustrato y temperaturas, se realizó una curva patrón de glucosa (véase anexo 05). De esta manera se logró cuantificar la concentración de glucosa obtenida de cada muestra en el tiempo.

Tabla 05: Resultados de las concentraciones de glucosa g/L expresadas en el tiempo por el método DNS, utilizando cáscaras de naranja hidrolizadas como materia prima.

	2%	3.5%	5%	Tiempo (hora)
40	0.00	0.00	0.00	0
	0.03	0.07	0.11	3
	0.04	0.11	0.19	6
	0.05	0.13	0.29	9
	0.05	0.21	0.30	12
	0.16	0.33	0.43	15
	0.20	0.52	0.86	18
	0.23	0.55	0.98	21
	0.26	0.59	1.07	24
45	0.00	0.00	0.00	0
	0.04	0.19	0.17	3
	0.05	0.32	0.31	6
	0.09	0.42	0.39	9
	0.11	0.63	0.45	12
	0.16	0.69	0.59	15
	0.18	0.97	0.68	18
50	0.00	0.00	0.00	0
	0.02	0.02	0.05	3
	0.05	0.12	0.18	6
	0.06	0.27	0.20	9
	0.11	0.32	0.48	12
	0.18	0.33	0.61	15
	0.26	0.37	0.81	18
0.33	0.40	0.92	21	
0.42	0.47	1.11	24	

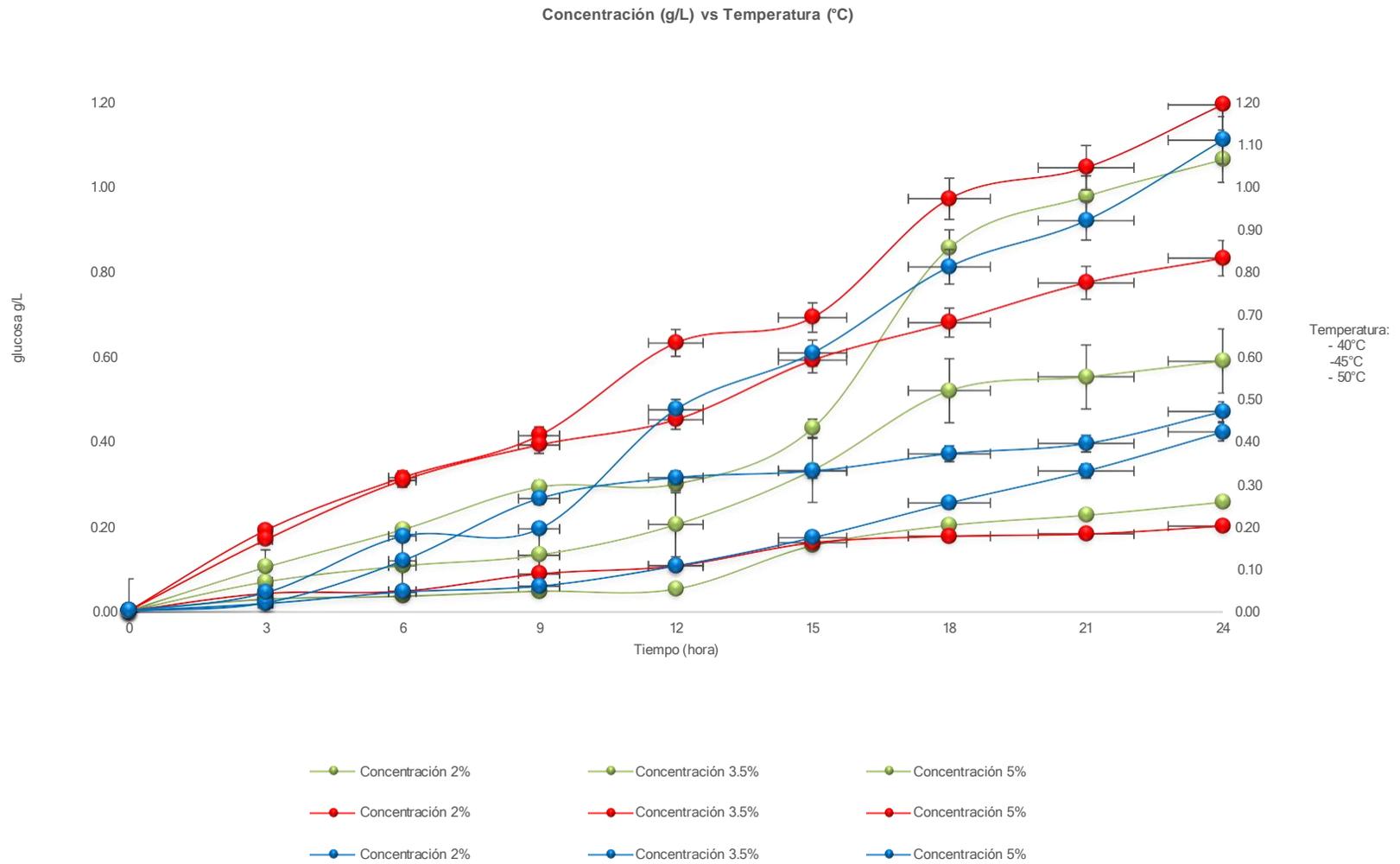


Figura 12. Producción de glucosa en el tiempo de diferentes temperaturas y concentraciones de cáscara de naranja

A partir de los resultados obtenidos en la tabla 05, se plasmó en la figura 12, todos los datos según el tiempo y la temperatura de cada muestra experimental.

En la figura 12, podemos visualizar los resultados obtenidos con un margen de error de 5% teniendo como ejes los gramos por litros obtenidos vs tiempo en que se tomó las muestras. En la Tabla 05; se observa cada concentración (2%, 3.5% y 5%), con relación a 40°C, 45°C y 50°C; obteniendo sus datos por la técnica de colorimetría DNS.

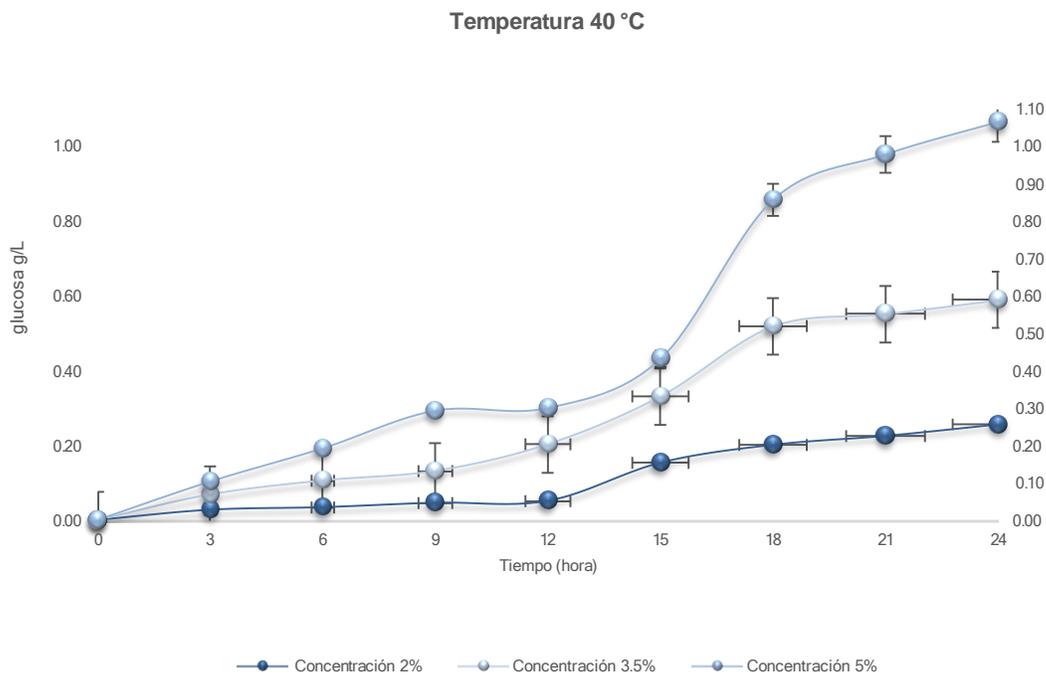


Figura 13. Producción de glucosa en el tiempo a 40°C y usando concentraciones de cáscara de naranja pretratadas al 2%, 3.5% y 5%.

En la figura 13 se encuentran solo las concentraciones de glucosa (g/L) obtenidas a 40°C, siendo 1.07 g/L la concentración dominante producida en la hidrolisis enzimática bajo una concentración de cáscaras de naranja al 5%; por otro lado, la concentración de nivel inferior producido fue de 0.26 g/L bajo una concentración de cáscaras de naranja al 2%.

