

5  
2 Ejm



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“CUAUTITLAN”

**OBTENCION DE AZUCARES A PARTIR DE BAGAZOS  
DE UNA PLANTA PROCESADORA DE FRUTAS**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A

**JORGE ESTEBAN BALAREZO GUTIERREZ**

DIRECTOR DE TESIS:

I. B. Q. ROSA MANUELA ARRIAGA BERISTAIN

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1984



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## R E S U M E N

En la actualidad se ha dado grán interés al aprovechamiento de los desechos que resultan del procesamiento de frutas y vegetales en plantas industriales. Los desechos de frutas que resultan de la elaboración de jugos y néctares son ricos en fibra cruda y por tanto en celulosa y derivados celulósicos, los cuales pueden hidrolizarse para dar unidades de glucosa y otros sacáridos que a su vez pueden ser destinados a la substitución del (cada vez mas caro) azucar como edulcorante. En el presente trabajo un proceso consistente en un pre-tratamiento al calino con NaOH combinado con una hidrólisis enzimática empleando dos preparaciones enzimáticas comerciales fué probado y evaluado sobre un par de mezclas de desechos de manzana/guayaba y de piña/guanábana procedentes de una planta procesadora de frutas de la localidad.

Las condiciones de pre-tratamiento que mejor rendimiento dieron fueron: Remojo con NaOH al 15 % a un nivel de 0.15 : 1.00 (sólidos de hidróxido de sodio a sólidos de bagazo) a temperatura de 20 - 25°C durante 24 horas; con ésto se consiguió un rendimiento de 90.32 g de azúcares reductores (expresados como dextrosa) por cada 100 g de fibra cruda en una mezcla 90/10 de piña/guanábana, en tanto que para una mezcla de manzana/guayaba 75/25 fuéde solo 38.22 g de azúcares reductores por cada 100 de fibra cruda.

Se observó que la acción del pre-tratamiento es preponderante en el rendimiento final, llegando a ser hasta un 140 % mayor que el que se obtiene sin pre-tratamiento. No obstante el buen rendimiento logrado, la evaluación económica preliminar del proceso reveló que su costo es muy elevado en comparación con el precio del azucar de caña aún sin considerar un proceso posterior de refinación y concentración del jarabe, este proceso es necesario para su uso directo como edulcorante y viene a incrementar aún más el costo. Es por esto que este proceso como tal NO es viable económicamente, sin embargo se señala que existe una fuente disponible de carbohidratos a los que se les puede dar un uso distinto tal como la producción de alcohol, de ácido acético o bién de proteína unicelular.

# I N D I C E

<b>I.- <u>INTRODUCCION Y OBJETIVO</u></b>	
I.1 Residuos Industriales del procesamiento de frutas. Una fuente económica de azúcares.	8
I.2 Hidrólisis enzimática de la celulosa. Una manera eficaz de obtener azúcares	10
I.3 Objetivo de la presente tesis.	12
<b>II.- <u>ANTECEDENTES</u></b>	
II.1 Potencialidad de los residuos del procesamiento de frutas como fuente de azúcares.	14
II.2 Transporte y depósito de los desechos.	16
<b>III.- <u>ASPECTOS BASICOS DE LA HIDROLISIS ENZIMATICA DE LA CELULOSA</u></b>	
III.1 Modo de acción de las celulasas	19
III.2 Pre-tratamiento alcalino. Un método sencillo de incrementar la digestibilidad de la celulosa.	22
<b>IV.- <u>MATERIALES Y METODOS</u></b>	
IV. Explicación	27
IV.1 Celulasas empleadas	28
IV.2 Determinación de fibra cruda	31
IV.3 Determinación de humedad.	34
IV.4 Determinación de azúcares reductores por el método de Shaffer - Somogyi.	35
IV.5 Determinación de azúcares reductores por el método de Lane - Eynon	37
IV.6 Determinación de actividad de celulasas.	40
IV.7 Actividad de CMC-asa. Método de Amano Pharm. Co. Ltd.	42
IV.8 Método del papel filtro.	44
<b>V.- <u>PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL</u></b>	
V.1 Caracterización de materiales de desecho	49
V.2 Análisis de los materiales de desecho y selección de los materiales de prueba	52
V.3 Evaluación de pre-tratamientos y digestión enzimática.	53
V.4 Evaluación económica preliminar.	53

## VI.- RESULTADOS

VI.1 Estandarización de los métodos de análisis.	56
VI.2 Determinación de actividad celulolítica.	59
VI.3 Análisis de los materiales de desecho.	63
VI.4 Selección de los materiales de prueba según los resultados preliminares.	64
VI.5 Evaluación de pre-tratamientos.	67
VI.6 Digestión enzimática.	71

## VII.- EVALUACION DEL COSTO DE LOS PROCESOS Y CONCLUSIONES

VII.1 Evaluación del costo de los procesos.	77
VII.2 Conclusiones.	84
VII.3 Alternativas a futuro.	86

## APENDICE 87

## BIBLIOGRAFIA 89

C A P I T U L O

I

I N T R O D U C C I O N

Y

O B J E T I V O

## C A P I T U L O I

### INTRODUCCION Y OBJETIVO

La celulosa es un recurso virtualmente ilimitado que se renueva continuamente por medio de la fotosíntesis, la producción mundial de celulosa es estimada en  $90.8 \times 10^3$  millones de toneladas métricas anuales, (1) es decir 68 Kg por cada uno de los 3900 millones de habitantes del planeta. Sin embargo éste es un recurso que en muchos casos no se aprovecha, específicamente en la Industria alimentaria a menudo es manejado como un desperdicio inútil.

Los residuos obtenidos del procesamiento de frutas y vegetales en plantas industriales contienen una importante cantidad de celulosa que parcialmente es utilizada para la alimentación pecuaria, pero que frecuentemente se desecha en tiraderos donde causan los problemas inherentes a su descomposición por ser un medio propicio para la proliferación de insectos y ciertos microorganismos, que también es fuente de malos olores, pudiendo tener un fin mas útil.

#### I.1.- RESIDUOS INDUSTRIALES DEL PROCESAMIENTO DE FRUTAS. UNA FUENTE ECONOMICA DE AZUCARES.

Tan sólo en los Estados Unidos se estima que anualmente se generan 1,987,625 toneladas m. de residuos sólidos provenientes de plantas procesadoras de frutas, de las cuales 343,228 t.m. (base seca) son de fibra cruda (2) y 1,202,318 t.m. son de carbohidratos disponibles. Si se consideran los residuos provenientes de plantas procesadoras de verduras, legumbres y granos, habría que agregar a estas cifras 1,175,560 t. m. de residuos sólidos con un contenido de 200,880 t.m. (base seca) de fibra cruda y 767,336 t.m. de carbohidratos disponibles, y dar un total de 550,00 t.m. de fibra cruda seca al año. Esto nos puede dar una idea de la potencialidad de estos residuos industriales como fuente de carbohidratos.

Por otra parte los precios mundiales de los carbohidratos convencionales han ido en constante aumento y es de esperarse que continuen incrementandose conforme la demanda se acerque más a la capacidad de producción mundial (3), es por eso que un carbohidrato obtenido económica-

- mente a partir de material de desecho podría contribuir a estabilizar los precios y sería bienvenido en el mercado.

En un estudio hecho en 1975 por C. Dunlap (3) se muestra que si se estima en un 75% la conversión de celulosa a azúcares por el método enzimático, es posible obtener glucosa a partir de bagazo de caña a un costo de 1.7 - 2.1 ¢ U.S. dolar/libra. En un artículo aparecido en la revista Food Processing (4) se indica que una planta con capacidad de producción de 100,000 a 200,000 toneladas (U.S.) anuales podría producir rentablemente glucosa a partir de desechos a un precio de venta de 10 - 15 ¢ U.S.dolar/libra, ya incluyendo el costo de un pre-tratamiento y tomando en cuenta la disponibilidad de los materiales. Esto resulta económico si se compara con los precios internacionales de algunos edulcorantes de uso industrial como se muestra en la siguiente tabla

TABLA I  
PRECIOS INTERNACIONALES DE ALGUNOS EDULCORANTES/CARBOHIDRATOS.

Nombre comercial	Precio en U.S.¢ /lb	Dulzura relativa a sacarosa	Precio equiv. a 1 lb sacsa.
Jarabe de maiz alto en fructosa (HFCS-55%)	19.0	1.0	19.0
Jarabe de maiz 42 D.E.	9.8	0.4	24.5
Azucar granular de caña ó remolacha	27.0	1.0	27.0
Suero de leche convertido	10.9	0.35	32.5
Sorbitol 70%	31.0	0.5	62.0
Xilitol	275.0	1.0	275.0
Manitol	300.0	0.7	430.0

Fuente: "Alternative Sweetener Report". Food Engineering Intl. Dec.1983 p.35

La glucosa como tal no solo puede ser aprovechada como edulcorante sino también puede ser materia prima para otros procesos tales como la producción de alcohol o la producción de proteína unicelular y de otros microorganismos. En un artículo escrito por Kamm et al (5) se realiza un completo análisis de estas alternativas junto con la

de producción de dextrosa a partir de datos tomados de tres plantas actualmente en operación, donde se procesan vegetales. Aún considerando los altos costos actuales de energía, se estima que en dichas operaciones los márgenes de ganancia libres de impuestos son los siguientes:

Operación	Margen.
Producción de alcohol.	12 - 38 %
Producción de dextrosa.	103 - 212 %
Producción de proteína unicelular.	Aprox. 48 %

Puede apreciarse que aparentemente la producción de Dextrosa es la de mejor margen y menor riesgo. Como resultado de este estudio dos plantas recuperadoras de desechos han sido ya instaladas en los E.E.U.U. para producir un jarabe llamado de 92 D.E. (Jarabe que contiene 92 % de dextrosa en base seca).

## I.2.- HIDROLISIS ENZIMATICA DE LA CELULOSA. UNA MANERA EFICAZ DE OBTENER AZUCARES.

La celulosa existe en varios estados de pureza en los vegetales y su estructura molecular es similar, las diferencias en composición se deben principalmente a las substancias con las que se haya asociada. Su estructura puede ser de tipo "cristalino", donde las moléculas están alineadas y ligadas lateralmente por fuerzas de Van der Waals, o bien tener regiones en las que las moléculas están orientadas al azar, dichas regiones son las llamadas "amorfas" (6).

La celulosa como tal es un polímero lineal de unidades de D Anhidro gluco-piranosas con enlaces glucosídicos beta (1,4) entre ellas. El número de unidades por molécula (grado de polimerización) se cree que varía desde 15 hasta 7 000 ó 10 000 (6). La celulosa puede ser hidrolizada a glucosa ( dextrosa ) por varios agentes químicos o enzimáticos con la subsecuente adición de una molécula de agua por monosacárido, los más comunmente utilizados son ácidos inorgánicos y enzimas celulólicas, pero existen otros métodos mas sofisticados y menos convencionales que emplean agentes tales como el rompimiento por oxidación alcalina, tratamientos con vapor a alta presión y aplicación de partículas atómicas de alta energía.

Algunas ventajas y desventajas de la hidrólisis por ácidos en

comparación con la hidrólisis enzimática son los siguientes:

#### Hidrólisis ácida.

La aplicación industrial de la hidrólisis requiere de condiciones muy severas de reacción para penetrar e hidrolizar la celulosa, esto causa a su vez que ocurra una descomposición de la glucosa ya formada en productos coloridos ( aldehidos y cetonas ) que además imparten malos sabores y olores, dichos compuestos pueden resultar tóxicos a microorganismos fermentativos y aún a animales superiores en altas concentraciones. Los mejores rendimientos obtenidos hasta la fecha son del orden de 55 al 60 % (3) aún cuando sus inicios datan de los años cuarenta cuando en Alemania se producían azúcares a partir de madera, sin embargo los ácidos inorgánicos son mucho más baratos que cualquier enzima.

#### Hidrólisis enzimática.

Esta vía tiene la ventaja de operar en condiciones mucho menos severas, dando rendimientos que pueden llegar a ser del orden del 80 % (3). La acción de las enzimas es específica, siendo la glucosa el producto final de reacción, pero tienen en su contra su alto costo. Técnicas de pre-tratamiento del sustrato pueden incrementar su reactividad y accesibilidad mejorando la eficiencia del proceso.

### I.3.- OBJETIVO DE LA PRESENTE TESIS.

El objetivo general se resume en los siguientes tres puntos:

- 1º Analizar la factibilidad de obtener azúcares de bajo costo utilizando como materia prima los residuos resultantes del procesamiento de frutas en una planta de nuestra localidad, con un proceso técnicamente sencillo que aporte agentes edulcorantes que ayuden a reducir el alto costo de manufactura de los productos de línea, debido en parte al elevado precio del azúcar el cual es uno de los principales ingredientes en la elaboración de bebidas de fruta. Además ayudar a la empresa a liberarse de los gastos ocasionados por el transporte de los mencionados desechos hasta los depósitos autorizados.
- 2º Seleccionar las condiciones de hidrólisis alcalino - enzimática que den el mejor rendimiento bajo las condiciones de operación de la planta en cuestión.
- 3º Hacer un análisis económico preliminar del o los procesos seleccionados con el objeto de ver si son económicamente viables. Plantear alternativas más económicas si ésta o éstas no resultasen, además ver de qué manera el proceso pudiera modificarse para hacerlo más atractivo.

C A P I T U L O

II

A N T E C E D E N T E S

## C A P I T U L O   I I

### ANTECEDENTES

#### II.1.- POTENCIALIDAD DE LOS RESIDUOS DEL PROCESAMIENTO DE FRUTAS COMO FUENTE DE AZUCARES.

Primeramente en este capítulo se presentan datos recabados sobre la fuente de desperdicios en la tabla No. II, la cual muestra los rendimientos estimados de cada una de las frutas en las condiciones de operación de la planta, ahí también se exponen las cantidades estimadas de desechos producidos durante los años de 1979, 1980, y en 1981.

TABLA II  
PRODUCCION DE DESECHOS DE FRUTAS EN  
LA PLANTA EN ESTUDIO (a).

<u>FRUTA</u>	<u>% UTIL</u>	<u>% DESECHO</u>	<u>CANTIDAD DE DESECHOS (Ton.M.)</u>		
			<u>1979</u>	<u>1980</u>	<u>1981</u>
DURAZNO	65	35	253.5	85.7	-
FRESA	80	20	2.2	44.7	-
GUANABANA	75	25	65.4	36.2	5.5
GUAYABA	80	20	97.8	80.5	235.1
MANGO	58	42	587.7	815.7	500.4
MANZANA	80	20	415.9	52.4	463.1
PAPAYA	56	44	126.0	254.9	33.2
PERA	70	30	136.7	35.3	3.9
PIÑA	50	50	693.8	1,830.6	1,694.4
TAMARINDO	35	65(b)	44.9	89.8	65.8
TOMATE	85	15	6.4	54.7	-
TOTAL			2,430.3	3,380.5	3,001.4

(a) Los datos de cantidad de desechos fueron obtenidos aplicando el factor correspondiente de % de desecho a la cantidad de fruta procesada en el lapso indicado. Estos datos proceden de los records de la compañía.

(b) La elaboración de esta pulpa implica la adición de agua.

Aquí se observan los grandes volúmenes de desperdicios que tienen que ser desechados sin tener ningún beneficio. Considerando que la carga útil del camión de volteo que se utiliza para tal fin es de cuatro toneladas como promedio, el desalojo de los mencionados volúmenes implica la realización de 608, 845, y 750 viajes para los años de 1979, 1980 y 1981 respectivamente. Esto arrojaría un promedio de dos a tres viajes por día laboral solamente por este concepto.

La literatura nos reporta que existen diversos contenidos de fibra cruda en las frutas que se procesan en la planta en estudio; Ahora al ser extrapolados a los niveles de producción se encuentran cantidades interesantes de fibra cruda tal como se muestra en la tabla III.

TABLA III  
CONTENIDO DE FIBRA CRUDA DE LAS FRUTAS PROCESADAS EN LA PLANTA SEGUN DATOS TOMADOS DE LA LITERATURA.