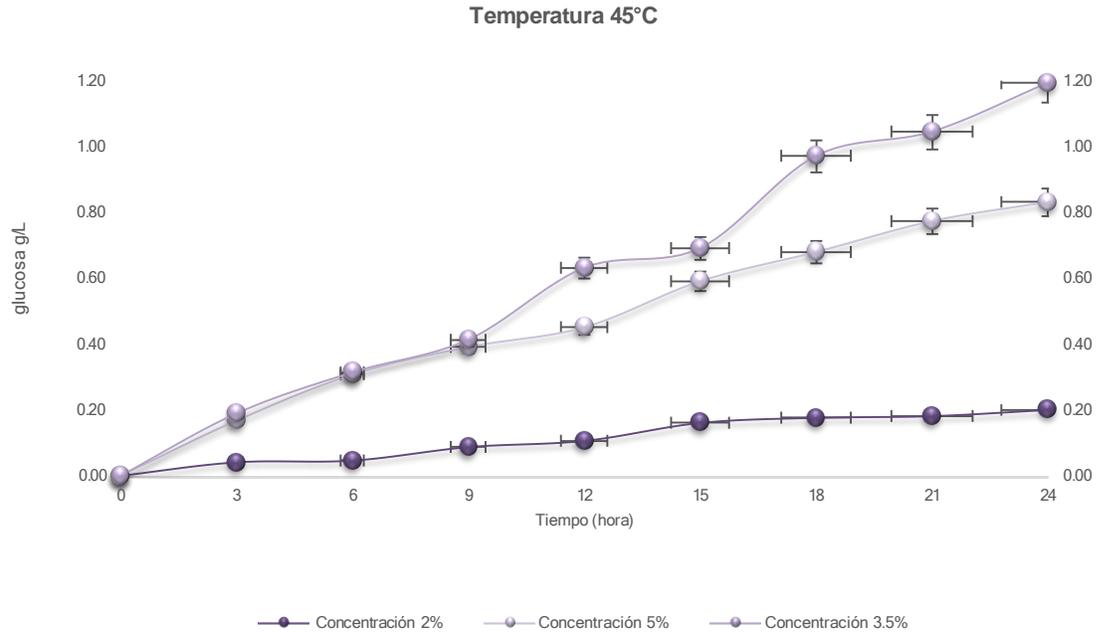


Figura 14. Producción de glucosa en el tiempo a 45°C y usando concentraciones de cáscara de naranja pretratadas al 2%, 3.5% y 5%.

En la figura 14 se encuentran solo las concentraciones de glucosa (g/L) obtenidas a 45°C, siendo 1.20 g/L la concentración dominante producida en la hidrólisis enzimática bajo una concentración de cascaras de naranja al 3.5%; por otro lado, la concentración de nivel inferior producido fue de 0.20 g/L bajo una concentración de cascaras de naranja al 2%.

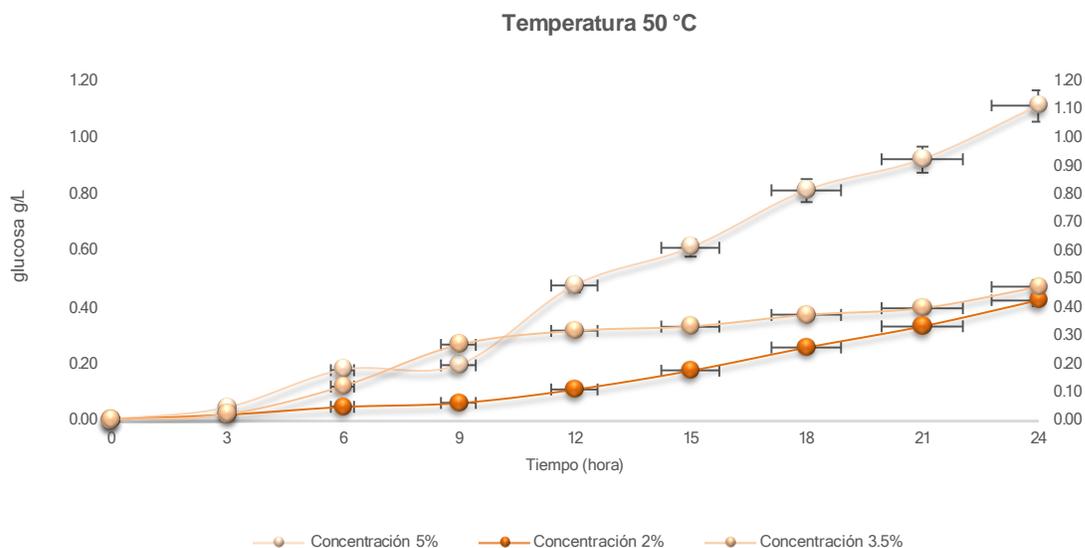


Figura 15. Producción de glucosa en el tiempo a 50°C y usando concentraciones de cáscara de naranja pretratadas al 2%, 3.5% y 5%.

En la figura 15 se encuentran solo las concentraciones de glucosa (g/L) obtenidas a 50°C, siendo 1.11 g/L la concentración dominante producida en la hidrolisis enzimática bajo una concentración de cascara de naranja al 5%; por otro lado, la concentración de nivel inferior producido fue de 0.42 g/L bajo una concentración de cascara de naranja al 2%.

Como conclusion del trabajo experimental, se consideró la temperatura de 45°C (variable independiente) como la idónea para la producción de glucosa, es por ello que se realizó la cinética enzimática bajo dicha temperatura por un periodo de 60 min. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 06.

Tabla 06: Intercepción de la inversa del sustrato y la velocidad de reacción enzimática de la enzima celulasa comercial.

S	V	1/S	1/V
0.02 g/L	0.0008 g/L*min	50	1250
0.035 g/L	0.0012 g/L*min	28.6	833.33
0.05 g/L	0.0015 g/L*min	20	666.67

Con los datos obtenidos de la tabla 06, se realizó la figura 16 logrando una línea de tendencia y la ecuación de dicha pendiente.

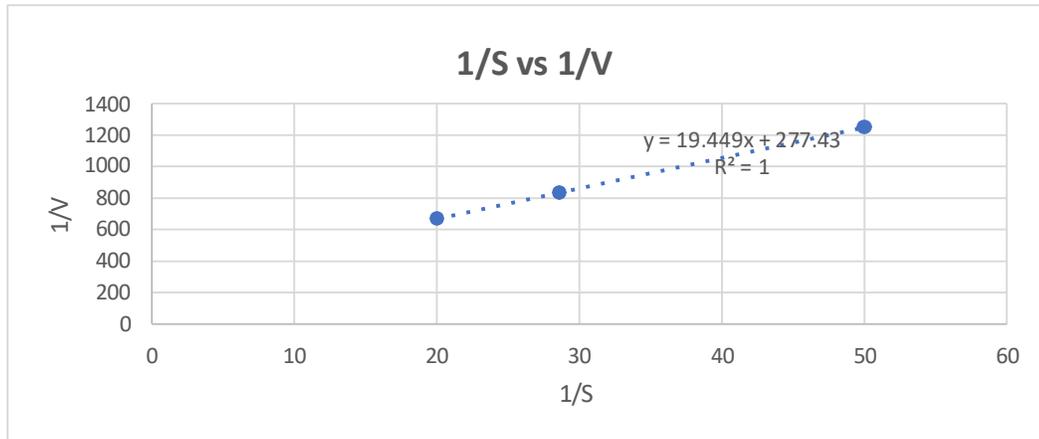


Figura 16. Intercepción de la inversa de velocidad y la inversa de concentración de cascaras de naranja pretratadas al 2%, 3.5% y 5%.

En la figura 16 se realizó la linealización con Lineweaver-Burk usando la inversa del sustrato y la inversa de la velocidad, con la finalidad de obtener los parámetros cinéticos de la constante del sustrato (Km) y la velocidad máxima de reacción (Vmax).

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{max}} * \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Siendo:

$$y = 19.449 * x + 277.43$$

$$19.449 = \frac{K_m}{V_{max}} \quad 277.43 = \frac{1}{V_{max}}$$

$$K_m = 19.449 * V_{max} \quad V_{max} = \frac{1}{277.43}$$

$$K_m = 19.449 * 0.0036 \quad V_{max} = 0.0036$$

$$K_m = 0.070$$

Figura 17. Obtención de Km y Vmax por medio de la ecuación de linealización.