FRUTA	% FIBRA CRUDA	FUENTE	1979	1980	1981
			(datos en T.m.)		
DURAZNO ( <i>Prunus pérsica</i> ) ‡	15.0	(a)	38.0	12.9	-
GUANABANA ( <i>Annona muricata</i> )	1.1	(b)	2.9	1.6	0.2
GUAYABA ( <i>Psidium guajava</i> )	5.6	(b)	27.4	22.5	65.8
MANGO ( <i>Mangífera indica</i> )	0.9	(b)	12.6	17.5	10.7
MANZANA ( <i>Malus silvestris</i> ) †	3.7	(a)	15.4	1.9	17.1
PAPAYA ( <i>Carica papaya</i> )	0.9	(c)	2.6	5.2	0.7
PERA ( <i>Pyrus communis</i> ) ‡	2.2	(a)	3.0	0.8	0.1
PIÑA ( <i>Anana comosus</i> ) †	18.0	(a)	124.9	329.5	305.0
TAMARINDO ( <i>Tamarindus indica</i> )	5.1	(b)	3.5	7.0	5.2
(‡)piel y corazón o hueso		(†)bagazo de prensa			

- Fuentes:
- (a) JACK.L.COOPER. The potential of food processing solid wastes as source of cellulose for enzymatic conversion Biotech & Bioeng. Symp. No.6 251-271 (1976).
  - (b) THE UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Handbook of the nutritional contents of foods (1975)
  - (c) CHATFIELD.C. Food composition tables for International use. FAO Rome.

Observando la tabla III se nota que entre las frutas que más desechos producen, Piña, Guayaba, Manzana y Mango son de las que manifiestan la tendencia a seguir manteniendo altos volúmenes de desechos, mientras que otras han sido descontinuadas o se ha reducido su procesamiento. Si se considera que la mayor parte de la fibra cruda está formada por celulosa, hemicelulosa, lignina, derivados celulósicos -- y pectínicos, todos ellos substratos susceptibles de hidrólisis, puede entonces asumirse que el contenido de fibra cruda es un buen indicador de la potencialidad de los materiales como fuente de azúcares.

## II.2.- TRANSPORTE Y DEPOSITO DE LOS DESECHOS.

Se hace aquí una breve revisión de los gastos que ocasiona el acarreo y depósito de los materiales de desecho. Dichos materiales son recolectados en una tolva la cual descarga a un camión de volteo propiedad de la compañía con una capacidad de carga útil que oscila entre 1600 y 6500 Kilogramos según la naturaleza de la materia transportada, digamos que en promedio carga cuatro toneladas de desechos por viaje, la unidad consume entre 150 y 300 L de gasolina "Nova" a la semana según las necesidades, si el consumo promedio es de 225 L por semana, el consumo promedio diario es de 45 L que al precio de \$40.00/L arroja un gasto diario de \$1800.00 M.N. El salario del chofer es de 610 pesos diarios. El basurero ejidal de Coyotepec Edo. México que es el lugar donde se depositan los desechos se encuentra 11.4 Km de la planta, allí se cobra una cuota de entrada de \$100.00 M.N. por cada vez que se utiliza, dispone además de áreas determinadas para cada tipo de basura pero su ubicación sobre la ladera de una loma permite que el viento barra libremente la zona y numerosos pobladores marginados lo recorren en busca de algo que les provea sustento.

Siendo que el promedio de viajes diario es cercano a dos, el monto de gastos por viaje es el siguiente:

Concepto.	\$ M.N.
Combustible	900.00
Salario	610.00
Cuota	100.00
Mantenimiento (lubricación, refacs.etc.)	20.00
	<u>1630.00</u>

el mencionado monto no incluye depreciación debido a que la unidad de transporte tiene más de diez años de uso. De aquí que los gastos anuales que resultan de los viajes quedan como sigue:

Año	No. de viajes	Gasto en \$ M. N.
1979	608	991,040.00
1980	845	1 377,350.00
1981	750	<u>1 222,500.00</u>
	Total	3 590,890.00

Estas cifras revelan que si bien no es una enorme erogación para la compañía, sí es un gasto completamente estéril que no reditúa algún beneficio económico.

Ocasionalmente algunos ejidatarios o ganaderos recogen con sus propios transportes algunos bagazos (principalmente de piña) para la alimentación de su ganado o para hacer ensilados, esto aunque es de gran ayuda para la compañía ocurre sólo de vez en cuando y de forma impredecible, por lo que no puede considerarse como un ahorro constante en la estimación de egresos.

C A P I T U L O

III

A S P E C T O S B A S I C O S

D E L A

H I D R O L I S I S

E N Z I M A T I C A

D E C E L U L O S A .

## C A P I T U L O   I I I

### ASPECTOS BASICOS DE LA HIDROLISIS ENZIMATICA DE CELULOSA.

#### III.1.- MODO DE ACCION DE LAS CELULASAS.

Los organismos que degradan la celulosa viven ya sea en la superficie exterior de las fibras o en el lumen fibrilar (como en el caso de las maderas). Ahí ellos producen enzimas extracelulares celulolíticas que degradan la celulosa a productos que pueden ser metabolizados por el organismo (6). Estas enzimas actúan extracelularmente en dos formas:

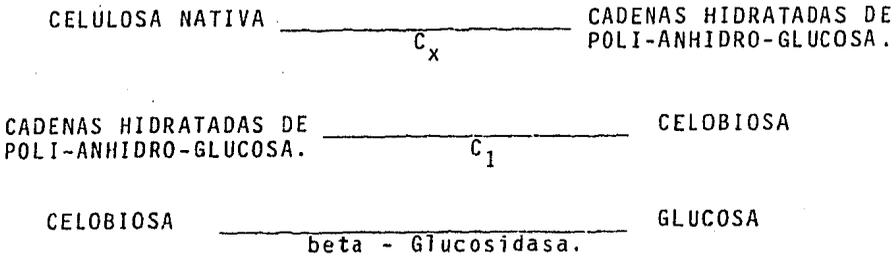
a) Ligadas a la superficie del organismo. Actuando sobre las superficies fibrilares con las que el organismo está en contacto.

b) Secretadas libremente al medio exterior difundiendo alguna distancia lejos del organismo a través de una película de agua que recubre las fibras y actuando sobre las superficies moleculares accesibles en la estructura fina de la fibra.

Existen evidencias de acción celulolítica a considerable distancia de los microorganismos durante la pudrición de madera. Ocurrir una rápida degradación de la lignina contenida en la lamela media de la pared celular, en madera podrida por hongos cafées hay un rápido incremento en la solubilidad en hidróxido de sodio al 1%, además el grado promedio de polimerización de la holocelulosa decrece muy rápidamente, estas observaciones serían imposibles si el cuerpo de las paredes celulares no fuera degradado en las primeras etapas de la pudrición (6).

Ya sea que las enzimas actúen a distancia o en una zona localizada, la secuencia de reacciones que propone Elwyn T. Reese (6) in volucra primero la hidratación de las moléculas de celulosa, para luego catalizar su rompimiento. Por último los productos de degradación son reducidos a celobiosa, glucosa y otras sustancias solubles que difunden dentro del organismo y pueden ser asimilables.

La secuencia de reacciones de hidrólisis de celulosa por la vía enzimática propuesta por E.T.Reese et al. es la siguiente:



En cada reacción enzimática el contacto enzima - sustrato es esencial para la catálisis:



Por el modo de acción las enzimas celulolíticas pueden clasificarse en dos categorías (9) (10) (11) :

1. De acción ENDOGENA o endo-enzimas ( $C_x$ ). Ellas actúan al azar en cualquier enlace glucosídico no importando la posición en que encuentre dentro de la cadena. Se caracterizan por causar un rápido decremento en la viscosidad de una solución de un polímero celulósico (como el CMC) y la rápida aparición de grandes cadenas (oligosacáridos) en etapas tempranas de la hidrólisis, para aparecer en las posteriores trímeros, dímeros y aún monómeros. Un ejemplo de acción endógena sobre un beta-1,6 Glucano es el de las celulasas de *Penicillium digitatum*, las cuales rinden los siguientes productos:

Gentiotetraosa y oligopolímeros mayores.	42 %
Gentiotriosa	14 %
Gentiobiosa	21 %
Glucosa	5 %
No eluido de la columna.	18 %

2.- De acción EXÓGENA o exo-enzimas ( $C_1$ ). Actúan sólo sobre los enlaces terminales de la cadena, quitando unidades glucosídicas de bajo peso molecular. Son mucho menos comunes que las anteriores y su acción produce un lento decremento en la viscosidad del CMC, como sólo monómeros o dímeros son quitados de las terminales, ellos son los mayores productos en las primeras etapas de reacción. No ha sido posible detectar intermediarios pero se ha observado que la velocidad de hidrólisis disminuye rápidamente cuando el polímero es menor a 6 unidades, y que la presencia de beta-Glucosidasa puede influir sobre la acción de las beta-1,6 Glucanasas al actuar sobre los beta-1,6 Glucanos, pudiendo encontrarse en ausencia total de ellas productos típicos de una acción al azar. Existe una beta-Glucanasa de conocida acción terminal, esta es la beta-1,3 Glucanasa muy común en hongos tales como *Penicillium pusillum* y *Cladosphora rupestris*.

La clasificación de las beta-Glucanasas según aparece en un artículo de E.T. Reese (9) es la que se muestra en la siguiente tabla.

TABLE IV  
CLASIFICACION DE LAS BETA-GLUCANASAS SEGUN SU MODO DE ACCION.

BETA-GLUCANASA ( origen )	ACCION <u>ENDOGENA</u>	ACCION <u>EXÓGENA</u>	
		Con prodn. de monómeros	Con prodn. de dímeros
1,6 Fúngica	+	-	-
1,4 Fúngica	+	-	?
1,4 Algas	+		
1,4 Bacteriana	+	-	?
1,4 Vegetal	+	-	-
1,3 Fúngica	+	+	-
1,3 Algas	+	+	-
1,3 Vegetal	+	+	-
1,2 Fúngica	+	-	-

La acción terminal se ve frecuentemente impedida debido a que la celulosa en su condición natural tiene relativamente pocas ter

-minales, con cadenas grandes generalmente insolubles, además parece ser que el enlace en los extremos no reductores es mas resistente, por esta razón la acción al azar debe prevalecer como han observado Parrish y Perlin (12) pero sin embargo frecuentemente esta acción está limitada a las regiones amorfas. K.W. King (10) concluye que un organismo con exclusiva acción terminal en sus celulasas tiene muy pocos sitios de ataque en la celulosa nativa, y que por eso requiere de aunque sea una pequeña cantidad de endoenzimas para así poder tener mas terminales disponibles.

Se ha sugerido que existen exo-enzimas que rinden unidades de celobiosa producidas por microorganismos como *Stachybotrys atra*, *Chlostridium thermocellum*, *Ruminococcus sp.*, *Cellvibrio* y *Aspergillus niger*. Enzimas de *Trichoderma viride*, *Myrothecium verrucaria*, *Streptomyces sp.*, *Irpex lácteus* y *Pseudomona fluorescens* las cuales tienen una típica acción al azar, asemejando a la acción de un ácido y por esta razón Okamoto y Asai (11) hacen una escala sin más divisiones en el modo de acción, variando éste desde "mas al azar" que serían aquéllas enzimas cuya acción se parece más a la del ácido, hasta "menos al azar" donde encontraríamos a celulasas de *Cellvibrio gilvus* y *Pseudomona fluorescens*.

Respecto a la especificidad de las enzimas Perlin (12) indica que ésta se ve mas influenciada por la estructura de las unidades del sustrato que por el tipo de enlace glucosídico.

### III.2.- PRE-TRATAMIENTO ALCALINO. UN METODO SENCILLO DE INCREMENTAR LA DIGESTIBILIDAD DE LA CELULOSA.

Se ha observado que mientras en un residuo celulósico no tratado previamente, el grado de conversión es del orden de 10 a un 30 %, la aplicación de algún tratamiento que modifique la celulosa puede incrementar la conversión varias veces, lo cual se hace necesario para que el proceso resulte de importancia económica(7). Las propiedades que afectan la digestibilidad de los residuos son las siguientes:

a) **Cristalinidad.**- Existe una relación inversa con el proceso de digestibilidad, pues una red cristalina ordenada impide el li-

-bre acceso a la celulosa y disminuye el transporte molecular.

b) Contenido de Lignina.- Un alto contenido de lignina ocluye a la celulosa y cubre a posibles sitios de ataque.

c) Tamaño de poro.- Es muy importante para la acción de las enzimas celulolíticas, cuando menos un poro de alrededor de 30 armstrongs es necesario para admitir la enzima.

d) Contenido de humedad.- Tiene un efecto positivo pues hincha a la estructura de la celulosa y provee de una mayor motilidad molecular.

e) Area expuesta.- Guarda una relación directa, pues a mayor area se incrementan los sitios de adsorción de la enzima.

A continuación se enlistan algunos de los métodos de pre-tratamiento reportados en la literatura que modifican las propiedades que afectan la digestibilidad de la celulosa.

#### METODOS FISICOS:

- \* ) Molino de bolas.
- \* ) Molino de martillos.
- \* ) Ebullición
- \* ) Vapor a alta presión.
- \* ) Irradiación electrónica
- \* ) Foto oxidación.
- \* ) Humectación.
- \* ) Gamma Irradiación.

#### METODOS COMBINADOS:

- \* ) Molienda en caliente con molino de bolas
- \* ) Hidróxido de sodio y molino de bolas.
- \* ) Nitratos e Irradiación.

#### METODOS QUIMICOS

- \* ) Hidróxido de sodio.
- \* ) Hidróxido de amonio.
- \* ) Amoniac gas

- \*) Acido clorhídrico.
- \*) Acido sulfúrico.
- \*) Sulfuro de sodio.
- \*) Anhídrido sulfúrico.
- \*) Dióxido de nitrógeno.
- \*) Hidróxido de potasio.
- \*) Acido fosfórico.

Un buen pre-tratamiento debe maximizar la velocidad de conversión de celulosa a glucosa, a la vez que debe producir un mínimo de subproductos de degradación de la glucosa. Tratamientos de alta temperatura y corto tiempo, o de una alta acidez y corto tiempo parecen tener mejor resultado según un estudio de Millet - Baker - Satter (8).

Algunos de estos métodos son brevemente discutidos a continuación.

Entre los métodos físicos el molino de bolas y la irradiación electrónica son las técnicas más efectivas en la alteración de la cristalinidad de la celulosa (8). El molino de bolas disminuye la cristalinidad y grado de polimerización e incrementa la fracción soluble en agua con un marcado decremento en el tamaño de partícula, existe una relación casi lineal entre el tiempo de molienda y la cristalinidad. Este método como ya se indicó se considera entre los más efectivos pero su costo es aún alto. Se estima que la reducción de una tonelada de residuos a un tamaño de partícula menor de malla 200 cuesta entre 0.30 a 1.00 U.S. dólares.

La Irradiación electrónica utiliza electrones de alta energía a dosis de alrededor de  $1 \times 10^8$  R. (Roetgen equivalentes) con notable disminución de la cristalinidad, pero su costo aún se estima en cerca de 150 U.S. dólares por tonelada de residuo (8).

En los métodos químicos, los agentes pueden actuar básicamente hinchando la celulosa de dos formas:

- a) Inter cristalinamente.
- b) Intracristalinamente.

El hinchamiento Inter cristalino involucra la entrada de agua entre las unidades cristalinas con un cambio de volumen equivalente aproximado al volumen de agua adsorbido hasta una máxima ad-

-sorción de cerca de 30 % (8).

El hinchamiento intracristalino involucra la penetración tanto a regiones cristalinas como amorfas, dirigiéndose hacia nuevas modificaciones y en algunos casos hasta un hinchamiento ilimitado (como sucede con Cupram, Cue, Cadoxen y HCl - H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a alta concentración). Soluciones de hidróxido de sodio, ciertas aminas y amoniaco anhidro producen un hinchamiento limitado pero con alteraciones bien definidas. El hidróxido de sodio es un agente fácilmente disponible a escala industrial y que exige condiciones tales que no hacen necesario el empleo de equipos costosos o sofisticados, difíciles de tener en una planta procesadora de frutas y/o vegetales.

C A P I T U L O

IV

M A T E R I A L E S

Y

M E T O D O S .

## C A P I T U L O   I V

### MATERIALES Y METODOS

La primera necesidad que se tuvo fué la de analizar y caracterizar nuestra materia prima para así poder conocer su potencialidad como fuente de carbohidratos. Para ello se pensó en determinar primeramente su contenido de fibra cruda como un índice del contenido de celulosa y derivados celulósicos de cada material, así se podría entonces tener un punto de juicio para escoger la materia prima adecuada que proporcione resultados mas tangibles e inmediatos. La determinación de fibra cruda además daría una base para el cálculo del rendimiento del proceso pues sería esencialmente fibra cruda el material a ser transformado en sacáridos.