A partir de la ecuación obtenida en la figura 16, se calculó el K_m y V_{max} como se muestra en la figura 17; finalmente los resultados se plasmaron en la tabla 07 siendo 0.0036 g/L x min de Velocidad máxima y 0.070 g/L de K_m .

Tabla 07: *Parámetros cinéticos de la enzima celulasa comercial.*

Parámetros cinéticos	
V_{max}	0.0036 g/L x min
K_m	0.070 g/L

4.3. Análisis estadísticos.

En la tabla 08, se explica que los niveles de la temperatura ($p=0.288$), así como también la interacción de los niveles de la temperatura con la concentración de cascara de naranja ($p=0.159$) no afectaron en la producción de glucosa, puesto que los valores de p son mayores que 0.05; sin embargo, los niveles de la concentración de cascara de naranja ($p=0.000$) influyo de manera significativa en la producción de glucosa, siendo su valor de p menor a 0.05.

Tabla 08: Análisis estadístico de los tratamientos de tres concentraciones de cascara de naranja (2%, 3.5% y 5%) y 3 diferentes temperaturas (40°C, 45°C y 50°C).

Fuentes de variación	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p
Temperatura	,192	2	,096	1,265	,288
Concentración de Cascara de Naranja	1,731	2	,866	11,391	,000
Temperatura * Concentración de Cascara de Naranja	,518	4	,129	1,704	,159
Error	5,471	72	,076		
Total	7,913	80			

En la tabla 09, se aprecia que los niveles de concentración de cascara de naranja que presentan letras distintas han influido significativamente en la producción de glucosa, siendo la concentración al 2% de cascara de naranja el que permitió el menor promedio de producción de glucosa y la concentración al 5% de cascara de naranja logró el mayor promedio de glucosa. Confirmando que la producción de glucosa dependerá directamente de la concentración de cascara de naranja.

Tabla 09: Comparación múltiple de Tukey

HSD Tukey			
Concentraciones de cascara de naranja hidrolisada	N	Subconjunto de medias	
		1	2
2,0	27	0,128336	a
3,5	27		0,381406 b
5,0	27		0,474295 b
Sig.		1,000	0,435

La prueba de comparaciones múltiples de Tukey sirvió para evaluar la producción de glucosa a partir de las tres concentraciones hidrolizadas de cascara de naranja (*citrus sinensis*) tratadas con celulasas comerciales. Cabe resaltar que este análisis se realizó basado en los resultados obtenidos en la tabla 05.

4.4. Discusión

Para los autores Chico y Sandoval (2015), en cuanto a hidrolisis alcalina sus resultados adecuados son: al 8% NaOH por un tiempo de 85 minutos a 121°C y su hidrolisis enzimática utilizando celulasa al 5% p/v a una temperatura idónea de 45°C; siendo diferente en esta investigación en el ámbito de la hidrolisis alcalina. Esto también depende del sustrato a trabajar como las cascarillas de arroz, optimizando su hidrolisis alcalina a un tiempo de 85 minutos. La diferencia con este autor, es en la determinación del tiempo, puesto que sus parámetros nos otorgaron una diferencia 15 minutos; el cual, podría afectar, sin embargo, es por el tipo de sustrato a tratar. Se deduce que la pared celular de la cascara de naranja es más vulnerable a efectos químicos mientras que la cascarilla de arroz es más firme y congruente a estos cambios por ello se aplicó más tiempo en el tratamiento alcalino.

De tal modo autores como Alikasturi, A. S., Shaharuddin, S., Anuar, M. R., Mohamad Radzi, A. R., Mohd Asnawi, A. S. F., Husin, A. N., Aswandi, N. A., & Mustapha, A. I. (2018), utilizaron la cascara de fruta de diferentes especies, piña (*Ananas Comosus*), mango (*Mangifera Indica*) y plátano (*Musa Sapientum*), como sustrato asegurando una extracción de glucosa de estos residuos. Por ello, consideramos que brinda un valor agregado sobre el impacto ambiental. Los desechos orgánicos que son vistos como sustrato por su contenido lignocelulósico demostraron ser idóneos al momento de obtener glucosa esto debido al pretratamiento alcalino empleando NaOH, procedimiento que se aplicó en esta investigación para la desnaturalización de las cascara de naranja, sumado al bajo costo y fácil separación de elementos después del pretratamiento.

Para los autores Ali, N., Che Aziz, C. A., & Hassan, O. (2015), que utilizaron otra variedad de sustrato y un pretratamiento adicional (hidrolisis acida), tomando en cuenta como etapa inicial al pretratamiento alcalino, al igual que nuestra investigación, estos autores obtuvieron mejores resultados (0.895 g/L para la pulpa de coco y 0.550 g/L para el racimo vacío de coco) debido al empleo de la hidrolisis acida ya que es mas agresiva al momento de separar la lignina de la pared celular, quedando expuesta la región cristalina originando mas glucosa en dicho procedimiento. Mencionar que la hidrolisis acida tomo más tiempo al efectuarla (2 horas) al comparar con el proyecto actual utilizando hidrolisis alcalina (1 hora). Entonces, todos los autores antes mencionados tienen la finalidad de aprovechar los recursos; y también, viene llevándose a cabo desde el 2015 con Ali, N., Che Aziz, C. A., & Hassan, O., realizando pretratamiento ácido y alcalino para obtener su recuperación en azúcares, al igual que en esta investigación.

Para Tejada et al. (2014), que realizó la caracterización de estas cáscaras, obtuvo porcentaje de humedad 69.4, y en este proyecto de investigación se obtuvo más, siendo 87.7%, considerando el ambiente de donde lo obtuvimos y preparamos. Además, para Barroso (2010), asegura que se debe realizar pretratamientos a estos tipos de residuos para separar los compuestos.

Para Chiaramondi et al. (2012), nos asegura que la eliminación de lignina preserva los polisacáridos, para que así la obtención de la celulosa no sea compleja; por ello, nuestro proceso de hidrólisis alcalina, es menos invasivo, y así obtenemos una conversión vegetal a azúcares fermentables.

La ejecución de un pretratamiento térmico a una temperatura de 111°C por un espacio de 15 minutos posibilita alcanzar resultados totalmente diferentes obtenidos por Mejia G. et al, (2007) quienes lograron rendimientos muy favorables con una temperatura de extracción de 98°C. La productividad con referente a los tratamientos térmicos es menos adecuada a comparación de los tratamientos alcalinos ya que se genera residuos y consta de tiempo y costo la separación de estas. En los tratamientos térmicos la celulosa no es afectada de tan magnitud por la temperatura, a lo contrario con la hemicelulosa que si resulta degradada. En el trabajo de investigación actual el proceso de hidrolisis alcalina se llevó a

cabo por un tiempo de 60 minutos a 120°C con el fin de desprender la celulosa y se convierta en un material poroso.

Continuando el análisis demostrativo con respecto a hidrolisis enzimática, para obtener una mejor cantidad de azúcares reductores (glucosa) es adecuado el uso de enzimas celulasas a una concentración del 5% p/v, cabe mencionar que dicha proporción es indicada en la ficha técnica del proveedor Novozymes, una concentración entre 1-5%, resultando una cantidad similar en el trabajo de Mejia L. et al 2007, en ella se utilizó la enzima celluclast la cual trabaja específicamente sobre la celulosa dando como resultados positivos y superiores. Se comprende que la celulosa que se degrada, en su mayoría se transforma en azúcares reductores (glucosa), por conocimiento teórico y práctico se demuestra que la celulasas es una proteína de alta selectividad que garantiza la conversión de la celulosa y hemicelulosas en su casi totalidad en unidades de glucosa fermentables.

No obstante, la relación de los autores mencionados es el sustrato, puesto que, utilizan cáscaras de naranja y afirman que poseen sensibilidad a bajas temperaturas (Tejada et al., 2010). Al igual que, Blume (1991); afirma utilizar condiciones reguladas, en el caso de la temperatura, para que así no haya problema de corrosión, entonces sugiere exponer entre 40°C – 50°C.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Los análisis fisicoquímicos de las cascarras de naranja son los siguientes: humedad (87.7%), cenizas (1.28%), pH (3.93), Solidos Solubles “Brix” (7.1), grasa (0.2) y Lignina (3.2); para así realizar un pretratamiento con un pH alcalino logrando de esta forma mayor acceso a la celulosa (eliminar lignina y facilitar el acceso enzimático a la celulosa).
- Se demostró que las variables independientes determinadas como 45°C y 3.5% de concentración de cascarras de naranja son las condiciones óptimas observadas, donde se obtuvo una concentración máxima de glucosa de 1.2 gramos por litro, siendo la mejor producción de glucosa con respecto a los demás ensayos.
- Se verificó mediante análisis ANOVA que la concentración de cáscara de naranja tuvo un efecto significativo sobre la producción de glucosa ($p < 0.05$), mientras que la temperatura no presentó efecto significativo ($p = 0.288$).
- Los valores determinados de los parámetros cinéticos para las condiciones óptimas del proceso, representan una baja afinidad del sustrato por la enzima siendo el valor de K_m 0.070 g/L y baja reactividad con una V_{max} de 0.0036 g/L x min.
- Estos hallazgos contribuyen al desarrollo tecnologías limpias para la valorización de residuos cítricos, con potencial aplicación en la producción de azúcares fermentables para bioprocesos industriales.