Para reportar el análisis de fibra cruda se requiere también de la determinación de la humedad de la muestra, esto también sirve para conocer la composición del material y para fijar la base (seca ó húmeda) en la cuantificación del progreso de reacción. Para el ya mencionado análisis de Fibra Cruda se seleccionó el método descrito en el manual del AOAC (Ver IV.2) y para la determinación de humedad se optó por el uso de una Termobalanza electrónica de rayos infrarrojos la cual se emplea usualmente para el control de calidad de pulpas y jugos concentrados en el laboratorio de la empresa en estudio (Ver IV.3).

Por otra parte, una vez escogida la materia prima para el proceso, se vió la necesidad de evaluar de alguna forma el progreso de la reacción para así poder determinar su rendimiento. Para este aspecto se pensó en determinar su avance por medio de los productos de reacción que en su última fase son los azúcares reductores (monosacáridos). El método de Lane - Eynon (Ver IV.5) fué el escogido para este propósito, así se podría definir en base al contenido de materia seca y/o de fibra cruda qué cantidad se transformó en azúcares reductores (principalmente dextrosa).

También se contempló el determinar la actividad de las enzimas a ser empleadas y para ello se decidió utilizar dos métodos: Uno que emplea un sustrato soluble (CMC) y otro que emplea un sustrato insoluble (papel filtro), el primero sugerido por la literatura de la Celulasa "AIE" (Ver IV.7) es llamado "Actividad de CMC-asa" y determina la actividad por la liberación de azúcares reductores a partir de una solución standard de Carboximetilcelulosa (CMC) bajo condiciones definidas y cuantifi-

-fica a los azúcares reductores por el método de Shaffer - Somogy (Ver IV.4). El otro método mencionado es el llamado "Actividad de papel filtro" (Ver IV.8) el cual se encuentra en la literatura y se caracteriza por tener la ventaja de determinar la actividad de la enzima sobre un sustrato de mayor cristalinidad que el anterior y mas similar al que representan las fibras vegetales. Con los dos métodos descritos se podría saber si el complejo enzimático analizado tiene mayor o menor afinidad por sustratos cristalinos o por los amorfos.

Como primera parte de este capítulo se detallan a continuación las características de las muestras de la preparaciones enzimáticas obtenidas de dos empresas Mexicanas, ellas son:

ENMEX S.A. (Representante de Miles Laboratories Inc. U.S.A.) quien nos proporcionó el producto llamado TAKAMINE.

y  
ENZIMAS Y PRODUCTOS QUIMICOS S.A. (Representante en México de Amano Pharmaceutical Co. Ltd. Japón) quien gentilmente nos proporcionó su producto llamado "Celulasa AIE".

#### IV.1.- CELULASAS EMPLEADAS.

##### a) TAKAMINE.

Es un complejo multienzimático obtenido de Aspergillus niger, hidroliza enlaces beta (1,4)-D-glucosídicos y es capaz de convertir celulosa a glucosa, contiene al menos tres distintos componentes que degradan la celulosa nativa, éstos llamados  $C_1$ ,  $C_x$ , y beta-glucosidasa son responsables de acciones endógena y exógena combinadas.

El producto se ofrece en las siguientes presentaciones:

"Celulasa 20,000" con actividad de 20,000 CU/g

"Celulasa 4,000" con actividad de 4,000 CU/g

"Cellulase concentrate" No estandarizado. Vendido según la actividad.

El producto que se nos proporcionó fué el correspondiente al de 4,000 CU/g y es un polvo fino de olor apenas perceptible.

Características:

ACTIVIDAD.

Se ha definido su actividad por unidades arbitrarias utilizando un ensayo viscométrico con carboximetilcelulosa sódica.

ACTIVADORES.

No se requiere de activadores ni co-factores para la completa acción de Takamine.

pH.

El rango óptimo de actividad es de 3.5 - 5.0, con un pico en 4.5 y estabilidad a lo largo del rango 3.0 - 8.0.

TEMPERATURA.

La temperatura óptima es de 60°C a pH 4.5, a temperaturas mayores se inactiva rápidamente. El rango óptimo es de 50 - 60°C.

INACTIVACION.

Se realiza calentando a 90 - 100 °C y manteniendo esta temperatura por 5 - 10 minutos, o por una combinación de pH y temperatura.

INHIBIDORES.

Algunos iones de metales pesados como Mercurio, Cobre y Magnesio demuestran tener algunos efectos inhibitorios.

SOLUBILIDAD.

Es fácilmente soluble en agua potable.

SUSTRATO.

Cualquier medio mecánico, químico o de otra naturaleza que ayude a reducir la cristalinidad de la celulosa aumentará la susceptibilidad a la hidrólisis. Recomiendan la molienda en molino de bolas para aumentar el área expuesta. Los derivados solubles de la Celulosa (como el CMC) son fácilmente hidrolizados.

NIVEL DE USO.

Para evaluaciones iniciales se recomienda de 0.1 % a 1.0 % de Celulase 4000 en base a la materia seca del sustrato.

OTROS COMPONENTES ENZIMATICOS.

Existe una significativa actividad de Hemicelulasa pero varía de lote a lote pues el complejo es estandarizado en base a la actividad de celulasa. Actúa en el rango de pH de 3.5 a 4.5 a temperaturas de 40 - 50°C. Existen así también trazas de actividad de alfa-Amilasa, beta-Galactosidasa, beta-Glucanasa, Glucoamilasa, Glucosa-oxidasa, Pectinasa, Proteasa y Xilanasa.

### CELLULASE AIE.

Proporcionada por ENZIMAS Y PRODUCTOS QUIMICOS S.A. Es una preparación enzimática extraída de una cepa seleccionada de Aspergillus niger. El sistema enzimático tiene una alta actividad sobre Carboximetilcelulosa y también contiene elementos  $C_1$  y de beta-Glucosidasa. Es un polvo amarillento soluble en agua, insoluble en alcohol, muy estable al calor, no tóxico ni patógeno, aplicable en productos farmacéuticos y alimentarios.

#### Características:

pH

El complejo enzimático es estable en el rango de 3.0 - 8.0, con una máxima actividad en 4.5.

#### TEMPERATURA.

Es estable a temperaturas inferiores a 50°C, pero muestra la óptima actividad a 60°C. Como polvo es muy estable.

#### NIVEL DE USO.

No dan alguna recomendación al resoecto.

#### INFLUENCIA DE IONES METALICOS EN LA ACTIVIDAD.

Compuestos como  $AgNO_3$ ,  $MnCl_2$ , y  $CuSO_4$  tienen notoria acción inhibitoria a concentraciones mayores a  $1 \times 10^{-3}$  molar. El  $HgCl_2$  inactiva hasta en un 25% a la enzima a concentraciones de  $1 \times 10^{-4}$  molar.

Iones como el  $Sn^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Pb^{+2}$ ,  $Na^{+1}$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$  y el  $Zn^{+2}$  no tienen efecto alguno sobre la actividad y no hay iones que tengan algún efecto activante.

Ambas enzimas provienen de Aspergillus niger. Otra fuente de celulasas que ha cobrado importancia actualmente es la de Trichoderma viride, en un estudio hecho por Nobuo Toyama (13) en el que se comparan las actividades de enzimas provenientes de ambas fuentes se encontró que aquéllas de A. niger degradan mas fácil y efectivamente los materiales alimenticios de origen vegetal que las de T. viride aunque se haya encontrado una mayor actividad por el método de papel filtro en esta última. Por tanto entre las preparaciones comerciales mas efectivas, las de A. niger parecen ser las mas apropiadas para los materiales de desecho que nos ocupan.

#### IV.2.- DETERMINACION DE FIBRA CRUDA.

Este método fué tomado del manual de la A.O.A.C. de los E.E.U.U. p136 (14) 12a. edición.

##### PRINCIPIO

La fibra cruda es la pérdida de peso por la ignición de los residuos secos que permanecen después de una digestión de la muestra con  $H_2SO_4$  al 1.25% y con NaOH al 1.25% bajo condiciones específicas. El método es aplicable a alimentos, granos, harinas, forrajes y materia les fibrosos en los que la grasa puede extraerse para dejar un residuo viable.

##### REACTIVOS

- a).  $H_2SO_4$  0.255 N  $\pm$  0.005 ( 1.25 g  $H_2SO_4$  / 100 mL )
- b). NaOH 0.313 N  $\pm$  0.005 ( 1.25 g NaOH / 100 mL )
- c). Asbesto preparado. Esparcir una capa delgada de asbesto de fibra larga o media previamente lavado en ácido. Transferir a una cápsula de porcelana e incinerar a 600°C por 16 Hs en mufla. Hervir por 30 min. con  $H_2SO_4$  1.25% , filtrar y enjuagar perfectamente con agua y hervir por 30 min. con NaOH 1.25%, filtrar y lavar con  $H_2SO_4$  1.25% una sola vez, lavar profusamente con agua destilada y calcinar durante 2 Hs a 600°C. Determinar un blanco por tratamiento de 1 g de asbesto así preparado con ácido y álcali como en la técnica, corregir los resultados de fibra cruda con el blanco, el cual debe ser despreciable (diferencia de aproximadamente 1 mg). Los asbestos recuperados pueden ser usados en subsecuentes determinaciones.
- d). Alcohol 95%, ó alcohol grado reactivo, ó metanol, ó isopropanol.
- e). Antiespumante (si es requerido) Dow Corning Corp. Antiespumante "A" diluido 1 + 4 con ether de petróleo o agua, o antiespumante "B" (emulsión) diluido 1 + 4, no usar antiespumante spray.
- f). Crisoles rotos de porcelana ó perlas de ebullición.

## APARATO

- a). Aparato digestor. Condensador para ajustar a vasos de 600 mL y placa calentadora de temperatura ajustable que llevará a 200 mL de agua a ebullición en  $15 \pm 2$  minutos (LABCONCO CORP.)
- b). Discos de incineración. De sílica, vitreosí o crisoles de porcelana.
- c). Desecador. Con un desecante satisfactorio como  $\text{CaCl}_2$  ó Dry-erite malla 4 - 8.
- d). Medio filtrante. Con malla 200 de acero inoxidable fácilmente lavable de residuos digeridos. Ya sea filtro-malla de Oklahoma (LABCONCO CORP.) o el embudo Buchner modificado de California en polietileno (NALGE y LABCONCO CORP.) o equivalente. Sellar la malla o la superficie filtrante del embudo usando un material de soldadura de fierro.
- e). Filtro de succión. Para acomodar los medios filtrantes, ajustar un matraz de succión a una trampa en línea con el aspirador u otra fuente de vacío.
- f). Precalentador de líquidos. Para pre-calentar agua, ácido sulfúrico y el hidróxido de sodio a su punto de ebullición.

## PREPARACION DE LA MUESTRA

Reducir la muestra a 100 g y poner una porción en un envase sellado para la determinación de humedad. Inmediatamente determinar humedad, moler el restante a un grado de fineza uniforme (Molino Weber con malla 0.033-0.040 pulgada o números 18 - 12 de Sargent Welch Sci. Co. También el Micro-molino con malla de 1/25 - 1/16 de pulgada Pulv. Mac. Div. Slick Ind. o bien Molino Wiley con malla del número 18 que da comparable fineza). Como la mayor parte de los materiales pierden humedad durante la molienda, las determinaciones de  $\text{H}_2\text{O}$  en la muestra molida deben hacerse al mismo tiempo que la muestra es tomada para determinación de fibra cruda.

## DETERMINACION

1. Extraer 2 g de material molido con ether de petróleo o ether,

si el contenido de grasas es menor de 1%, la extracción puede omitirse.

2. Transferir a un vaso de 600 mL, previniendo cualquier contaminación por papel o pelusa.
3. Agregar al vaso:  
Aproximadamente 1 g de asbesto preparado.  
200 mL de  $H_2SO_4$  1.25% hirviendo.  
1 gota de antiespumante (el exceso de antiespumante puede dar resultados altos, úsese sólo si es necesario controlar la espuma).  
Perlas de vidrio o pedazos de crisol pueden ser adicionados.
4. Poner el vaso en el aparato de digestión con la placa preajustada para que hierva exactamente durante 30 minutos rotando periódicamente el vaso para que los sólidos no se adhieran a las paredes.
5. Quitar el vaso y filtrar (ya sea con el filtro-malla Oklahoma o con el buchner California). Usando el buchner California (previamente preparado con una capa de asbesto, si los materiales a ser analizados son extremadamente finos) enjuagar el vaso con 50 - 70 mL de agua hirviendo y lavar a través del buchner con tres porciones de 50 mL de  $H_2O$  hirviendo y succione a sequedad, quite el residuo golpeando el fondo del buchner contra la palma de la mano hacia arriba, mientras se cubre el vástago con el pulgar y se vuelve a colocar en el vaso.
6. Adicionar 200 mL de NaOH 1.25% hirviendo, hervir exactamente 30 minutos.
7. Quitar el vaso y filtrar como se indica arriba, lavar con 25 mililitros de  $H_2SO_4$  1.25% hirviendo, 3 porciones de 50 mL de agua y 25 mL de alcohol.
8. Transferir el residuo a un disco de incineración (ó crisol).
9. Secar el asbesto y el residuo por 2 Hs. a  $130 \pm 2^\circ C$ , enfriar en desecador y pesar.
10. Incinerar en mufla a  $600 \pm 15^\circ C$  por 30 min., enfriar en desecador y pesar.

## CALCULOS

El porcentaje de fibra cruda en la muestra "C" se calcula de la siguiente forma:

$$C = \frac{(\text{Difcia. de peso en incineración} - \text{Difcia. peso blanco}) \times 100}{\text{peso de muestra}}$$

todo siempre en unidades congruentes.

Porcentaje de fibra cruda en una base deseada de humedad =  $FC_x$

$$FC_x = C \times \frac{(100 - \% \text{ Humedad deseada})}{(100 - \% \text{ Humedad en muestra})}$$

reportar los resultados hasta con un 0.1 % de aproximación.

### IV.3.- DETERMINACION DE HUMEDAD.

Para la determinación de humedad en las muestras analizadas se usó el método gravimétrico o de diferencia de peso, empleando para tal efecto una Termobalanza electrónica marca Mettler Mod. 440 con una lámpara de rayos infrarojos mod. LP 15, el procedimiento seguido fué el siguiente:

1. Se tomaron muestras en envases herméticos de plástico, y fueron congeladas hasta el momento de la determinación.
2. Se descongelaron y mezclaron hasta hacerse homogéneas y fueron molidas en licuadora a alta velocidad. Una parte fué vuelta a moler en molino Hobart para carne a velocidad No.1 para posterior análisis de Fibra cruda y la otra fué inmediatamente llevada para determinación de humedad.
3. Se colocó un plato de aluminio limpio y seco y se taró.
4. Se colocaron de 1 a 2 g de muestra en el plato y se ajustó la lectura a 100 %
5. Se encendió la lámpara con intensidad de No.5 (en una escala de 1 - 12) y se dejó secando la muestra por 50 minutos. Se verificó que no hubiera variaciones en la lectura durante 5 minutos más.

6. La lectura final de la balanza era el % de sólidos totales, la humedad fué entonces calculada restando a 100 el % de sólidos totales.

#### IV.4. DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES POR EL METODO DE SHAFFER - SOMOGYI. (15)

El método de Shaffer - Somogyi fué empleado para la determinación de actividad celulolítica según la técnica de Amano Pharm. Co. para su Cellulase AIE, el método empleado se describe a continuación:

##### REACTIVOS.

- a). Reactivo de Shaffer - Somogyi. Se disuelven 4 g de NaOH, 28 g de fosfato ácido de sodio, 40 g de tartrato de sodio y potasio (Sal de Rochelle), en 200 mL de agua destilada con calentamiento y agitación. Por separado se disuelven 0.89 g de yodato de potasio en 25 mL de agua destilada con calentamiento y se agregan al reactivo principal. Se adicionan 8 g de sulfato de cobre pentahidratado y finalmente se disuelven 180 g de sulfato de sodio anhidro con agitación vigorosa. El reactivo se lleva a un volumen final de 1000 mL y se deja reposar toda la noche, filtrándose al día siguiente a través de lana de vidrio. El reactivo puede cristalizar fácilmente si la temperatura ambiente disminuye, si esto sucede, es necesario redissolver el sulfato de sodio calentando un poco en baño de agua y agitando, antes de usar el reactivo se enfría a 20°C.
- b). Solución de yoduro de potasio - oxalato de potasio. Se disuelven 2.5 g de cada uno de estos reactivos en 60 mL de agua destilada y se lleva a un volumen final de 100 mL. Se debe preparar solución nueva cada semana.
- c). Solución de tiosulfato de sodio 0.005 N. Se prepara diariamente a partir de una solución 0.1 N que se conserva en lugar frío y oscuro.
- d). Solución de ácido sulfúrico 2 N.

- e). Indicador de rojo de fenol. Se disuelven 0.1 g de rojo de fenol en 28 mL de solución de NaOH 0.01 N, y se diluye a 200 mL con agua destilada.
- f). Indicador de almidón al 1 % p/v. Se disuelve 1 g de almidón soluble en agua destilada hirviendo y se lleva a 100 mL. Preparaala diariamente cuando se utilice.
- g). Etanol al 80 %.

#### CURVA DE CALIBRACION DE AZUCARES REDUCTORES.

Se prepara una solución tipo que contenga 1 mg de glucosa por mL en agua destilada. Se transfieren a tubos de ensaye gruesos alícuotas de 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, y 3.0 mL de esta solución, haciendo un blanco con agua destilada. Se completa el volúmen a 5 mL con agua destilada y se agregan 5 mL de reactivo de Shaffer - Somogyi, se tapa la boca del tubo con una canica de vidrio y se mete en un baño de agua a vigorosa ebullición durante 15 min., después de ese tiempo se sacan y se enfrían a temperatura ambiente. Se transfiere su contenido a matraces erlenmeyer de 250 mL enjuagando los tubos con porciones de 10 mL de agua destilada hasta completar 50 mL en total. Se añaden 2 mL de solución de yoduro de potasio - oxalato de potasio y 3 mL de ácido sulfúrico 2 N, se mezclan y se tapa el matraz con un tapón de hule y se deja reposar por cinco minutos. Se titula el Iodo liberado con solución de tiosulfato de sodio 0.005 N hasta que adquiera un color amarillo claro, se agregan 4 gotas de indicador de almidón y 4 de rojo de fenol. Se continúa la titulación hasta la desaparición del color azul. A los mililitros de solución de tiosulfato de sodio gastados en la titulación del blanco se les restan los gastados en la titulación de las soluciones de glucosa y se construye la curva de calibración graficando los valores obtenidos de estas restas contra la concentración de glucosa correspondiente. De esta curva se calculan los mililitros de solución de tiosulfato de sodio equivalentes a 1 mg de glucosa.

#### DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES EN MUESTRAS.

Se determinan como en la curva de calibración, usando 1 ó 2 mL del extracto de azúcares o solución problema. También se pueden

determinar haciendo una dilución en agua ajustando la concentración dentro del rango de la curva de calibración y luego aplicando a los cálculos el factor correspondiente de dilución. Los resultados se reportan en mg de glucosa.

#### IV.5. DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES POR EL METODO DE LANE - EYNON.

##### FUNDAMENTO:

El azucar reductor reduce el cobre en la solución de Fehling a óxido cuproso insoluble y de color rojizo. El contenido de azúcares reductores en un alimento es estimado por la determinación del volumen de extracto de azúcares requerido para reducir completamente un volumen específico de solución de Fehling (15).

##### REACTIVOS

- a). Solución de Fehling "A". Comercialmente disponible ó preparada con 69.28 g de sulfato de cobre pentahidratado  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  disueltos en agua y llevando el volumen a 1000 mL, si es necesario se filtra por papel Whatman No.4.
- b). Solución de Fehling "B". Comercialmente disponible ó preparada por disolución de 346 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (sal de Rochelle) y 100 g de NaOH en agua llevando el volumen a 1000 mL.
- c). Indicador de azul de metileno 1%. Disolver 1 g de azul de metileno en 100 mL de agua.
- d). Solución standard de glucosa o azucar invertido. Se pesan cuidadosamente 9.5 g de sacarosa grado reactivo en un matraz volumétrico de 1 litro, adicionar 100 mL de agua y 5 mL de HCl concentrado. Dejar durante tres días a 20 - 25°C ó siete días a 15°C para que tenga lugar la inversión del azucar y lleve el volumen a la marca con agua. Esta solución es estable por varios meses. Pipetear 25 mL de esta solución en un matraz volumétrico de 100 mL adicionando 50 mL de agua. Agregar algunas gotas de solución de fenolftaleína y neutralizar con NaOH 20 % hasta que la solución cambie a rosa, acidifique con HCl 1 N gota a gota hasta que una gota haga desaparecer

el color rosa. Complete el volúmen con agua.

#### ESTANDARIZACION DE REACTIVOS.

Los reactivos comerciales vienen ya estandarizados pero si han sido preparados en el laboratorio se han de mezclar volúmenes iguales de ambas soluciones de Fehling y de la mezcla se toman 10 mL y se depositan en un matraz erlenmeyer de 250 mL, se adicionan 25 a 50 mL de agua y se coloca la solución de azucar invertido ó dextrosa en una bureta de 50 mL, luego se agregan 18-19 mL de solución o el volúmen requerido para reducir todo el cobre de manera que no más de 1 mL sea necesario agregar para completar la titulación. Caliente el matraz en una placa caliente o en un mechero o mechero cubierto con una rejilla de asbesto. Cuando la solución comience a hervir manténgala así por dos minutos y luego adicione 3 gotas de solución de indicador para completar la titulación en un minuto más, hirviendo la solución un total de 3 minutos sin interrupción. El volúmen equivalente será de  $20.37 \pm 0.05$  mL para reducir completamente 10 mL de solución de Fehling, hacer ajustes si es necesario.

#### TITULACION DE LA MUESTRA PROBLEMA

La solución de azucar debe ser neutra y su concentración debe ser tal que las titulaciones varíen entre 15 y 50 mL. Para este propósito ajustar la concentración de la solución de azúcares a valores de 0.1 - 0.3 g de azucar por 100 mL cuando 10 mL de mezcla de reactivos de Fehling es usado por cada determinación. Primero titule por el método incremental y cuando se hallan corregido las diluciones proceder con el método estándar.

#### METODO INCREMENTAL.

Pipetee 10 mL de mezcla de reactivos de Fehling en un matraz de 250 mL y agregue 50 mL de agua. Llene la bureta con la solución de azucar clarificada. Adicione de la bureta suficiente solución para reducir casi completamente la solución de Fehling. Mezcle y caliente a ebullición en un plato caliente o mechero cubierto con una rejilla de asbesto. Hierva por 15 segundos, si el color permanece azul adicione 2 ó 3 mL más de solución de azúcares y hierva por unos cuantos

segundos después de cada adición hasta que solo un leve color azul apenas perceptible permanezca. Adicione 3 gotas de solución de azul de metileno y complete la titulación adicionando gota a gota la solución de azúcares hasta que el indicador sea completamente decolorado. Anotar el volúmen gastado.

#### METODO ESTANDARD.

Pipetear 10 mL de mezcla de reactivos de Fehling en un matraz erlenmeyer de 250 mL. Llene una bureta de 50 mL con la solución a ser valorada. Adicione al matraz casi todo el volúmen requerido para reducir la solución de Fehling dejando sólo 0.5 - 1.0 mL para completar la titulación. Mezcle y caliente a ebullición moderada manteniéndola por dos minutos. Luego añada tres gotas de solución de azul de metileno teniendo cuidado de no dejarlas resbalar por las paredes del matraz. Complete la titulación adicionando la solución de azúcares a la cadencia de 2 - 3 gotas a intervalos de 5 - 10 segundos hasta la completa decoloración del indicador, en este punto el líquido toma un color rojo ladrillo de precipitado de óxido cuproso  $\text{Cu}_2\text{O}$ . Anotar el volúmen gastado.

#### CALCULOS

$$\% \text{ Azúcares reductores} = \frac{(F) \times (\text{Dilución}) \times 100}{(\text{Vol. Titn.}) \times (\text{Peso mta.})}$$

donde:

F = Factor de la solución (en nuestro caso es 0.0509).

Diln. = Recíproco de la dilución empleada.

Vol. Titn. = Volúmen gastado en mL

Peso Mta. = Peso de la muestra en g

#### IV.6. DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE CELULASAS.

Existen métodos de actividad celulolítica basados en la determinación de celulosa residual después del ataque enzimático y otros basados en la determinación de los productos provenientes de la celulosa solubilizada (16).

Entre los primeros se haya el método de pérdida de peso del sustrato. Este tiene la ventaja sobre otros en que puede corregirse de fracciones solubles del sustrato susceptibles de ser atacadas por beta-poli-Glucosidasa frecuentemente presente en preparaciones enzimáticas. Esta fracción llega a ser en ocasiones del orden de 1 a 2 % de la celulosa adicionada y no tiene el suficiente poder reductor como para ser detectada por métodos usuales de azúcares reductores, sin embargo un tratamiento previo de reducción de tamaño casi siempre afecta también al grado de polimerización y de cristalinidad de la molécula y puede incidir en variaciones en los resultados debido al distinto nivel inicial de rompimiento de cadenas celulósicas en el sustrato control.

Hay una variedad de sustratos insolubles utilizados en éste método tales como:

- Celodextrinas
- Celulosa regenerada
- Celofán
- Celulosa de madera
- Celulosa hinchada por álcali
- Celulosa hinchada por ácido fosfórico
- Algodón molido
- Papel filtro
- Fibras de algodón (ocasionalmente).

Dentro de los métodos basados en la determinación de la celulosa solubilizada se mencionan los siguientes:

- ° Formación de carbohidratos solubles
- ° Incremento de azúcares reductores
- ° Determinación colorimétrica de celulosa solubilizada
- ° Ensayo de carboximetilcelulosa
- ° Método del papel filtro

De estos métodos los dos últimos son los que fueron seleccionados para nuestras pruebas; el Ensayo de Carboximetilcelulosa porque es ampliamente usado en este tipo de determinaciones y es el que se sugiere en la literatura de la enzima Celulasa AIE; el método del Papel Filtro presenta numerosas ventajas las cuales se mencionan adelante.

#### ENSAYO DE CARBOXI-METIL-CELULOSA (CMC) .

La carboximetilcelulosa es un derivado soluble de la celulosa como también lo son la metilcelulosa, la hidroximetilcelulosa y el sulfato sódico de celulosa. La CMC es especialmente apropiada para la determinación de actividad celulolítica por medio de cambios de viscosidad o por la aparición de azúcares reductores. El grado de sustitución "DS" o porcentaje de unidades de glucosa con grupos funcionales orgánicos reemplazando hidrógenos en la molécula de CMC, es un parámetro muy importante en cuanto a la susceptibilidad por ataque enzimático. Un alto grado de sustitución DS tiende a frenar la actividad enzimática pero hace a la molécula mas soluble pero cuando todas las moléculas de anhidro-Glucosa contienen un substituyente, la molécula se hace resistente al ataque enzimático.

Hay varias formas de detectar los azúcares provenientes de la hidrólisis de CMC. Entre ellos se encuentran:

a) Con Ferricianuro. La CMC para este ensayo se prepara haciendo una solución al 1% (p/v) de CMC DS = 0.5 calentando a 100°C seguido por una centrifugación a 1800 gravedades por 15 minutos para extraer sedimentos que interfieran. Esta puede guardarse a 3°C por tres días sin cambio de susceptibilidad al ataque enzimático. Se prepara una mezcla conteniendo 0.3 - 0.35 mL de esta solución con 0.15 mL de buffer de acetatos, la enzima se añade entonces y se completa a un volumen de 0.6 mL con agua, la mezcla tendrá un pH de 5.5. La preparación se incuba a 37°C por una hora y la reacción se detiene con la adición de 0.25 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anhidro al 0.13% y 1 mL de solución de KCN al 0.064% y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 0.52%, completando el volumen a 4 mL con agua.

Los azúcares reductores se calculan por medición de la absorbancia de los complejos formados por su reacción con el ferricianuro.

Las otras reacciones de formación de complejos con azúcares reductores son:

b) Con arsenomolibdato. Este reactivo es una solución de molibdato de amonio y arsenato de sodio con ácido sulfúrico.

c) Oxidación con  $I_2$  en medio alcalino.

d) Con ácido di-nitro-salicílico (Reactivo DNS)

todas estas reacciones forman compuestos coloridos que pueden ser medidos por espectrofotometría.

La hidrólisis de CMC es lineal sólo cerca de un 12% de conversión, esto es debido a interferencias de los substituyentes, por eso las unidades de actividad de CMC-asa son arbitrarias y se definen como el inverso de la dilución que da 0.4 - 0.5 mg/mL de glucosa usando 0.5% UIC como sustrato de ensayos a 30 y 60 minutos. Estas unidades pueden convertirse a unidades standard de acuerdo a la Unión Internacional de Bioquímica. Un serio inconveniente de este método es que la cantidad de azúcares reductores producidos está afectada por la naturaleza de la CMC, de su longitud de cadena y de su grado de substitución.

#### IV.7. ACTIVIDAD DE CMC-asa. METODO DE AMANO PHARM.CO.LTD.

El método está basado en la determinación de azúcares reductores resultantes de la hidrólisis de CMC, por lo que es definido por sus autores como "Actividad de CMC-asa". La técnica es la siguiente:

#### REACTIVOS

a) Solución 0,62% de CMC-Na (pH 4.5).

Se toman 0.625 g de CMC-Na grado reactivo y 50 mL de agua, se disuelve con calentamiento y se deja enfriar. Ya fría la solución se le añaden 10 mL de un buffer de acetatos pH 4.5 y el volumen total se lleva a 100 mL con agua.

b) Solución diluida de enzima.

Debe ser diluida cuidadosamente con agua de manera que el valor de  $E - E'$  sea menor a 0.5, las diluciones sugeridas son:

Celulasa "AP"	-	15 000	veces
Celulasa "AIE"	-	20 000	veces

c) Reactivo de Shaffer-Somogyi.

Se prepara como se indica en la técnica de Shaffer-Somogyi para azúcares reductores.

d) Glucosa anhidra.

$C_6H_{12}O_6$  grado reactivo.

#### DETERMINACION

1. Se ponen 4 mL de solución 0.625 % de CMC-Na en un tubo de 50 mL y se coloca en un baño de agua manteniendo su temperatura a 40°C por 5 minutos.
2. Se adiciona 1 mL de solución de enzima y se incuba a 40°C por 30 minutos.
3. Terminado el tiempo de incubación se agregan 5 mL de reactivo de Shaffer-Somogyi y se tapa la boca del tubo con una canica poniéndose dentro de un baño de agua hirviendo durante 20 min.
4. El tubo se enfría con agua y se procede a determinar azúcares reductores agregando los demás reactivos según se indica en la técnica de Shaffer-Somogyi, obteniéndose el valor "E" expresado en mL de solución 0.005 N de tiosulfato de sodio.
5. Separadamente se prepara un blanco de la misma forma indicada arriba pero eliminando la incubación a 40°C por 30 min. El valor obtenido de la curva de calibración expresado en mL de solución 0.005 N de tiosulfato de sodio se denomina "E'".
6. Al valor de E se le resta E' y el resultado se lee en la curva. E - E' expresa mg de glucosa.

#### CURVA DE CALIBRACION.

Se prepara una solución con glucosa previamente secada a 80°C por 5 horas y pesando con exactitud se disuelve en agua. De esta solución se preparan diluciones de manera que 5 mL de cada dilución contengan exactamente 0.05, 0.10, 0.20, 0.30, y 0.40 mg de glucosa respectivamente. Cada porción de 5 mL es tomada y tratada según se indica en la técnica de Shaffer-Somogyi, corriéndose de igual forma un blanco el cual no contiene glucosa. Al valor de su titulación llamado "B" se le restan individualmente los valores obtenidos para cada dilución y se construye la gráfica colocando en el eje de las ordenadas los mililitros gastados en la titulación y en el de abscisas los mg de glucosa empleados en cada dilución.

## CALCULOS

En las condiciones citadas 100 unidades de CMC-asa se definen como la cantidad de enzima que produce azúcares reductores equivalentes a 1 mg de glucosa por minuto.

$$\text{Actividad de CMC-asa (U/g)} = \frac{G}{30} \times 100 \times D$$

de donde:

G = Azúcares reductores expresados en mg de glucosa.

D = Múltiplo de la dilución de la enzima.