5.2. Recomendaciones.

- Impulsar el desarrollo en investigación acrecentando variables dependientes e independientes empleando cáscara de naranja y/o otros cítricos ricos en material lignocelulósico, recolectados de diferentes negocios de alimentos.
- Promover el uso de los residuos orgánicos en nuestra sociedad para reducir la contaminación.

- El uso de HPLC o espectrofotometría con kit enzimático para cuantificar glucosa.
- Aplicar pectinasa antes o junto con celulasas ya que mejora el rendimiento al reducir la viscosidad y ayuda a liberar celulosa atrapada en la matriz de pectina.
- Para eliminar compuestos fenólicos, lípidos y romper la estructura de lignocelulosa con el objetivo de exponer la celulosa se recomienda una destilación previa con hexano o etanol con el fin de retirar aceites esenciales (especialmente limoneno) antes del pretratamiento alcalino.

VI REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y VIRTUALES

Ahuja, J. (2011). *Degradación de azúcares por hidrólisis ácida*. [Tesis de título, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo-Morelia-México] , 69 pp.

Alcántara, S., S. M. y Correa, V., E. E. (2018). *Efecto de la temperatura en el pretratamiento biológico del bagazo de caña de azúcar (Saccharum officinarum) por Pleurotus ostreatus en fermentación sumergida para la síntesis de celulasas por Trichoderma harzianum cultivado en placa*. Repositorio de la universidad nacional del Santa, Perú. <https://repositorio.uns.edu.pe/handle/20.500.14278/3199>

Álvarez, A., Salgado, R., García, E., Domínguez, M., Granados, J., Aguirre, A. y Mendoza, A. (2012). Aprovechamiento integral de los materiales lignocelulósicos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 13(4), 140-150.

AOAC. 2007. *Association of Official Agricultural Chemists. Official Methods of Analysis*. Association of Analytical Chemist. Washington D.C. 16th ed., 1141p.

Ballesteros, M., J.M. Oliva, Negro M.J., Manzanares P., Ballesteros I. (2004). Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochemistry* 39, 1843-1848.

Baraybar, S., A. L, y Monje, S., C. R. (2017). *Obtención de celulasas de Trichoderma sp. A partir de orujo de uva para producir Bioetanol usando hojas de mazorca de maíz*. Repositorio de la Universidad Nacional Católica de Santa Maria de Arequipa - Perú. <https://repositorio.ucsm.edu.pe/handle/20.500.12920/6274>

Barroso, M. (2010). *Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de una biorrefinería*. [Tesis de título, Universidad Politécnica de Madrid], 1-112pp.

Ali, N., Che Aziz, C. A., & Hassan, O. (2015). Pretratamiento alcalino e hidrólisis ácida de pulpa de coco y racimos vacíos de fruta para producir glucosa. Instituto Ibnu Sina de Investigación Científica e Industrial, University Technology Malaysia

Blume, J.E., y Herberl, E. (1991). *A Dictyosteliurn discoideurn Cellulase Is a Member of a Spore Germination-specific Gene Family*. The Journal Of Biological chemistry. 15432-15437.

Cacesa, P., Hubble, J. (1990); Tecnología de las Enzimas; editorial acriba S.A. Zaragoza -España.

Cardona, T. A. M., Pinzón, B. M. L. (2008). *Caracterización de la cáscara de naranja para su uso como material bioadsorbente*. Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas. Universidad de Pamplona Pamplona, Colombia. 6(1), 1-23.

Chiaramonti, D., Prussi, M., Ferrero, S., Oriani, L., Ottonello, P., Torre, P., y Cherchi, F. (2012). Revisión de los procesos de pretratamiento para la producción de etanol lignocelulósico, y el desarrollo de un método innovador. *Biomass and Bioenergy*, 5(4), 1-11.

Chico H. & Sandoval D.(2015). Determinación de las concentraciones de enzimas celulasa y b-glucosidasa para la obtención de azúcares fermentables a partir de cascarilla de arroz. Universidad Nacional del Santa, Peru.

Chirinos, R., Mendoza, R., Aguilar, G., A., y Campos, D., (2017). *Hidrólisis química y enzimática de extracto de yacon (Smallanthus sonchifolius) para la producción de fructuosa*. [Archivo pdf]. Revista de la sociedad química del Perú, 83(2). 200-212. <https://www.redalyc.org/pdf/3719/371952416007.pdf>

Criollo, LI., G. P. (2018). *Extracción de celulosa de cáscaras de naranja estudio del método y aplicaciones*. [Archivo pdf]. Ingeniería química. Facultad de Ciencias. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/8663>

Alikasturi, A. S., Shaharuddin, S., Anuar, M. R., Mohamad Radzi, A. R., Mohd Asnawi, A. S. F., Husin, A. N., Aswandi, N. A., & Mustapha, A. I. (2018). Extracción de glucosa mediante hidrólisis alcalina de cáscaras de plátano (*Musa Sapientum*), piña (*Ananas Comosus*) y mango (*Mangifera Linn*)

Cunningham, R. y López G. (1994). Etanol de lignocelulósicos tecnología y perspectivas, *programa CYTED*, Santiago de Compostela.

Dutta, R. (2008). Fundamentals of biochemical engineering. *Bio Chemistry*, 1(2). <https://doi.org/10.1007/978-3-540-77901-8>

Eveleigh, D. E., Mandels, M., Andreotti, R. y Roche, C. (2009). Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnology for Biofuels*, 2(1), 21. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-2-21>

Florencio, C., Cunha, F. M., Badino, A. C., y Farinas, C. S. (2015). *Validation of a novel sequential cultivation method for the production of enzymatic cocktails from Trichoderma strains. Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(3), 1389-1402. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1357-5>

Hendricks, A, & Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100, 10-18.

Hernández D., Ferrera R. y Alarcón A. (2019). *Trichoderma: Importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial*. *Rev. Chilean J. Agric. Anim. Sci., ex Agro-Ciencia* 35(1). 98-112. https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0719-38902019000100098

Humiri, H., H. (2020). *Aprovechamiento del orujo de uva (Vitis vinífera L.) para la obtención de etanol por vía hidrólisis alcalina y enzimática*. [tesis de pregrado] <https://repositorio.unam.edu.pe/handle/UNAM/225>.

Kumar P., Barret D., Delwiche M., y Stroeve P. (2009). Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 48(8), 3713-3729.

López, M., J., Soto, C., N. O., Rutiaga, Q., O. M., Medrano, R., H., Arévalo, N., K. (2009). *Optimización del proceso de obtención enzimática de azúcares fermentables a partir de aserrín de pino*. *Revista Int. Contaminación Ambiental*, 25(2). 95-102. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v25n2/v25n2a4.pdf>

Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>

Olvera, P. (2003). *Aislamiento de levaduras que tengan la capacidad para degradar lignina y búsqueda de algunos genes implicados en dicha degradación*. Universidad de las Americas Puebla. Mexico.

Pandey, A., Negi, S., y Soccol, C. R. (2017). *Current developments in biotechnology and bioengineering: Production, isolation and purification*. Editorial Elsevier.

Paredes, D., Álvarez, M., y Silva, M. (2010). *Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos para ser utilizadas en el proceso de obtención de bioalcohol de residuos del cultivo de banano*. *Revista Tecnológica ESPOL – RTE*, 23(1), 81-88.