## IV.8. METODO DEL PAPEL FILTRO.

Para mediciones prácticas de endo ( $C_x$ )-beta-Glucanasa o algún otro componente, el método de CMC es insatisfactorio (17). El método del Papel Filtro en cambio tiene las ventajas de usar un sustrato fácilmente disponible, reproducible, ni muy susceptible ni muy resistente al ataque enzimático y puede ser medido por unidad de area que evita los problemas de pesado y de dispersión de sólidos.

La actividad de Papel Filtro (FPA) es referida a la cantidad de azúcares reductores como glucosa producidos durante el ensayo por 1 mL de enzima para fines de control de fermentación o de comparación de enzimas. Para trabajos cuantitativos se usa la base de 0.5 miligramos de glucosa por mililitro análoga a la unidad  $C_x$  definida anteriormente. La actividad de Papel Filtro es afectada por la concentración de enzima y el tiempo de incubación de una manera inversa, mientras que ella crece conforme aumenta la concentración de celulosa. Debiera usarse la unidad de celulasa basada en el sistema internacional pero se requiere para ésto de un más alto grado de conversión para tener resultados significativos y como la celulosa es esencialmente insoluble, la concentración efectiva de celulosa es la superficie, si ha de aumentarse a concentraciones mayores de 5% por adiciones de más celulosa o por molienda se incrementaría la contribución de las enzimas por disponer de mayor superficie de contacto y con esto se elevaría el nivel de reacción y su

linearidad pero también se incrementaría la acción de las enzimas en las regiones amorfas de la celulosa. Es pues de mayor interés la hidrólisis en las regiones más cristalinas y resistentes que en las amorfas. El Papel Filtro es el sustrato que tiene desde terminales libres en regiones amorfas hasta fibras cristalinas. Cabe mencionar por ejemplo que el algodón como sustrato requiere de incubaciones de 24 o más horas, mientras que con el método del Papel Filtro se requiere de solo una hora.

#### TECNICA.

El ensayo original utiliza 50 mg de papel filtro y 0.5 mL de enzima con un tiempo de incubación de una hora. Una modificación fué introducida en Peoria Mass. al reducir el tiempo de incubación a 30 minutos con la misma cantidad de enzima pero usando 100 mg de papel filtro, sin embargo se escogió la original y es la que en seguida se reproduce:

#### REACTIVOS.

- a). Papel Whatman No.1 en tiras de 1 x 6 cm (50 mg).
- b). Solución buffer 0.05 M de citrato de sodio/ácido cítrico de pH 4.8 .
- c). Standards de glucosa disueltos en buffer.
- d) Reactivo de ácido dinitrosalicílico DNS para azúcares reductores. El reactivo modificado de Miller es el que mejores resultados ha dado y su composición porcentual es la siguiente:  
1.00 % Acido dinitrosalicílico  
0.20 % Fenol  
0.05 % Sulfito de sodio  
1.00 % Hidróxido de sodio.

#### PROCEDIMIENTO.

- 1). Disolver el polvo de enzima en solución buffer a razón de 1.0 - 5.0 mg/mL
- 2). Poner 0.5 mL de preparación enzimática y 1 mL de solución buffer en un tubo de ensayo de 18 mm de largo.

- 3). Adicionar una tira de papel filtro y mezclar en vórtex para que el papel filtro se moje y se cubra con la solución.
- 4). Incubar a 50°C por espacio de una hora.
- 5). Adicionar 3 mL de reactivo DNS para detener la reacción.
- 6). Poner los tubos en agua hirviendo por 5 min., luego enfriarlos a temperatura ambiente.
- 7). Tomar lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm.

Incluir un blanco (sin papel filtro) para corregir cualquier azúcar presente en la preparación. Aplicar el mismo procedimiento a partir del paso #5 para los standards de 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, y 3.0 mg de glucosa disueltos en solución buffer y elaborar la curva de calibración.

Determinar la cantidad de azúcares como glucosa, los mg de glucosa producida en el ensayo son la FPA o actividad de papel filtro. El DNS mide azúcares reductores no específicamente, cuando se usa Xilosa como standard los valores serán 15% más altos en base al peso, y con Celobiosa serán 15% más bajos.

C A P I T U L O

V

P L A N T E A M I E N T O

D E L

T R A B A J O

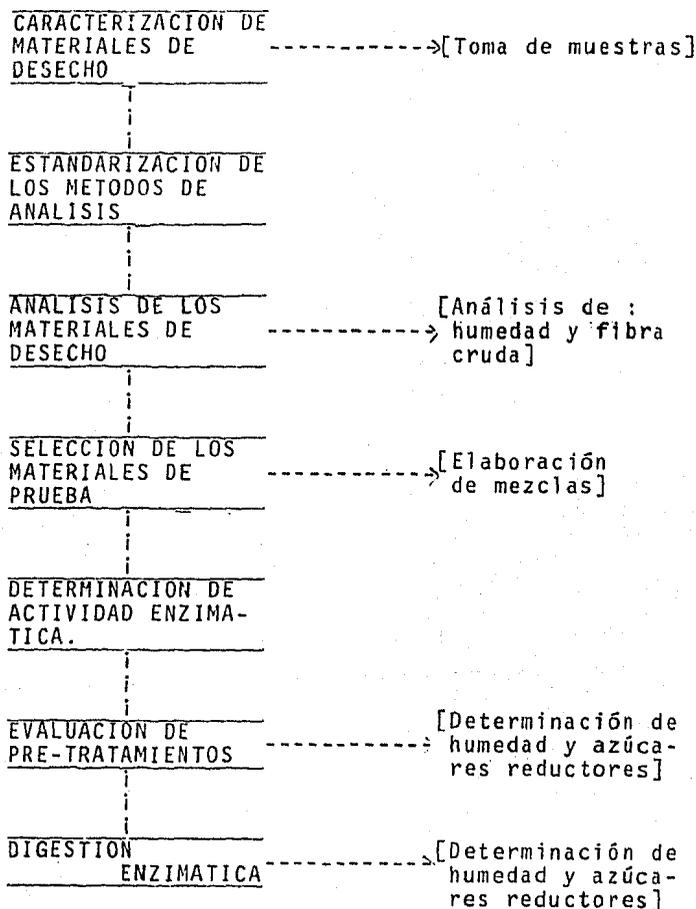
E X P E R I M E N T A L

## C A P I T U L O V

### PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL.

El trabajo experimental de la presente t sisis se plante  de acuerdo al siguiente esquema:

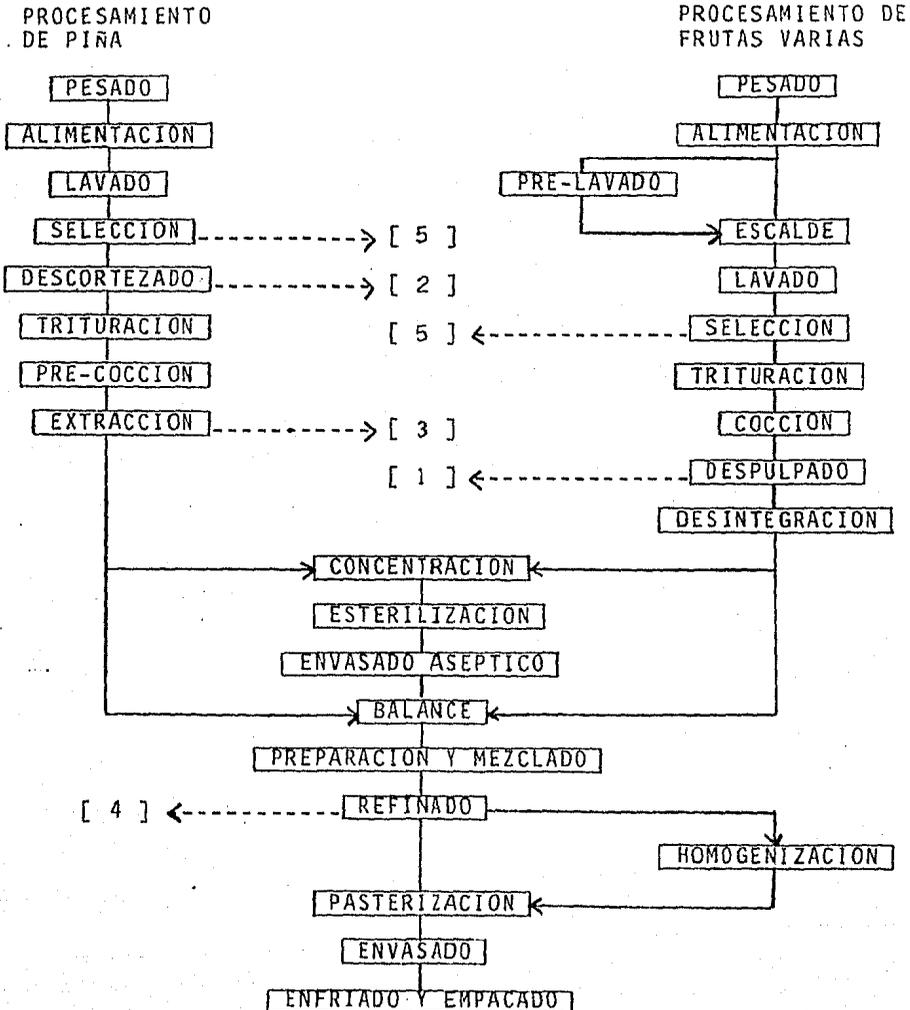
ESQUEMA No.1



### V.1. CARACTERIZACION DE MATERIALES DE DESECHO.

Con objeto de indicar el lugar de donde provienen las muestras de los materiales de desecho se presenta a continuación el diagrama de bloques que describe la secuencia de operaciones a las cuales son sometidas las frutas y que señala los puntos de donde provienen los desechos de la planta en cuestión, los distintos tipos de desecho se indican por medio de números encerrados en paréntesis rectangulares.

ESQUEMA No.2



Los desperdicios de fruta que se obtienen en las distintas etapas de procesamiento poseen diferentes características y las cantidades varían de un punto a otro, por lo que se hace necesario dar una breve explicación de los desechos obtenidos en cada lugar, dichos materiales fueron clasificados de la siguiente manera utilizando para ello las letras designadas en el diagrama anterior:

1).- Materiales procedentes del pulper o despulpador.

Estos materiales son los resultantes del proceso de eliminación de cáscaras, huesos, semillas, pedúnculos y partes gruesas en la elaboración de pulpas de mango, guayaba, manzana, pera, durazno, guanábana y tamarindo. En el despulpador las paletas interiores las cuales giran dentro de una malla cilíndrica forzan a la pulpa y partes menudas a pasar a través de los orificios de la malla y los materiales gruesos tales como huesos triturados y enteros, semillas, cáscaras, fibras, etc. quedan retenidos en la malla y son descargados al exterior por medio de una compuerta. Estos materiales salen por lo general con un alto contenido de humedad que lo pierden rápidamente debido a la alta temperatura con que salen ( 80 - 90 °C ). Su apariencia es muy variable según la fruta de que se trate, pero por lo general son materiales desmenuzados de aspecto fibroso con bajo aroma y sabor.

2).- Materiales procedentes del descortezador de Piña.

La máquina descortezadora de piña corta un cilindro de la parte interior de la fruta abarcando casi la totalidad de la porción comestible y deja caer a los lados la corteza, ésta sale por un conducto que a su vez descarga a un transportador helicoidal que lleva estos materiales a la tolva de desechos. Estos desechos son fundamentalmente trozos grandes de corteza de piña que en ocasiones son del tamaño de casi la totalidad de la superficie de la fruta. Es importante notar que en estos residuos quedan frecuentemente partes comestibles adheridas a la corteza, esto se observa principalmente cuando las piñas que se utilizan son grandes.

### 3).- Materiales procedentes del extractor de jugo de Piña.

Luego de que la porción comestible (mesocarpio y corazón) es separada, se muele en un molino desintegrador de navajas y la pulpa resultante es bombeada a una marmita donde es pre-cocida. Dicha marmita alimenta al extractor de jugo que es un rotor helicoidal vertical que lleva ascendentemente la pulpa molida y la presiona al girar contra las paredes de una malla cilíndrica forzando así al jugo a pasar a través de los orificios, y escurriendo después por la parte externa hacia un depósito donde es recolectado, de ahí es llevado al concentrador o bién continúa hacia la preparación del producto final. El bagazo que es retenido dentro de la malla se descarga por la parte superior del extractor y es conducido por un canal hacia una carretilla donde se deposita. La carretilla se cambia periódicamente cuando se llena y el bagazo se lleva hacia el sistema recolector de desechos. Este material es de naturaleza sumamente fibrosa, de color amarillo ocre pálido con puntos oscuros y de aroma y sabor muy bajos, además tiene la característica de perder rápidamente la humedad.

### 4).- Materiales procedentes del finisher o refinador.

El finisher es estructural y funcionalmente igual que el pulper pero éste posee una malla con orificios mas pequeños (Un pulper utiliza frecuentemente mallas con orificios de 0.03 a 0.06 pulgadas de diámetro, en tanto que un finisher las usa de 0.018 a 0.022 pulgadas de diámetro) y se emplea para retirar impurezas y partículas gruesas de los néctares ó jugos después de su preparación y antes de ser homogenizados y pasteurizados. Como en el caso del pulper los desechos son descargados por una compuerta hacia una carretilla. En general estos residuos son mucho más finos que los que se obtienen del pulper, su apariencia es en ocasiones la de un puré como en el caso de la manzana, pera y durazno, sin embargo al probarlos su textura es áspera y fibrosa. La cantidad de estos desechos en comparación con los que provienen de los pulpers, de el extractor o el descortezador es muy pequeña, el de mayor

interés por su cuantía es el que resulta del procesamiento de la guayaba.

E).- Materiales procedentes de la banda de selección.

No es una fuente sana de materia prima para la obtención de azúcares ya que todas las frutas retiradas presentan en mayor o menor grado un estado de putrefacción, lo cual podría ocasionar problemas de contaminación con hongos y levaduras, a menos que se les diera un riguroso tratamiento adicional que aún así no garantizaría la calidad de los productos resultantes.

## V.2. ANALISIS DE LOS MATERIALES DE DESECHO Y SELECCION DE LOS MATERIALES DE PRUEBA.

Ya localizadas las fuentes directas de los materiales de desecho se hacía necesario conocer su potencial como fuente de carbohidratos susceptibles a hidrólisis enzimática. Para ésto se tenían que analizar tanto en su contenido de humedad como en su contenido de fibra cruda tomando ciertas precauciones durante el muestreo (las muestras se recolectaron en recipientes herméticos de plástico y fueron rápidamente enfriadas y después congeladas hasta el momento de su análisis) con lo que se lograría :

1. Conocer qué tanto pueden rendir potencialmente como fuente de carbohidratos.
2. Tener una base de cálculo para el rendimiento del proceso.
3. Dosificar las enzimas según el contenido de sustrato en el material en cuestión.

En base a los resultados se podría entonces identificar los materiales más convenientes y elaborar mezclas de ellos que fueran representativas de las frutas que se procesan según la temporada, es decir que reflejaran la composición de los desechos que son tirados en un momento dado en la planta en estudio, de ella serían seleccionadas las dos mas importantes.

### V.3. EVALUACION DE PRE-TRATAMIENTOS Y DIGESTION ENZIMATICA.

Los pre-tratamientos seleccionados tanto por su facilidad de aplicación en las condiciones y el equipo con que cuenta la planta, como por su probada efectividad según se muestra en la literatura son los que siguen:

- A. Tratamiento con NaOH al 15 % a temperatura ambiente durante 24 horas.
- B. Tratamiento con NaOH al 30 % a temperatura ambiente durante 24 horas.
- C. Pre-digestión con NaOH al 1 % a 94°C durante una hora.
- D. Pre-digestión con NaOH al 4 % a ebullición constante por 15 minutos.
- E. Pre-digestión con hidróxido de sodio al 15 % mantenido a 60°C por 24 horas.

Los pre-tratamientos fueron evaluados por medio del rendimiento de azúcares reductores al final del pre-tratamiento y después de la digestión enzimática. Para esta última etapa se emplearon las mismas condiciones de reacción en cuanto a incubación y relación enzima-sustrato, así se comparó la acción de una enzima versus la otra en dos tipos distintos de sustrato (ver mas adelante Mezclas Pñ/Gb y Mz/Gy). La digestión enzimática fué evaluada en base al rendimiento de azúcares reductores obtenidos con relación al contenido inicial de sólidos y de fibra cruda en la muestra de desecho.