Ritchie, R.J. y Prvan, T., Current Statistical Methods for Estimating the Km and Vmax of Michaelis-Menten Kinetics, doi: 10.1016/S0307-4412(96)00089-1, *Biochemical Education*. (en línea), 24(4): 196-206 (1996)

Rocha, V., A. L., Maeda, R. N., Pereira, N., Kern, M., F., Elias, L., Simister, R. y McQueen-Mason, S. J. (2016). Characterization of the cellulolytic secretome of *Trichoderma harzianum* during growth on sugarcane bagasse and analysis of the activity boosting effects of swollenin. *Biotechnology Progress*, 32(2), 327-336. <https://doi.org/10.1002/btpr.2217>

Salazar, P., C., López, P., A. y Cano, S., J. A. (2012). Efecto del pH y la temperatura en la hidrólisis enzimática de subproductos de la industria bovina. *Revista La sallista*, 9(2). http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-44492012000200004

Salcedo, M., J. G., López, G., J. E., y Flórez, P., L. M. (2011). *Evaluación de Enzimas*

para la hidrólisis de residuos (hojas y cogollos) de la cosecha de caña de azúcar
[Archivo pdf]. Nro.169, pp: 182-190.
<https://www.proquest.com/openview/cb9aeb9ee07824c54af13e0ad6284ac8/1.pdf?pq-origsite=gscholar>

Sánchez, O., R. y Vázquez, V., J. (2017). Hidrólisis de residuos de naranja para la obtención de carbohidratos fermentables. *Revista de Investigación y Desarrollo*, 2(4) 63-70.

Schinner, F. y Von Mersi, W. (1990). Xylanase, CM-cellulase and invertase activity in soil: An improved method. *Rev. Soil Biol. Biochem*, 22(4), 511-515.

Taiz, L. y Zeiger, E. (2002). *Fisiología vegetal tercera edición*. Editorial Sinauer Associates INC. 300pp.

Tejeda, L., Marimón, W. y Medina M. (2014). Evaluación del potencial de las cáscaras de frutas en la obtención de bioetanol. *Microbiol*, 5(1), 4-9.

Tejada, L., Tejada, C., Villabona, A., Alvear, M., Castillo, C., Henao, D., Marimón, W., Madariaga, N. y Tarón, A. (2010). Producción de bioetanol a partir de la fermentación alcohólica de jarabes glucosados derivados de cáscaras de naranja y piña. *Rev. Educación en Ingeniería*, 52 (10),120-125.

Valero, F. (1998) *Módulo de Enzimas, Ingeniería Bioquímica*. Editorial Departamento de Ingeniería Química.

Young, R. y Rowell, R. (1986). *Cellulose: Structure, Modification, and Hydrolysis*. Editorial Wiley Interscience. <https://doi.org/10.1002/pol.1987.140250313>

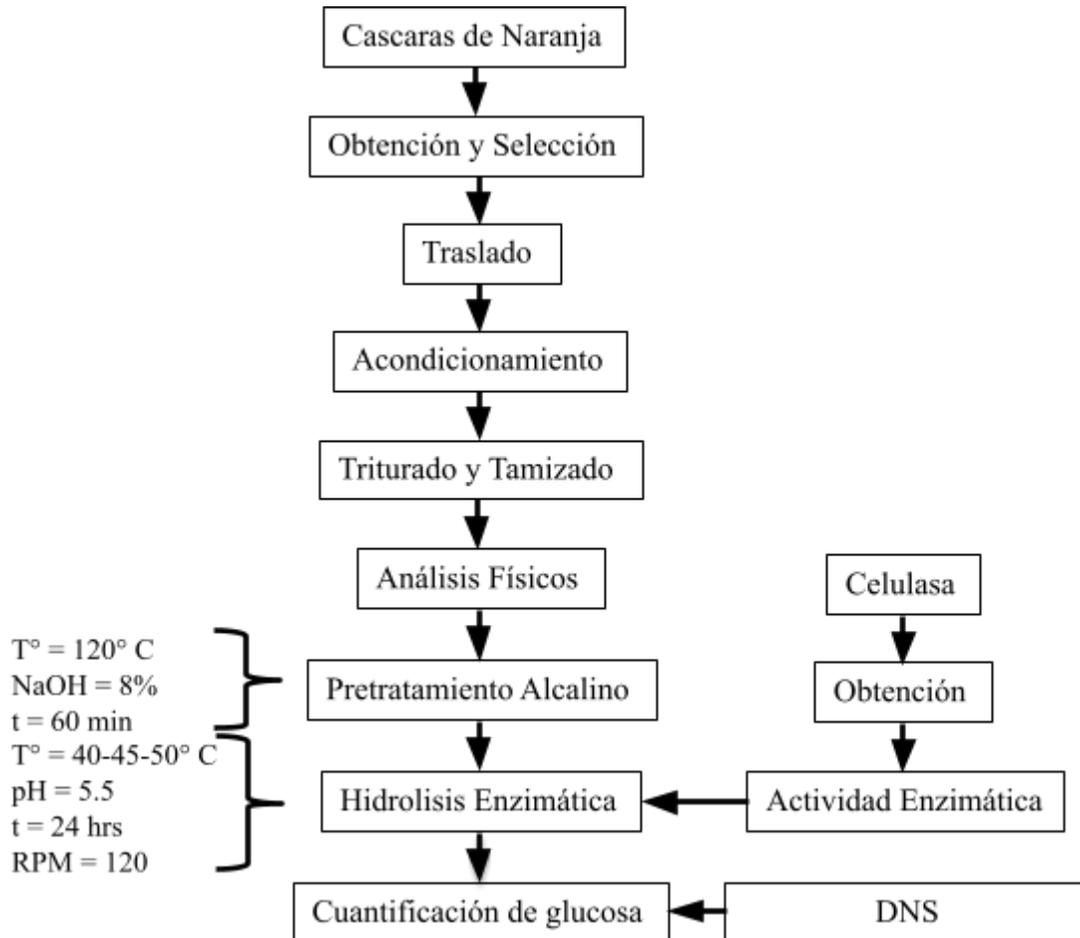
Wang, M. Q. ; Xu, Z. R. ; Sun, J. Y. ; Kim, B. G., 2008. Effects of enzyme supplementation on growth, intestinal content viscosity, and digestive enzyme activities in growing pigs fed rough rice-based diet. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 21(2): 270-27

Zhang, Y., Himmel, M. y Mielenz, J. (2006). Outlook of cellulase improvement: screening and selection strategies. *Rev. Science Direct, Biotechnology Advances*, 24(5),452-481.

VII ANEXOS

Anexo 01

Operaciones realizadas para la obtención de glucosa.



Anexo 02

Ficha técnica de enzima celulasa de la empresa Novozyme



NOVOZYMES' CELLULOSIC ETHANOL ENZYME KIT

– Enzymes for the hydrolysis of lignocellulosic materials



ENZYMES FOR THE HYDROLYSIS OF LIGNOCELLULOSIC MATERIALS

You have received the Novozymes Cellulosic Ethanol Enzyme Kit. This document contains useful information designed to help you understand more about cellulosic ethanol production and how our innovative enzymes can optimize your plant processes and enable commercialization.

Following this brief overview of our work with cellulosic ethanol, you will find basic application information regarding the use of the enzymes contained in this sample kit. More specific details about the characteristics, activity, dosage, etc. of each enzyme are included in the Appendices beginning on page 6.

Overview

Novozymes leads the way in cellulosic ethanol through broad partnerships that employ many feedstocks and processes. We provide the industry's best enzyme solutions and process optimizations to enable commercialization with partners and in our own labs.

We take a holistic approach in developing next-generation bioinnovations to meet your company's ever-changing needs. Along with our unprecedented R&D efforts, we also work closely with our partners to bring different competencies together in an effort to fully understand the critical relationship between process mechanics and enzymes. Together we can create solutions that realize the promise of renewable energy.

Cellulosic ethanol can be a major source of sustainable energy. Many feedstocks – including corn cobs, wheat straw, woody biomass, and municipal solid waste – are readily available, and it is estimated that cellulosic ethanol will reduce CO₂ emissions by 90% compared to petroleum-based fuels.

The complex structure of biomass make it more difficult to convert into ethanol than traditional starch substrates. This has presented unique technical and economic challenges in bringing cellulosic ethanol to market. Enzymes are vital in the conversion of biomass to ethanol, and the state-of-the-art Novozymes Cellic® solutions make the technology available at a commercially viable cost. Our groundbreaking innovation is a result of our commitment to creating sustainable solutions that improve the environment and enhance your business.

We are working every day to develop technologies that allow more types of biomass to be turned into commercially viable biofuel.

Our biomass test kit provides you with our leading enzymes for enabling the conversion of a variety of cellulosic feedstocks.

Application

In order to maximize the yield from enzyme hydrolysis, a combination of enzyme activities must be used. The optimal enzyme blend greatly depends on the composition of the various fractions (cellulose, hemicellulose, and lignin) in the biomass substrate. Experiments should be conducted to determine which enzymes and pretreatment method will work best on a specific feedstock.