### V.4. EVALUACION ECONOMICA PRELIMINAR.

Para tener idea de la factibilidad económica de la producción de azúcares a partir de los desechos de frutas de la planta en estudio se buscó hacer una evaluación económica exploratoria que incluyera toda la información disponible acerca de los siguientes puntos:

- Rendimiento del proceso por Kg de materia seca de desecho de fruta.
- Costo de materia prima.

-Costo de manufactura.

-Gastos indirectos (vapor, energía eléctrica, depreciación etc.).

C A P I T U L O

VI

R E S U L T A D O S.

## VI.1. ESTANDARIZACION DE METODOS DE ANALISIS.

- a) Curva de calibración para el método Shaffer-Somogyi de zúcares reductores.

Se prepararon diluciones conteniendo 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, y 3.0 mg de glucosa como se indica en la técnica, los valores de titulación (ml de soln. tiosulfato de sodio 0.005N) de cada una de ellas, su promedio y la diferencia del valor del blanco (B) menos el promedio individual ( $B-\bar{X}$ ) se indican en la siguiente tabla:

TABLA V  
CURVA DE CALIBRACION PARA EL METODO SHAFFER-SOMOGYI.

mg de glucosa	Valores de titulación en mL (X).				Promedio ( $\bar{X}$ )	Valor ( $B-\bar{X}$ )
0.0	15.8	15.6	16.0	15.7	15.8	0.0
0.5	13.6	13.6	13.8	13.6	13.7	2.1
1.0	11.4	11.5	11.5	11.8	11.6	4.2
1.5	9.2	9.5	10.2	9.4	9.6	6.2
2.0	7.5	7.8	8.1	8.9	8.1	7.7
2.5	6.8	6.8	7.1	6.4	6.8	9.0
3.0	4.7	5.5	5.3	5.3	5.2	10.6

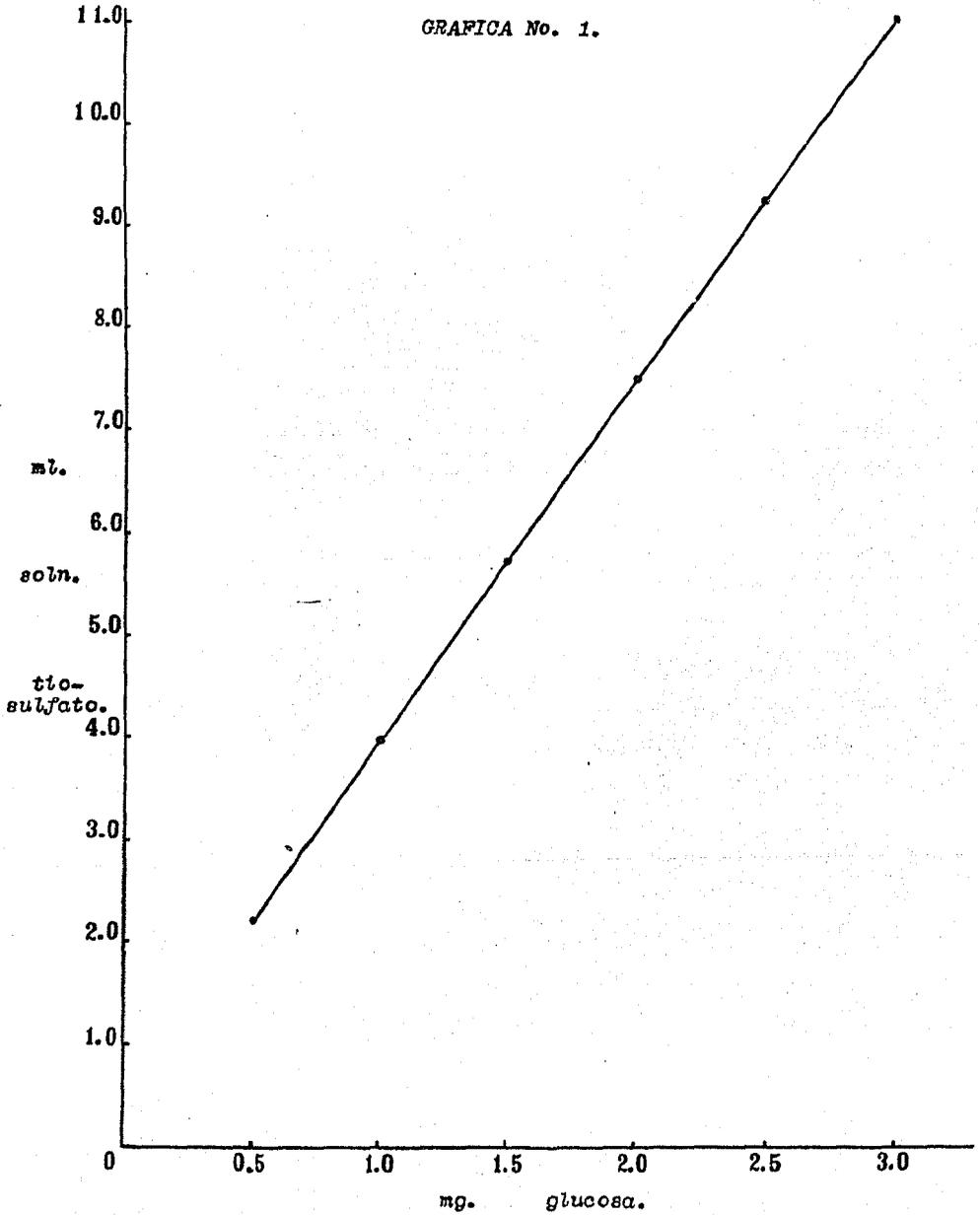
A estos valores se les hizo una regresión lineal ajustado la curva por el método de "Mínimos cuadrados". La ecuación encontrada para la recta fué la siguiente:

$$\text{ml soln. tiosulfato} = 3.51 (\text{mg glucosa}) + 0.43$$

donde 3.51 es la pendiente de la recta y 0.43 la ordenada al origen. El coeficiente de determinación  $r^2$  de la recta es de 0.99. Este coeficiente indica cuán cerca de la linealidad se encuentran los datos experimentales, cuanto más se acerque a 1, mas próximos se encuentran de la recta. La gráfica de esta curva se muestra en seguida.

CURVA DE CALIBRACION DE GLUCOSA.  
METODO DE SHAFFER - SOMOGYI.

GRAFICA No. 1.



b) Curva de calibración para el reactivo DNS utilizado en la determinación de actividad de papel filtro.

Primeramente se prepararon diluciones a partir de una solución de glucosa de 2 mg/mL usando buffer pH 4.8 según se indica en la siguiente tabla:

TABLA VI  
PREPARACION DE DILUCIONES PARA LA CURVA DE REACTIVO DNS.

mL de solución de glucosa (2mg/mL)	mL de solución buffer de pH 4.8	mg de glucosa en dilución final.
0.00	1.50	0.0
0.25	1.25	0.5
0.50	1.00	1.0
0.75	0.75	1.5
1.00	0.50	2.0
1.25	0.25	2.5
1.50	0.00	3.0

Siguiendo el procedimiento se hicieron reaccionar las diluciones con el reactivo DNS para luego hacer las lecturas en el espectrofotómetro a la longitud de onda de 550 nm. A cada dilución excepto el blanco hubo necesidad de volver a diluirlos agregando a 1 mL de muestra problema 3 mL de agua destilada. La curva fué corrida por triplicado anotando los valores de % Transmitancia y de Absorbancia y encontrando su respectivo promedio. La curva del % de transmitancia resultó ser una hipérbola y la de Absorbancia una recta, por lo que se le hizo a esta última una regresión lineal por el método de mínimos cuadrados para ajustarla a la recta cuya ecuación es la siguiente:

$$A = 0.74 (\text{mg de glucosa}) - 0.01$$

de donde 0.74 es la pendiente de la recta y -0.01 es la ordenada al origen. Para esta recta el coeficiente de determi

-nación " $r^2$ " tuvo un valor de 1, por lo que se concluye que los datos experimentales mostraron una tendencia casi lineal en la curva de el caso de la absorbancia. Los datos experimentales se resumen en la siguiente tabla y la gráfica de la curva ajustada se encuentra en la próxima página.

TABLA VII  
LECTURAS PROMEDIO DE ABSORBANCIA Y TRANSMITANCIA PARA LAS SOLUCIONES PATRON.

Contenido de glucosa mg	Absorbancia	Transmitancia %
0.0	0.00	100.00
0.5	0.40	45.15
1.0	0.67	21.95
1.5	1.12	8.50
2.0	1.45	4.50
2.5	1.90	2.00
3.0	2.20	1.00

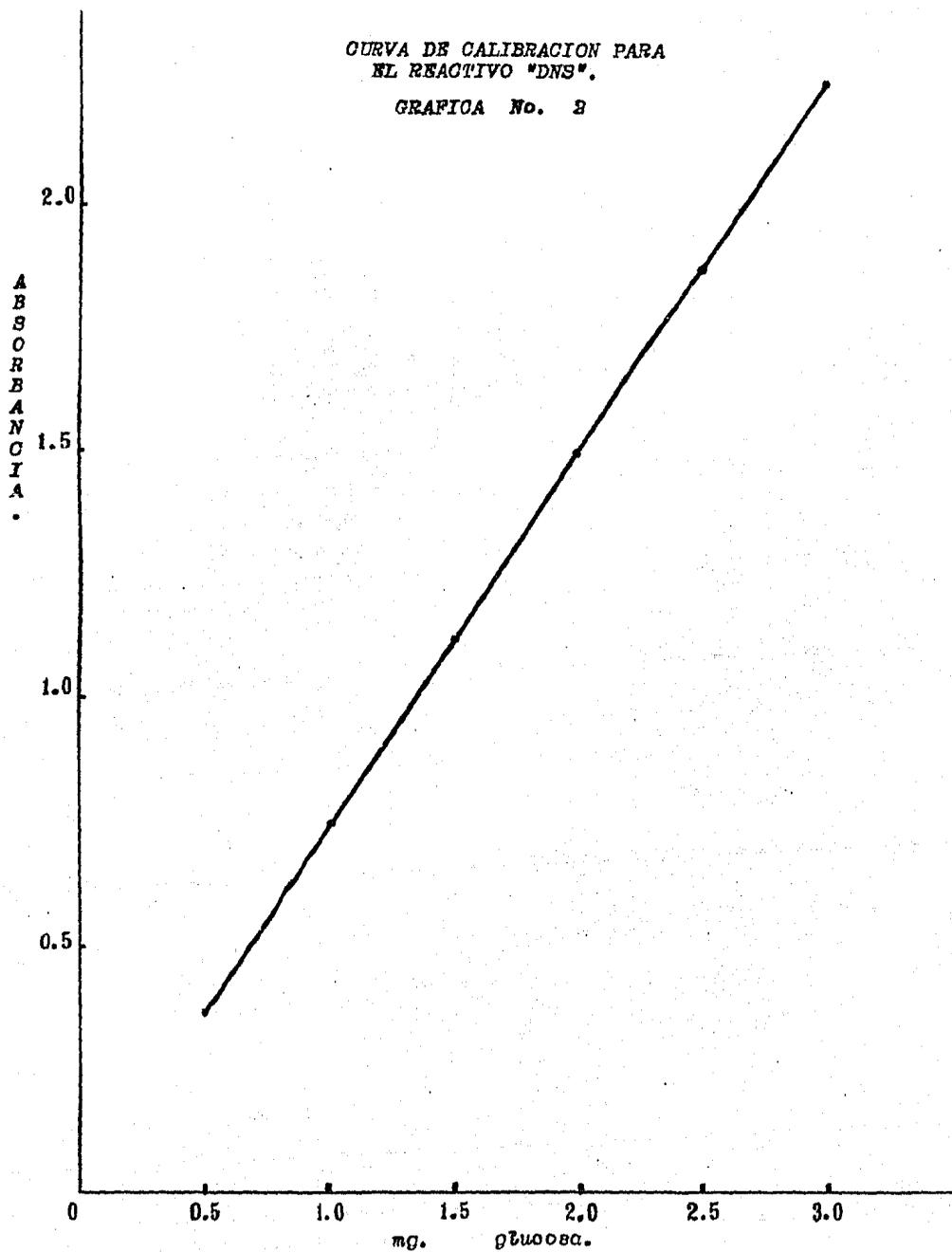
## VI.2. DETERMINACION DE ACTIVIDAD CELULOLITICA.

### a) Según el método de Amano Pharm.Co.

Ambas enzimas (Takamine y Cellulase AIE) fueron disueltas en agua destilada a una concentración de 0.268 mg/mL (factor de dilución 3730) y se les determinó la actividad corriendo paralelamente un blanco de los reactivos, y los valores promedio de tres determinaciones se anotan en el siguiente cuadro:

CURVA DE CALIBRACION PARA  
EL REACTIVO "DNS".

GRAFICA No. 2



CURVA DE CALIBRACION PARA  
EL REACTIVO "DNS".

GRAFICA No. 3

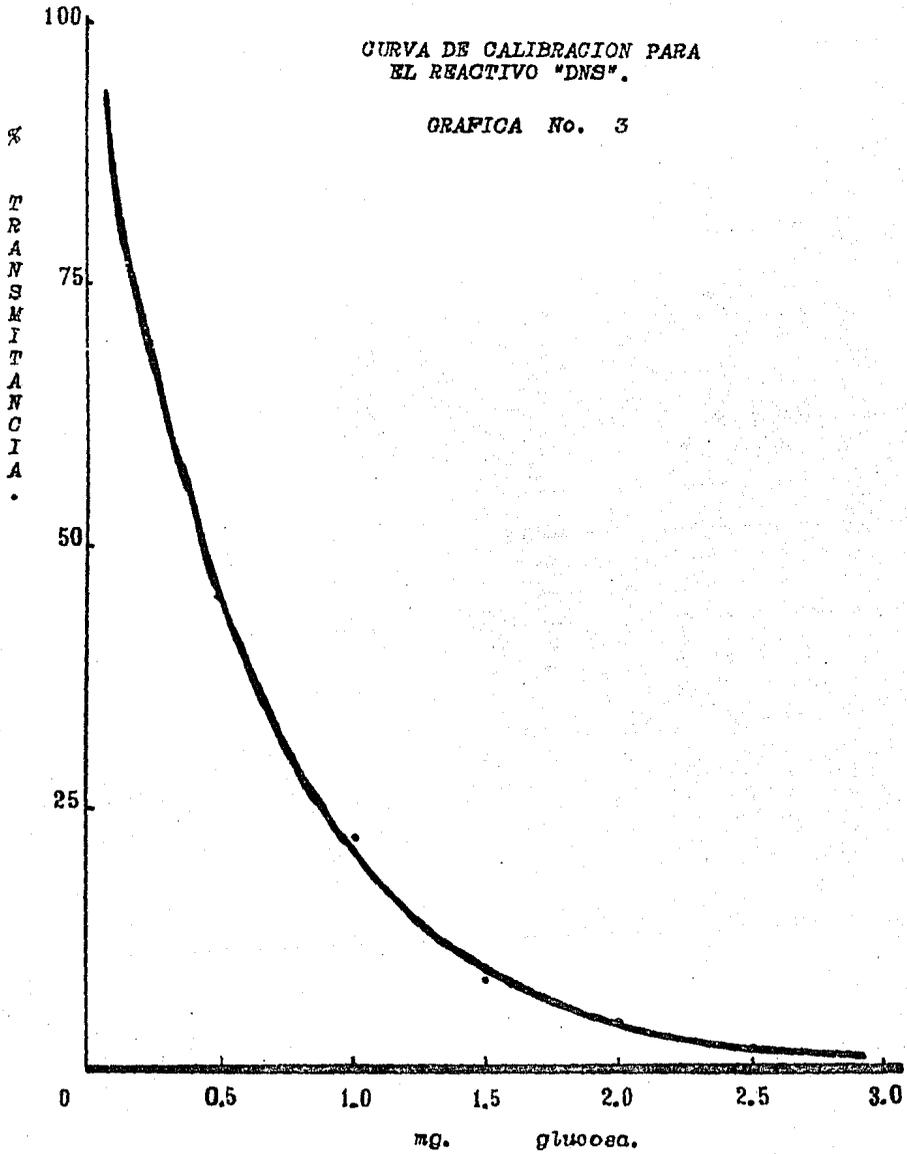


TABLA VIII  
ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LAS ENZIMAS EMPLEADAS SEGUN METODO DE  
AMANO PHARM. CO.