The following tables contain information on the enzymes included in the test kit. The suggested enzyme dosage is based on weight percentage relative to the amount of biomass (total solids) on a dry basis. The required enzyme dosage may vary significantly based on the specific composition of the biomass feedstock and the particular physical and/or chemical pretreatment method used. Even though some of the enzymes have high temperature ranges, they will still work at lower temperatures, albeit at reduced activity. Operating at temperatures above the upper limit can result in irreversible enzyme denaturation. The general impact of temperature on enzyme activity and stability is shown in Appendix B.



Find out more at
www.bioenergy.novozymes.com

NS number	Enzyme type	Description
NS22086	Cellulase complex	<ul style="list-style-type: none"> - Primary enzyme for use in the hydrolysis of lignocellulosic material - Catalyzes the breakdown of cellulosic material into glucose, cellobiose, and higher glucose polymers - Can be used to reduce the viscosity or increase the extraction yield of various products of plant origin - The main reaction products of cellulose hydrolysis using NS22086 are cellobiose and glucose - Testing for synergy with NS22118 and NS22083 is recommended to maximize performance
NS22083	Xylanase	<ul style="list-style-type: none"> - Purified endoxylanase with a high specificity toward soluble pentosans - Able to liberate pentose sugars from biomass hemicellulose fractions - Can be used to supplement NS22086 for pretreatment that leaves a significant portion of the hemicellulose intact (i.e., neutral-pH or alkaline pretreatment methods)
NS22118	β -glucosidase	<ul style="list-style-type: none"> - Also known as cellobiase; hydrolyzes cellobiose to glucose - Can be used to supplement NS22086 in order to increase the yield of fermentable sugars - Addition should be approximately 0–4% (v/v) of the amount of NS22086 for complete hydrolysis of the available cellulose
NS22119	Enzyme complex	<ul style="list-style-type: none"> - Contains a wide range of carbohydrases, including arabinase, β-glucanase, cellulase, hemicellulase, pectinase, and xylanase - Can break down cell walls for the extraction of useful components from plant tissue - Able to liberate bound materials and degrade a variety of nonstarch polysaccharides - Can be used to supplement NS22086 for substrates containing pectin
NS22002	β -glucanase Xylanase	<ul style="list-style-type: none"> - Contains a mixture of β-glucanase and xylanase enzyme activities - Possesses additional side activities, including cellulase, hemicellulase, and pentosanase - Can be used to supplement NS22086 for pretreatment that leaves a significant portion of the hemicellulose intact (i.e., neutral-pH or alkaline pretreatment methods)
NS22035	Glucoamylase	<ul style="list-style-type: none"> - Used on liquefied starch-containing substrates to produce sugars for fermentation - Works in dedicated saccharification stages as well as simultaneous saccharification and fermentation - Glucoamylases hydrolyze both 1,4- and 1,6-alpha linkages to liberate glucose for subsequent fermentation by the yeast

Table 1. Descriptions of enzymes contained in Novozymes' cellulosic ethanol enzyme kit.

Enzyme classification	Activity ¹	Density ² (g/ml)	pH	Temperature (°C)	Dosage ³ (% w/w (TS))
NS22086 Cellulase complex	1,000 BHU(2)/g	1.15	5.0–5.5	45–50	1–5%
NS22083 Xylanase	2,500 FXU-5/g	1.09	4.5–6.0	35–55	0.05–0.25%
NS22118 β-glucosidase	250 CBU/g	1.2	2.5–6.5	45–70	0.2–0.6%
NS22119 Enzyme complex	100 FBG/g (~ 13,700 PGU/g)	1.19	4.5–6.0	25–55	0.05–0.4%
NS22002 Hemicellulase	45 FBG/g (~ 470 FXU/g)	1.20	5.0–6.5	40–60	0.4–2%
NS22035 Glucoamylase	750 AGU/g	1.15	4.5–5.5	60–70	0.01–0.06%

Table 2. Enzyme activity, density, pH, temperature, and recommended dosage.

1) EGU = Endo-Glucanase Unit, CBU = CelloBiase Unit, FBG = Fungal Beta-Glucanase Unit, PGU = PolyGalacturonase Unit, FXU-5 = Fungal Xylanase Unit, and AGU = AmyloGlucosidase Unit. See Appendix A for further information on activity units.

2) Density values are approximate.

3) The required dosage is heavily dependent on feedstock type, pretreatment technology, and processing conditions. Enzyme dosage requirements may therefore vary significantly.

Pretreatment conditions must be optimized to achieve the maximum conversion of polysaccharides to fermentable sugars while minimizing the enzyme requirement. It is essential to evaluate the pretreated biomass for cellulose digestibility at an appropriate solids concentration.



If the solids concentration in a hydrolysis experiment is too high, nonenzymatic factors can be introduced that will interfere with the interpretation of the results. A range of 2–5% total solids (TS) loading is suggested for determining the efficacy of the pretreatment system. Results can be compared by evaluating the required enzyme dosage per mass of cellulose in the feedstock (cellulose content can be determined chemically) in order to give an indication of the enzymatic digestibility of the pretreated substrate (i.e., the efficiency of the pretreatment technology).

Note: Inhibition of enzymatic hydrolysis

The pretreatment method can create inhibiting products that can reduce the performance of the enzyme, resulting in lower cellulose conversion and/or increased enzyme dosage. Lignin and xylo-oligomer released during the pretreatment process can interfere with enzymatic performance by binding irreversibly to the enzymes or by blocking enzyme access to the substrate. An optimal degree of pretreatment does exist where the carbohydrate enzyme accessibility is maximized while the enzyme (and microorganism) inhibition is minimized.

From a cost perspective, it is normally advantageous to perform hydrolysis at the highest possible total solids in order to achieve maximum sugar concentrations.

However, the higher solids conditions can also mean higher concentrations of soluble compounds in the liquid phase, which may impede enzyme activity. The required enzyme dosage to satisfactorily hydrolyze a substrate is thus a factor of both the accessible cellulose and the relative concentration of inhibitory compounds. It is worthwhile considering how best to simulate your desired process system concentrations relative to the enzyme protein concentration during your evaluation with this biomass kit.

Additional information

We invite you to explore our biomass information site at www.bioenergy.novozymes.com.

Disclaimer

The enzymes provided in this cellulosic ethanol enzyme kit should be used only for the conversion of lignocellulosic materials and should not be used with other materials that are to be used in food.

Risks may be associated with this process, and Novozymes and our affiliated companies and their respective employees, affiliates, and agents will not be liable in respect of any claims that may arise as a result of the materials contained in this cellulosic ethanol enzyme kit.

In addition, NOVOZYMES EXPRESSLY DISCLAIMS ALL WARRANTIES, EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION WARRANTIES OF MERCHANTABILITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, AND NONINFRINGEMENT OF THIRD-PARTY INTELLECTUAL PROPERTY RIGHTS.



Appendix A: Activity units and measurements

The following table contains information on the various enzyme activities that are contained in Novozymes' cellulosic ethanol enzyme kit. For additional information on enzyme activity analyses, please contact Novozymes using the contact form at www.bioenergy.novozymes.com to place your inquiry.



Abbreviation	Description	Definition
AGU	AmyloGlucosidase Unit	Amyloglucosidase activity in AGU is measured relative to a Novozymes AGU enzyme standard
CBU	CelloBiase Unit	One CBU is the amount of enzyme that releases 2 μ mol glucose per minute under standard conditions with cellobiose as substrate
BHU(2)	Biomass Hydrolysis Unit	A Biomass Hydrolysis Unit (BHU(2)) measures the enzyme activity needed to hydrolyze cellulose that is present in a complex biomass substrate under the conditions given in this method. The activity is determined relative to an enzyme standard
FBG	Fungal Beta-Glucanase Unit	One FBG is the amount of enzyme that produces reducing carbohydrate equivalent to 1 μ mol of glucose per minute under the conditions given in this method. The activity is determined relative to an enzyme standard
FPU	Filter Paper Unit	0.185 FPU is the quantity of enzyme activity that, when assayed according to the standard FPU method, produces reducing sugar equivalent to 2.0 mg of glucose Reference: http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/4689.pdf
FXU	Fungal Xylanase Unit	Endoxylanase activity in FXU-S is measured relative to a Novozymes FXUS enzyme standard
PGU	Polygalacturonase Unit	PolyGalacturonase activity in PGU is measured relative to a Novozymes enzyme standard

Table 3. Description of activity units.

Appendix B: Activity and stability response curves

NS22086

Activity and stability

Figures 1 and 2 illustrate the activity of NS22086 at different temperatures and pH values using washed, dilute acid-pretreated corn stover as substrate. The pH and thermostability of the enzyme in aqueous solutions can be seen from Figures 1 and 2. For practical applications the optimal conditions are about 45–50 °C (113–140 °F) and pH 5.0.

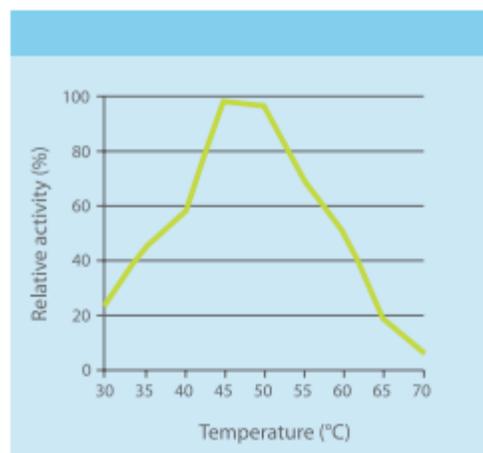


Fig. 1: Relative activity of NS22086 as a function of temperature (°C) at pH 5.0 using washed, dilute acid-pretreated corn stover.

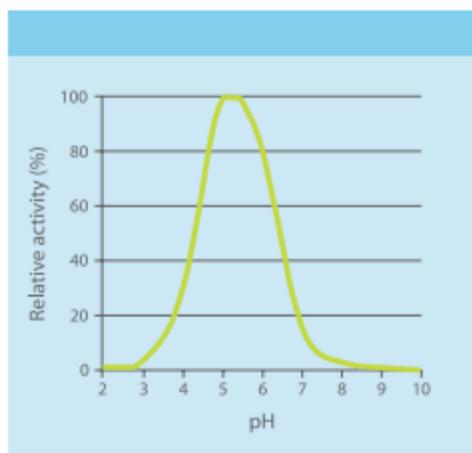


Fig. 2: Relative activity of NS22086 as a function of pH at 50 °C using washed, dilute acid-pretreated corn stover.

NS22083

Activity and stability Figures 3 and 4 illustrate the activity of NS22083 at different temperatures and pH values using azo-wheat arabinosyloxylan as substrate. The heat and pH stability of the enzyme in aqueous solutions can be seen from Figures 5 and 6. For practical applications the optimal conditions are about 35–55 °C (95–131 °F) and pH 4.5–6.0.

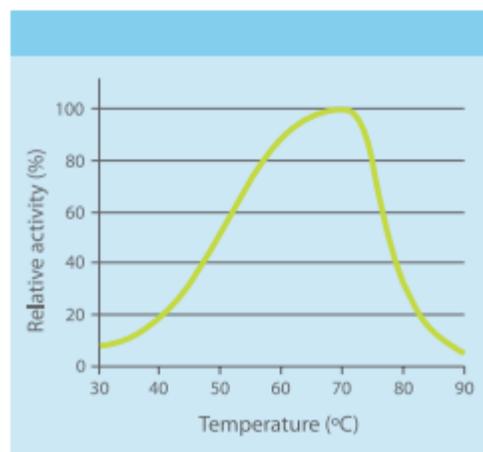


Fig. 3: Effect of temperature on the activity of NS22083.

Substrate: Azo-wheat arabinosyloxylan

pH: 4.0

Reaction time: 10 min

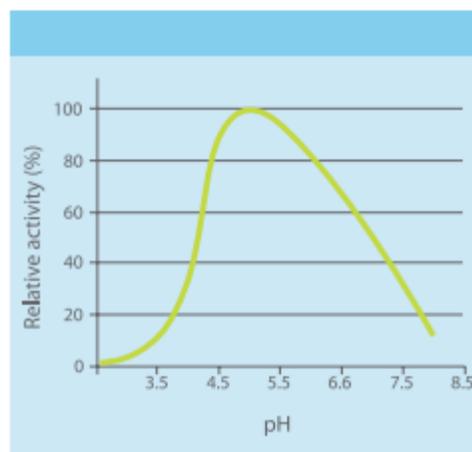


Fig. 4: Effect of pH on the activity of NS22083.

Substrate: Azo-wheat arabinosyloxylan

Temperature: 70 °C

Reaction time: 10 min

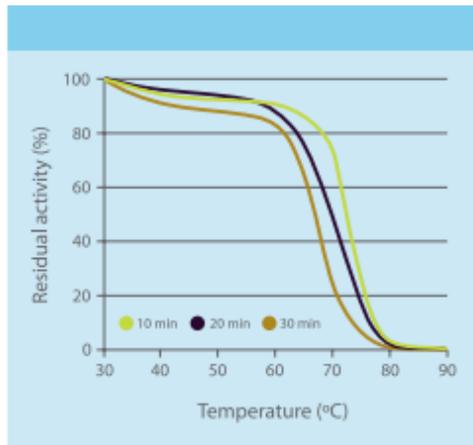


Fig. 5: Effect of temperature on the stability of NS22083.
Substrate: Azo-wheat arabinoxylan
pH: 4.5

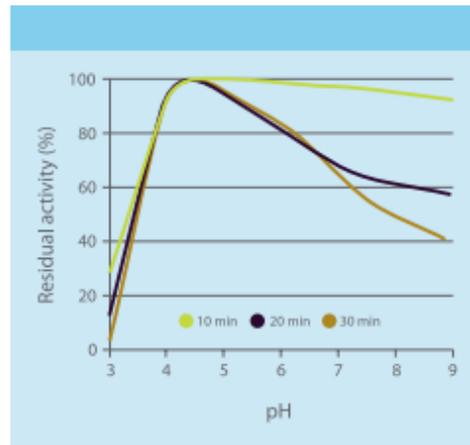


Fig. 6: Effect of pH on the stability of NS22083.
Substrate: Azo-wheat arabinoxylan
Temperature: 50 °C (122 °F)

NS22119

Description

NS22119 is a multienzyme complex containing a wide range of carbohydrases, including arabinase, β -glucanase, cellulase, hemicellulase, pectinase, and xylanase. Its main activities are polygalacturonase, mannanase, and β -glucanase. In addition, it contains a range of plant cell wall-degrading enzymes such as pectin lyase, pectin esterase, and rhamnogalacturonase. It also contains some galactanase and other hemicellulolytic activities. The enzyme preparation is produced from a selected strain of *Aspergillus aculeatus*. Optimal conditions for NS22119 are pH 4.5–6.0 and 25–55 °C.

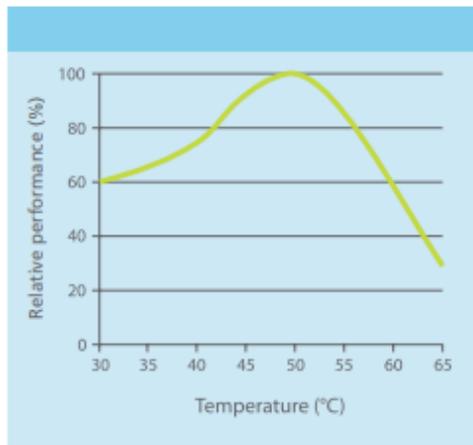


Fig. 7: The effect of temperature on the activity of NS22119.

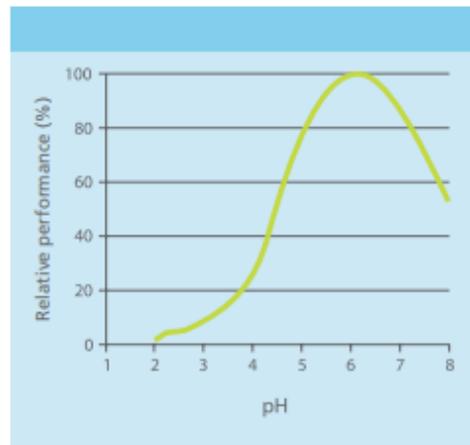


Fig. 8: The effect of pH on the activity of NS22119.

NS22002

Description

NS22002 is a mixture of β -glucanase and xylanase enzymes produced by submerged fermentation of a *Humicola insolens* strain. β -glucanase and xylanase are the two main enzyme activities in the preparation, but the product also contains several other side activities, including cellulase, xylanase, arabinase, and pentosanase. Optimal conditions for NS22002 are pH 5.0–6.5 and 40–60 °C.

Product type

NS22002 is a brown liquid with a density of approximately 1.2 g/ml.

Product activity

NS22002 has a typical standardized activity of 45 FBG/g, and in addition it has approximately 470 FXU/g.

NS 22035

Activity

The relative performance of NS22035 at varying temperature and pH is shown in Figures 9 and 10. The testing was conducted using corn mash at 29% solids at 65 °C for 24 hours. The pH and temperature optima are considered to be 4.5–5.5 and 60–70 °C respectively.