Muestra	mL Titulación	Valor B- $\bar{X}$ (*) mL	mg de Glucosa (en gráfica)
CELULASA "AIE"	15.07	1.08	0.19
TAKAMINE	15.20	0.95	0.15
Blanco (B)	16.15	0.00	-

(\*) El valor B- $\bar{X}$  es la diferencia de 16.15 menos el valor individual de cada enzima.

Aplicando la fórmula, las actividades resultantes fueron:

$$\text{Celulasa "AIE": Act.CMCasa} = \frac{0.19 (100)(3730)}{30} = 2362 \text{ u}$$

$$\text{Takamine: Act.CMCasa} = \frac{0.15 (100)(3730)}{30} = 1865 \text{ u}$$

Con este tipo de sustrato y bajo las condiciones del ensayo, la Celulasa AIE muestra tener mayor actividad de CMCasa que la Takamine.

b) Según el método del papel filtro.

Se siguió enteramente el método descrito preparando una solución de 5.0 mg/mL de cada una de las enzimas en buffer pH 4.8. Se tomaron 0.5 mL de cada solución y 1 mL de buffer, los cuales se mezclaron en un tubo de ensayo con una tira de 50 mg de papel filtro Whatman No.1, se incubó cada tubo y después se le adicionaron 3 mL de reactivo DNS para después medir su absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm. Con el objeto de ajustar las lecturas dentro del rango sensible del aparato hubo que diluir cada muestra utilizando un mililitro de solución por tres de agua destilada. Aparte se prepararon blancos de los reactivos con cada una de las enzimas pero eliminando la incubación. Las lecturas obtenidas se muestran en la siguiente tabla:

TABLA IX  
ACTIVIDAD DE PAPEL FILTRO PARA LAS ENZIMAS EMPLEADAS.

Enzima	A	$\bar{A}$	$(\bar{A}-A_0)$	Factor diln.	$(\bar{A}-A_0)4$	mg glucosa (FPA)
Celulasa "AIE"	0.62 0.53 0.59	0.58	0.46	4	1.84	<u>2.50</u>
Blanco (A <sub>0</sub> )	0.12					
Takamine	1.45 1.30 1.36	1.37	0.69	4	2.76	<u>3.74</u>
Blanco (A <sub>0</sub> )	0.68					

En estos resultados se puede observar lo opuesto a lo que se obtuvo por el método anterior, en este caso Takamine tuvo una actividad FPA ligeramente mayor y sugiere que quizá haya una mayor afinidad de Takamine por sustratos de tipo más bien cristalino que amorfo, sucediendo lo contrario con Celulasa AIE la cual se muestra más activa con sustratos amorfos del tipo de CMC. La información obtenida por ambos métodos no es concluyente respecto a cual enzima posee más actividad, por el contrario nos indica que debido a la diferente actividad de ambas por un determinado sustrato, sería interesante probar la acción de las dos sobre los bagazos en estudio.

### VI.3. ANALISIS DE LOS MATERIALES DE DESECHO.

Los resultados de los análisis de humedad y contenido de fibra cruda que se anotan en el cuadro que sigue son el resultado de el promedio de tres determinaciones, el contenido de fibra cruda se da en base húmeda y en base seca, así mismo se indica también la fruta de la que se producen y el lugar de donde provienen:

TABLA X  
CONTENIDO DE HUMEDAD Y FIBRA CRUDA DE LOS DISTINTOS BAGAZOS.

DESECHO (fruta)	PROCEDENCIA	HUMEDAD %	FIBRA CRUDA % B. húmeda	FIBRA CRUDA % B. seca
1. DURAZNO	Pulper	83.37	4.44	26.68
2. GUANABANA	Pulper	69.93	13.53	45.41
3. GUAYABA	Pulper	59.73	16.90	41.97
4. MANGO	Pulper	66.83	11.34	34.18
5. MANZANA	Pulper	78.87	4.95	23.41
6. PERA	Pulper	79.47	9.02	43.89
7. PIÑA	Extractor	79.70	4.17	20.56
	Descortezador	81.03	2.07	11.25
8. TAMARINDO	Pulper	37.57	36.23	96.43

#### VI.4. SELECCION DE LOS MATERIALES DE PRUEBA SEGUN LOS RESULTADOS PRELIMINARES.

Para la selección de los materiales de prueba se consideraron los siguientes aspectos:

- \* Que sea un desecho cuyo volumen de producción sea alto.

En este aspecto los mejores prospectos son: piña, manzana, guayaba y mango (ver tabla II).

- \* Que tenga un alto contenido de fibra cruda y/o celulosa.

En esto sobresalen el tamarindo, la guanábana, la pera y la guayaba (ver tabla X).

- \* Que no presente serios problemas para ser molido con el equipo de planta

Bajo este aspecto los desechos de tamarindo, durazno (hueso y peto), y el mango quedarían excluidos pues por sus características son materiales difíciles de moler.

- \* Que el procesamiento de la fruta respectiva no haya sido o vaya a ser descontinuado en un futuro cercano.

Al respecto durazno, fresa, papaya, pera y tomate no se procesarán más en la planta o acaso serán procesados ocasionalmente.

\* Que no impartan sabores y/o colores desagradables al producto final.

En este punto experiencias previas y ajenas a esta tesis han mostrado que el bagazo de tamarindo y la corteza de piña presentan serios inconvenientes.

Considerando todos estos aspectos, de la tabla X se eliminarían los desechos de durazno, mango, pera, piña (descortezador) y tamarindo, quedando como materiales seleccionados los desechos procedentes de:

Guanábana (Pulper)  
 Guayaba (Pulper)  
 Manzana (Pulper)  
 Piña (Extractor)

Las épocas del año en que la citada compañía recibe estas cuatro frutas se señalan en seguida.

TABLA XI.  
 TEMPORADAS

FRUTA	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC
Guanábana						X	X					
Guayaba										X	X	X
Manzana									X	X		
Piña	X	X	X	X	X	X	X					X

Como se puede apreciar las temporadas de guanábana y piña coinciden en los meses de Junio y Julio, y las de guayaba y manzana en Octubre, así pues se podría trabajar estos bagazos agrupándolos en dos mezclas: Una de piña - guanábana (Pñ/Gb) y la otra manzana - guayaba (Mz/Gy).

Para definir los porcentajes en que se compondrían dichas mezclas se recurrió a los récords anuales de la empresa sobre consumo

de las frutas señaladas. La información que se transcribe en seguida incluye la cantidad consumida de la fruta en cuestión y el porcentaje que representa sobre el total de cada pareja.

TABLA XII  
CONSUMO ANUAL DE LAS FRUTAS SELECCIONADAS.

FRUTA	1979		1980		1981	
	Tons.	%	Tons.	%	Tons.	%
Piña	1387.7	84.1	3661.2	96.2	3388.9	99.3
Guanábana	261.5	15.9	144.6	3.8	22.2	0.7
Total	1649.2	100.0	3805.8	100.0	3411.1	100.0
Manzana	2079.7	81.0	262.2	39.5	2315.5	66.3
Guayaba	488.7	19.0	402.4	60.5	1175.7	33.7
Total	2568.4	100.0	664.6	100.0	3491.2	100.0

1979 fué un mal año para piña, 1980 un pésimo año para manzana y 1981 para guanábana. Para la mezcla Pñ/Gb se sacó un promedio de los porcentajes de participación con respecto al consumo total de cada una en los años 1979 y 1980:

Piña - 90.15 %  
Guanábana - 9.85 %

con estos datos se decidió definir la mezcla Pñ/Gb con la siguiente composición:

Bagazo piña extractor - 90.0%  
Bagazo guanábana pulper - 10.0%

En el caso de la mezcla Mz/Gy el promedio de 1979 y 1981 es el que sigue:

Manzana - 73.65 %  
Guayaba - 26.35 %

con ello se decidió definir la composición de la mezcla Mz/Gy como:

Bagazo manzana pulper - 75.0%  
Bagazo guayaba pulper - 25.0%

### VI.5. EVALUACION DE PRE-TRATAMIENTOS.

Los pre-tratamientos enunciados en su oportunidad en el apartado V.3 son los que a continuación se citan:

- A. Remojo con NaOH al 15% a temperatura ambiente durante 24 Hs.
- B. Remojo con NaOH al 30% a temperatura ambiente durante 24 Hs.
- C. Pre-digestión con NaOH al 1% a 94°C durante una hora.
- D. Pre-digestión con NaOH al 4% a ebullición constante durante 15 minutos.
- E. Pre-digestión con NaOH al 15% a 60°C por 24 Hs.

Como material de prueba se utilizó bagazo de manzana fresco mezclado con agua a razón de 1:1 y pasado por un molino de conminución (Comitrol), el contenido de sólidos totales del material molido era de 15.4%.

Las cantidades de bagazo e hidroxido de sodio utilizadas fueron las siguientes:

TABLA XIII  
MEZCLAS DE REACCION

Sólidos de bagazo (g)	Cantidad de Soln. NaOH	Concentración de NaOH
<u>A</u> - 100 (649.4 g b. fresco)	- 100 g	- 15 %
<u>B</u> - 100 (649.4 g b. fresco)	- 50 g	- 30 %
<u>C</u> - 50 (324.7 g b. fresco)	- 1000 mL(1010g)	- 1 %
<u>D</u> - 50 (324.7 g b. fresco)	- 187.5 mL(195g)	- 4 %
<u>E</u> - 100 (649.4 g b. fresco)	- 100 g	- 15 %

El bagazo fué analizado en su contenido de azúcares reductores por el método de Lane-Eynon y se encontró que poseía 1.76% en base seca. Habiendo finalizado los períodos de pre-tratamiento, el bagazo resultante de cada caso fué enfriado y después filtrado a través de la malla No.100 y por papel Whatman No.4. Cada licor

fué neutralizado con HCl diluido y de ello se hicieron diversas diluciones a las cuales se les determinaron azúcares reductores por triplicado.

Separadamente se prepararon blancos de las cantidades indicadas de bagazo con agua destilada en lugar de las soluciones de hidróxido de sodio, los resultados se anotan en la tabla que está a continuación:

TABLA XIV  
DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES EN LICORES DE PRE-TRATAMIENTO.

Pre-tratamiento	% Azcs. Reductores en el licor	% Azcs.Reds. blanco	% Azcs. Reductores producidos
A	1.63 ± 0.03	0.23	1.40 ± 0.03
B	0.98 ± 0.03	0.25	0.73 ± 0.03
C	0.12 ± 0.02	0.06	0.06 ± 0.02
D	0.81 ± 0.07	0.17	0.64 ± 0.07
E	1.65 ± 0.23	0.23	1.42 ± 0.01

Para obtener el incremento de azúcares reductores en la reacción hubo que considerarse el contenido inicial de sólidos totales en la mezcla de bagazos y el contenido final de azúcares reductores expresados como dextrosa en el licor. La unidad para medir dicho incremento se definió en la siguiente forma:

$$\text{gramos de dextrosa producidos} / 100 \text{ g de sólidos de bagazo} \\ (\text{ g dext./ 100 g sol. bag.})$$

El rendimiento como tal se encontró aplicando una simple regla de tres:

$$\% \text{ Rend.} = \left( \frac{\% \text{ Azúcares reductores producidos}}{\% \text{ Sólidos tots.iniciales en mezcla}} \right) \times 100$$

Considerando los sólidos totales de las mezclas iniciales y calculando el incremento de azúcares reductores se encontró el rendimiento para cada pre-tratamiento según se muestra en la siguiente tabla:

TABLA XV  
RENDIMIENTO DE CADA PRE-TRATAMIENTO

Pre-tratamiento	% Sólidos totales iniciales en mezcla.	Rendimiento ( g dext./ 100 g sol.bag.)
A	13.34	10.50 $\pm$ 0.23
B	14.30	5.11 $\pm$ 0.19
C	4.72	1.27 $\pm$ 0.42
D	9.62	6.65 $\pm$ 0.68
E	13.34	10.65 $\pm$ 0.07

Indiscutiblemente estos resultados indican que "A" y "E" fueron los mejores pre-tratamientos pues cualquiera de ellos tiene una diferencia estadísticamente significativa ( nivel alfa = 0.05 ) sobre los pre-tratamientos "B", "C", y "D". Ahora, entre "A" y "E" la diferencia no es estadísticamente significativa ( alfa = 0.05 ), pero si se toma en cuenta que es mucho mayor el gasto de energía que se requiere para mantener la temperatura de la mezcla de reacción a 60°C que el que ocasiona el mismo pre-tratamiento mantenido a temperatura ambiente, resulta entonces que el "A" posee mayores ventajas sobre el "E" dando prácticamente el mismo rendimiento.

Como segunda parte de la evaluación de pre-tratamientos, los residuos sólidos de cada uno fueron profusamente lavados con agua a través de una malla No.100 hasta que el agua de lavado salía completamente neutra y su contenido de azúcares reductores era cero. En seguida el pH fué ajustado a 4.5 con ácido fosfórico grado alimenticio al 75%. A 100 g de cada uno de ellos se les adicionó 0.1 % de Takamine previamente disuelta en solución buffer pH 4.5 y 300 g de agua. Las mezclas fueron incubadas a 60°C por 2 hs. al cabo de las cuales se les extrajo el licor por filtración y se les determinó el contenido de azúcares reductores. El rendimiento encontrado en la forma descrita anteriormente se indica en la tabla que se encuentra a continuación:

TABLA XVI  
RENDIMIENTO DE DIGESTION

Pre-tratamiento	% Sólidos totales iniciales	% Azcs.Red. producidos	Rendimiento de digestión (g dext./100g s.b.)
A	6.7	0.041 $\pm 4.58 \times 10^{-3}$	$0.612 \pm 6.87 \times 10^{-2}$
B	6.9	0.054 $\pm 5.29 \times 10^{-3}$	$0.782 \pm 7.45 \times 10^{-2}$
C	6.3	0	-
D	5.7	0	-

La digestibilidad del sustrato fué ligeramente mayor con el pre-tratamiento "B" que con el "A" mas esta diferencia no llega a ser estadísticamente significativa ( alfa = 0.05 ) sin embargo si se suman los rendimientos del pre-tratamiento y la digestión para ambos, se tiene que el rendimiento global de "A" es 11.11 g dext./100 g sol.b. en tanto que el de "B" es de solo 5.89 g dext./100 g sol.bag. por lo que resalta el pre-tratamiento "A" como el mas conveniente. Por otra parte se vió que bajo las condiciones del ensayo con los pre-tratamientos "C" y "D" no hubo producción de azúcares reductores, esto pudo deberse a que el sustrato tuvo una menor digestibilidad. Siendo que el pre-tratamiento "A" tuvo un rendimiento de digestión mayor que "C" y "D" estadísticamente significativa (alfa = 0.05), y que en términos globales es mejor que el "B", entonces "A" fué seleccionado para los siguientes trenes de prueba.

## VI.6 DIGESTION ENZIMATICA.

El efecto del pre-tratamiento sobre la digestión enzimática fué estudiado realizando pruebas con sustratos que fueron pre-tratados y también con otros que no lo fueron, el procedimiento para ambos se describe en seguida:

### a) Procedimiento de prueba para muestras pre-tratadas.

1. Se partió de mezclas de bagazo previamente molidas en el molino de conminución, a las que se les adicionó la mínima cantidad de agua, de manera que el contenido de sólidos totales en las mezclas era de 24.0 % para Pñ/Gb y 16.5 % para Mz/Gy.

2. A 100 g de sólidos de bagazo ( 416.7 g de Pñ/Gb y 606.1 g de Mz/Gy en base húmeda ) se les adicionaron 100 g de NaOH 15 % dejándolos remojar durante 24 hs. a temperatura ambiente. El contenido de sólidos totales en esta etapa era de 12.9 % para Pñ/Gb y 9.4 % para la mezcla Mz/Gy.

3. Al finalizar el período se diluyó la mezcla agregando la mitad de su peso en agua ( 258 g para Pñ/Gb y 353 g para Mz/Gy ).

4. Se filtró el licor con papel Whatman No 4, se neutralizó y se le determinó el porciento de azúcares reductores.

5. Los residuos resultantes fueron profusamente lavados con agua a través de una malla No 100, luego fueron adicionados de ácido fosfórico g.a. al 75 % a razón de 3 mL/Kg de mezcla hasta ajustar su pH = 4.5.