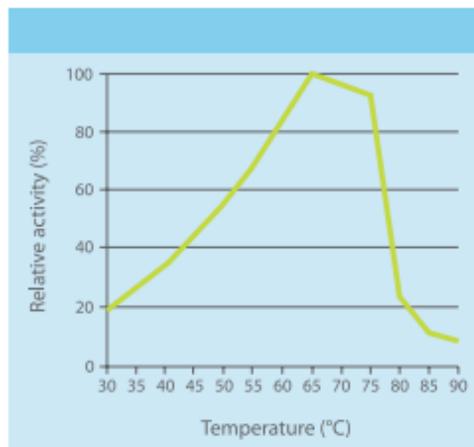


Fig. 9: The effect of temperature on the activity of NS 22035.

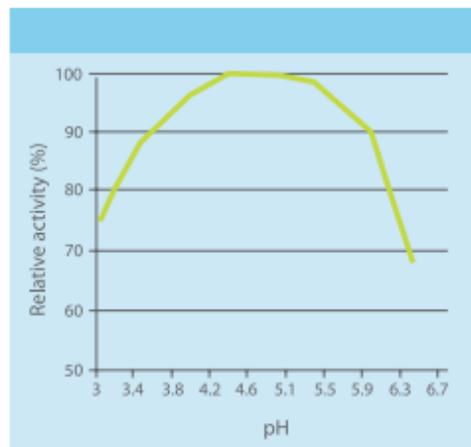


Fig. 10: The effect of pH on the activity of NS 22035.



Novozymes A/S
Krogshøjvej 36
2880 Bagsvaerd
Denmark
Tel. +45 4446 0000
Fax +45 4446 9999
bioenergy@novozymes.com

For more information,
or for more office addresses,
visit www.novozymes.com

Novozymes is the world leader in bioinnovation. Together with customers across a broad array of industries we create tomorrow's industrial biosolutions, improving our customers' business and the use of our planet's resources.

With over 700 products used in 130 countries, Novozymes' bioinnovations improve industrial performance and safeguard the world's resources by offering superior and sustainable solutions for tomorrow's ever-changing marketplace. Read more at www.novozymes.com.

Main sales offices:

Australia & New Zealand
Sydney, Australia
Tel. +61 2 9630 8466

Indian Subcontinent
Bangalore, India
Tel. +91 80 28418275

Pakistan
Karachi, Pakistan
Tel. +92 21 4387361

South-East Asia
Kuala Lumpur, Malaysia
Tel. +60 3 8996 1588

Central & Western Europe
Paris, France
Tel. +33 146140746

Japan
Tokyo
Tel. +81 432 966 767

North America
Franklinton, North Carolina
Tel. +1 919 494 3000

Turkey
Istanbul, Turkey
Tel. +90 216 373 30 00

China
Beijing
Tel. +86 10 6298 7888

Korea
Seoul, South Korea
Tel. +82 2 795 0882

Russia & Belarus
Moscow, Russia
Tel. +7 495 234 44 01

**Eastern Europe, Middle East
& Northern Africa**
Vienna, Austria
Tel. +43 1505 4757

**Mexico, Central America
& Caribbean**
Mexico City, Mexico
Tel. +52 555 318 96 80

South America
Araucária, Paraná, Brazil
Tel. +55 413 641 10 00

Laws, regulations, and/or third-party rights may prevent customers from importing, using, processing, and/or reselling the products described herein in a given manner. Without separate, written agreement between the customer and Novozymes to such effect, this document does not constitute a representation or warranty of any kind and is subject to change without further notice.

Anexo 03

Incubadoras a 120 RPM y a diferentes temperaturas



Anexo 04: Absorbancia convertida en g/L

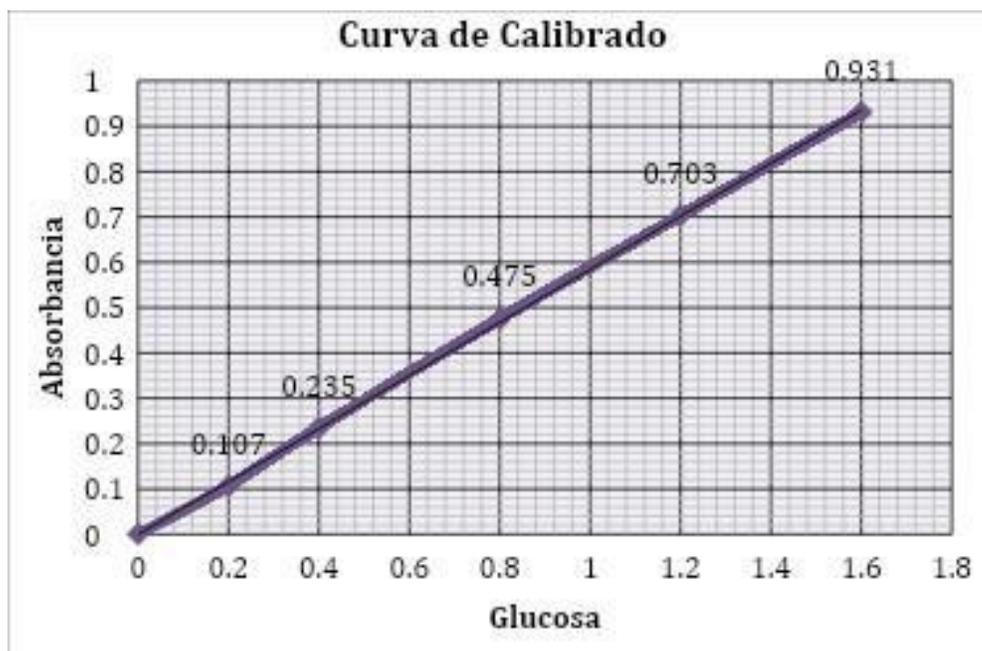
Lecturas en 540nm				g/L				
	2%	3.5%	5%		2%	3.5%	5%	Tiempo (hora)
40	0	0	0	40	0.00	0.00	0.00	0
	0.016	0.04	0.06		0.03	0.07	0.11	3
	0.02	0.062	0.112		0.04	0.11	0.19	6
	0.027	0.077	0.171		0.05	0.13	0.29	9
	0.03	0.119	0.175		0.05	0.21	0.30	12
	0.09	0.194	0.252		0.16	0.33	0.43	15
	0.118	0.304	0.501		0.20	0.52	0.86	18
	0.132	0.323	0.572		0.23	0.55	0.98	21
	0.15	0.345	0.623		0.26	0.59	1.07	24
45	0	0	0	45	0.00	0.00	0.00	0
	0.024	0.111	0.098		0.04	0.19	0.17	3
	0.027	0.184	0.18		0.05	0.32	0.31	6
	0.051	0.242	0.229		0.09	0.42	0.39	9
	0.062	0.37	0.264		0.11	0.63	0.45	12
	0.094	0.405	0.346		0.16	0.69	0.59	15
	0.103	0.569	0.398		0.18	0.97	0.68	18
	0.106	0.612	0.453		0.18	1.05	0.78	21
	0.117	0.699	0.487		0.20	1.20	0.83	24
50	0	0	0	50	0.00	0.00	0.00	0
	0.01	0.011	0.025		0.02	0.02	0.05	3
	0.026	0.069	0.103		0.05	0.12	0.18	6
	0.034	0.155	0.113		0.06	0.27	0.20	9
	0.062	0.184	0.278		0.11	0.32	0.48	12
	0.101	0.193	0.356		0.18	0.33	0.61	15
	0.149	0.217	0.475		0.26	0.37	0.81	18
	0.193	0.231	0.539		0.33	0.40	0.92	21
	0.247	0.275	0.65		0.42	0.47	1.11	24

En el lado derecho las absorbancias obtenidas del espectrofotómetro y al lado izquierdo son los mismos datos antes mencionados pero transformados a gramos por litro de glucosa.

Anexo 05

Curva patrón para cuantificación de glucosa por el método DNS 3,5-ácido dinitrosalisílico (DNS) (Miller, 1959)

<u>N° de Tubos</u>	<u>g/L</u>	<u>ABS</u>
1	1.6	0.931
2	1.2	0.703
3	0.8	0.475
4	0.4	0.235
5	0.2	0.107
6	0	0



Anexo 06: ISO 17025:2005

Se utilizo dos pautas que indica la norma ISO 17025:2005, mencionando la trazabilidad y normas técnicas, en este proyecto de investigación se toma la importancia de la cadena de frio para la conservación de la materia prima, tanto en la selección como su respectivo traslado al laboratorio de la facultad de ciencias. Protocolo que se siguieron fueron METODOS Y CEA'S.