6. Fué analizado el contenido de sólidos de ambas mezclas pre-tratadas y acidificadas dando los siguientes valores: Pñ/Gb = 10.4 % y Mz/Gy = 11.5 %

7. Se pesaron porciones de 100 g de cada mezcla acidificada y a una de Pñ/Gb se le adicionó 0.104 g de Takamine previamente disuelta en 300 g de agua, a otra porción similar se le adicionó la misma cantidad

pero de Celulasa AIE ( 1% b.s.). En forma semejante a una porción de mezcla Mz/Gy se le agregaron 0.115 g ( 1% B.S.) de Takamine y a la otra igual cantidad de Celulasa AIE previamente disueltas en 300 g de agua

8. Los contenidos de sólidos totales eran entonces:

$$P\bar{n}/G_b = 2.6 \% \quad \text{y} \quad M_z/G_y = 2.9 \%$$

9. Se mezcló cada porción y se incubó a 60°C durante 12 horas en una estufa, luego se les extrajo el licor por filtración, nuevamente se neutralizó y se le determinó a cada uno su contenido de azúcares reductores.

b) Procedimiento de prueba para muestras no pre-tratadas.

1. Se analizó el contenido inicial de azúcares reductores en las mezclas sin pre-tratamiento.

2. A 100 g de sólidos de bagazo ( 416.7 g P $\bar{n}$ /G $_b$  y 606.1 g Mz/Gy ) se les adicionaron 300 g de agua y se les ajustó el pH = 4.5 con ácido fosfórico g.a. al 75 %.

3. Se agregó a cada mezcla el agua necesaria para reducir el contenido de sólidos totales hasta los niveles anotados en el punto No.6 del procedimiento anterior.

4. De cada mezcla se tomaron porciones de 100 g y se les añadieron las enzimas en los mismos niveles del punto No.7 anterior.

5. Los sólidos totales hasta entonces eran: P $\bar{n}$ /G $_b$  = 2.6 % y Mz/Gy = 2.8%

6. Las porciones fueron incubadas y analizadas según se anota en el punto No.9 anterior.

Los resultados del análisis de azúcares reductores para ambos procedimientos se encuentran en las tablas números XVII y XVIII en la página siguiente:

TABLA XVII  
PORCIENTO DE AZUCARES REDUCTORES DESPUES DEL PRE-TRATAMIENTO.

	<u>Pñ/Gb</u>	<u>Mz/Gy</u>
% de azúcares red. iniciales en mezcla (b.h.).....	1.11....	0.34
% de azúcares reductores finales (b.h.).....	3.08....	1.14
% de azúcares reductores obtenidos por efecto del pre-tratamiento.....	1.97....	0.80

TABLA XVIII  
PORCIENTO DE AZUCARES REDUCTORES EN LOS LICORES DESPUES DE LA DIGESTION ENZIMATICA.

<u>ENZIMA</u>	<u>SUSTRATO</u>	<u>Pñ/Gb</u>	<u>Mz/Gy</u>
1 - Takamine	Sin pre-tratamiento (°)	0.033	0.040
2 - Takamine	Con pre-tratamiento	0.054	0.056
3 - Celulasa AIE	Sin pre-tratamiento (°)	0.060	0.042
4 - Celulasa AIE	Con pre-tratamiento	0.144	0.064

(°) Son valores corregidos por el contenido inicial de azúcares reductores en las mezclas de reacción.

El cálculo del rendimiento fué hecho según la fórmula:

$$\% R = \frac{(\% \text{ Az.Red. producidos})}{(\% \text{ Sol.Tot.inic.})} \times 100$$

Los valores de sólidos totales iniciales empleados fueron:

	<u>Pñ/Gb</u>	<u>Mz/Gy</u>
Mezcla de pre-tratamiento.....	12.9.....	9.4
Mezcla de digestión sin pre-tratamiento....	2.6.....	2.8
Mezcla de digestión con pre-tratamiento....	2.6.....	2.9

Los rendimientos calculados para cada mezcla con y sin pre-tratamiento utilizando las dos enzimas se resumen en la tabla que se encuentra en la siguiente página.

TABLA XIX  
 RENDIMIENTOS.  
 (expresados en g dex./100 g sol.)

<u>PRE-TRATAMIENTO</u>			
	Mezcla Pñ/Gb	-	15.27
	Mezcla Mz/Gy	-	8.51
<u>DIGESTION ENZIMATICA</u>			
MEZCLA	ENZIMA	S/PRE-TRATAMIENTO	C/PRE-TRATAMIENTO
Pñ/Gb	Takamine	1.27	2.08
Pñ/Gb	Celulasa AIE	2.31	5.54
Mz/Gy	Takamine	1.43	1.93
Mz/Gy	Celulasa AIE	1.50	2.21

Al observar esta tabla se puede apreciar el beneficio que aporta el pre-tratamiento para aumentar la digestibilidad del sustrato y así mejorar el rendimiento a casi el doble en el caso de Pñ/Gb, pero más notable aún es el que la mayor obtención de azúcares ocurre durante el pre-tratamiento en sí más que durante la fase enzimática, el rendimiento de ésta es cuando más un tercio del rendimiento del pre-tratamiento. Este punto es discutido en el siguiente capítulo.

Sumando el rendimiento obtenido en el pre-tratamiento con el de la digestión enzimática realizada con Celulasa AIE (la que más altos rendimientos dió) se tienen los rendimientos globales del proceso para los dos distintos materiales:

Pñ/Gb - 20.81 g dex./100 g sólidos

Mz/Gy - 10.72 g dex./100 g sólidos

Para transformar estos rendimientos en base al contenido de fibra cruda de cada mezcla, se consideran los contenidos porcentuales de fibra cruda que aporta a la mezcla cada tipo de desecho, para ello se consultaron los datos expuestos en la Tabla X para efectuar el siguiente cálculo:

$$100 \text{ g sol. Pñ/Gb} = 100 \text{ g sol} \times \frac{[0.9(0.2056) + 0.1(0.4541)] \text{ g f.c.}}{100 \text{ g sol.}}$$

es decir contienen 23.04 gramos de fibra cruda por cada 100 g sol. y de forma similar:

$100 \text{ g sol. Mz/Gy} = 100 \text{ g sol.} \times \frac{[0.75 (0.2341) + 0.25 (0.4197)] \text{ g f.c.}}{100 \text{ g sol.}}$   
o sea que contienen: 28.05 g f.c./100 g sol.

Y así los rendimientos expresados como g de dextrosa por 100 g de fibra cruda quedarían como sigue:

$$\text{Pñ/Gb} = \frac{20.81 \text{ g dext.}}{100 \text{ g sols.}} \times \frac{100 \text{ g sols.}}{23.04 \text{ g f.c.}} = 90.32 \text{ g dext./ 100 g f.c.}$$

$$\text{Mz/Gy} = \frac{10.72 \text{ g dext.}}{100 \text{ g sols.}} \times \frac{100 \text{ g sols.}}{28.05 \text{ g f.c.}} = 38.22 \text{ g dext./ 100 g f.c.}$$

lo cual viene a indicar que el proceso es bastante eficiente tratándose de la mezcla Pñ/Gb tal vez por la naturaleza de ese sustrato, no su cediendo lo mismo con Mz/Gy la cual parece ser menos susceptible a la hidrólisis alcalino-enzimática.

C A P I T U L O

VII

EVALUACION DEL COSTO DE LOS PROCESOS

y

CONCLUSIONES

## C A P I T U L O VII

### EVALUACION DEL COSTO DE LOS PROCESOS Y CONCLUSIONES.

#### VII.1.- EVALUACION DEL COSTO DE LOS PROCESOS.

Primeramente se habrán de calcular los insumos que por concepto de materia prima resultan de la aplicación del pre-tratamiento "A" combinado con la hidrólisis enzimática. En el capítulo anterior se destacan los rendimientos para cada mezcla expresados en g dextrosa/100 g sólidos de bagazo y son:

Pñ/Gb - 20.81

Mz/Gy - 10.72

Por tanto para encontrar los costos de cada reactivo fijaremos nuestra base de cálculo en 1 Kg de dextrosa seca, es decir, calculando las cantidades de materiales en función de obtener 1 Kg de producto.

Así pues con dichos rendimientos las cantidades de sólidos de bagazo se calcularon de la siguiente manera:

$$A = \text{Kg sol. bag.} = 1 \text{ Kg dext.} \frac{100 \text{ Kg sol. bagazo}}{\text{rendimiento (Kg dext.)}}$$

Luego conociendo ya los Kg de sólidos de bagazo requeridos, se procedió a calcular los Kg de NaOH al 40% (concentración comercial) y de ácido Fosfórico al 85% grado alimenticio que se utilizaría en el pre-tratamiento y en la neutralización, tomando en cuenta que los niveles de uso fueron:

0.375 Kg NaOH 40%/Kg sólido bagazo

Y

0.025 l H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> g.a. 85%/Kg sol. bag. (Pñ/Gb)

0.023 l H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> g.a. 85%/Kg sol. bag. (Mz/Gy)

Las operaciones efectuadas para calcular la cantidad de NaOH -

40% fueron las siguientes:

$$\text{Kg NaOH } 40\% = A \times \frac{0.375 \text{ Kg NaOH } 40\%}{1 \text{ Kg sol. bag.}}$$

y para el ácido Fosfórico se hizo de la siguiente forma:

$$\text{L H}_3\text{PO}_4 \text{ 85\%} = A \times \frac{0.025 \text{ L H}_3\text{PO}_4 \text{ g.a. 85\%}}{1 \text{ Kg sol. bag.}} \quad (\text{Pñ/Gb})$$

$$\text{L H}_3\text{PO}_4 \text{ 85\%} = A \times \frac{0.023 \text{ L H}_3\text{PO}_4 \text{ g.a. 85\%}}{1 \text{ Kg sol. bag.}} \quad (\text{Mz/Gy})$$

luego el cálculo del consumo de enzima se hizo como sigue:

$$\text{Kg enzima} = A \times 0.01$$

en todos ellos "A" es la cantidad requerida de sólidos de bagazo calculada anteriormente.

TABLA XX

COSTO DEL PROCESO CON PRETRATAMIENTO "A" POR CONCEPTO DE MATERIA PRIMA. (Base de cálculo: 1 Kg de dextrosa seca)

INGREDIENTE	I. Con celulasa AIE				
	PRECIO IN GREDIENTE \$	NIVEL USO Pñ/Gb	NIVEL USO Mz/Gy	COSTO Pñ/Gb	COSTO Mz/Gy
1.-Sólidos de bagazo	--	4.81	9.33	--	--
2.-NaOH al 40%	32.50/Kg	1.80	3.50	58.50	113.75
3.-Ac. Fosfórico 85%	280.00/L	0.12	0.22	33.60	61.60
4.-Celulasa AIE	3700.00/Kg	0.05	0.09	185.00	333.00
				\$ 270.10	508.35

II. Con Takamine

INGREDIENTE	PRECIO INGRE DIENTE (\$)	NIVEL USO Pñ/Gb	NIVEL USO Mz/Gy	COSTO Pñ/Gb	COSTO Mz/Gy
1.-Sólidos de bagazo	--	4,81	9.33	--	--
2.-Sosa al 40%	32.50/Kg	1.80	3.50	58.50	113.75
3.-Ac. Fosfórico 85%	280.00/L	0.12	0.22	33.60	61.60
4.-Takamine	3530,90/Kg	0.05	0.09	179.05	322.30
				<u>\$ 271.15</u>	<u>497.65</u>

Al observar la tabla anterior se puede señalar lo siguiente:

- 1° Sólo por concepto de materiales, el costo de producción es bastante alto en comparación a los precios de 1984 del azúcar industrial: \$38,00/Kg la de 2a. y \$43,00/Kg la de 1a., si se suma además lo que resulta de los conceptos res tantes, el costo se incrementaría aún más.
- 2° El costo de la enzima es de por sí alrededor del 65% del costo total de materia prima, por lo que vale la pena ver si el tratamiento por sí solo es más rentable que con diges ti ón enzim ática.
- 3° La mezcla Pñ/Gb es por todo, la que mejores posibilidades tiene de ser procesada para la obtención de azúcares debido a su más alto rendimiento y menor costo de proceso.

Atendiendo a estas observaciones se procedió entonces a costear el pre-tratamiento únicamente según los métodos A, B, C, D y E men cionados en la Tabla XV del capítulo VI en la cual se anotan los siguientes rendimientos:

Pre-tratamiento	Rendimiento en g dex/100 g sol. bag.
A	10.50
B	5.11
C	1.27
D	6.65
E	10.65

Siguiendo el mismo tratamiento de datos anterior, se procedió a calcular la cantidad de sólidos de bagazo necesaria para producir 1 Kg de dextrosa seca, y en base a ésto calcular después el requerimiento de los reactivos.

Pre-tratamiento	Kg sol. bag. usados por Kg dex. seca
A	9.52
B	19.57
C	78.74
D	15.04
E	9.39

Considerando los datos de la Tabla XIII (pág. ) donde se especifican las cantidades de NaOH utilizadas en cada pre-tratamiento, se calculó el requerimiento de Hidróxido de sodio al 40% por cada Kg de dextrosa seca así como el consumo de ácido Fosfórico necesario para la neutralización, ésto se muestra en la Tabla XXI.

TABLA XXI

USO DE SOSA AL 40% Y DE ACIDO FOSFORICO 85% PARA LOS DISTINTOS PRE TRATAMIENTOS.

Pre-tratamiento	Kg NaOH 40% /Kg sol. bag.	Kg NaOH 40% /Kg dext.seca	L H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 85% /Kg dext. seca
A	0.375	3.57	0.22

Pre-tratamiento	Kg NaOH 40% /Kg sol. bag.	Kg NaOH 40% /Kg dex.seca	L H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 85% /Kg dex.seca
B	0.375	7.34	0.45
C	0.505	39.76	1.81
D	0.390	5.87	0.33
E	0.375	3.52	0.22

Pre-tratamiento	Costo NaOH \$ M.N.	Costo H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> \$ M.N.	Costo Total (\$/Kg dext. seca)
A	116.03	61.32	177.35
B	228.55	126.00	354.55
C	1292.20	507.08	1799.28
D	190.78	92.68	283.46
E	114.40	60.48	174.88

Comparando lo expuesto en la tabla XXI con lo de la XX se anota lo siguiente:

- i) A excepción de los pre-tratamientos "A" y "E", los demás superan al costo del pre-tratamiento "A combinado con la digestión enzimática para la mezcla Pñ/Gb.
- ii) Dichos pre-tratamientos A y E tienen un costo de materia prima muy similar, pero si se toma en cuenta que el "E" se realiza consumiendo energía para mantener 60°C x 24 horas y en cambio el "A" se lleva a cabo a temperatura ambiente, luego el "A" resulta más atractivo dada la pequeña diferencia en costo.
- iii) Aún sin adicionar los gastos indirectos por concepto de manufactura, todos los costos de pre-tratamiento superan por amplio margen al del precio del azúcar industrial (en Cd. México: \$38.00/Kg la de 2a. y \$43.00/Kg la de 1a.) y aún al precio internacional del azúcar (\$104.00/Kg).

Se procedió entonces a analizar factores que ayudaran a hacer

más rentable el proceso, entre ellos:

a) Recuperación y reutilización de subproductos de reacción. En este aspecto se contempla la recuperación de una variedad de fosfatos de sodio y de otros elementos, además de la reobtención de ácido Fosfórico y de Hidróxido de Sodio. Ante todo hay que tener presente que la planta en estudio no es una planta de síntesis químicas, por lo que no dispone de equipos comunes en una fábrica de productos químicos tales como reactores, cristalizadores, destiladores, centrifugadoras, etc., ésto hace difícil esta operación y tal vez requiera de una costosa inversión al corto plazo. Siendo esta alternativa poco probable de realizarse se puede considerar que tanto Hidróxido de Sodio como ácido Fosfórico se pierden durante la neutralización.

b) Amortización por el ahorro de transporte al no tener que tirar los desperdicios.

Para analizar este punto se calculó hipotéticamente el volumen de producción anual teniendo como única limitante la cantidad de bagazos obtenidos. Considerando el mayor volumen de desechos obtenido durante 1980 de 3,380 toneladas - (ver Tabla II) y suponiendo que el rendimiento promedio de todos estos bagazos fuera el experimentalmente encontrado de 20.81 Kg dextrosa/100 Kg sólidos de bagazo ( consultar Secn.VI.6), entonces se estima la máxima producción anual de dextrosa o glucosa usando un contenido promedio de humedad en el desecho de 70% :

$$3,380 \times 0.3 \times 0.2081 = 211.01$$

Estas 211 toneladas anuales de dextrosa comparadas con el consumo de azúcar en un año de alrededor de 9,000 toneladas vienen sólo a representar el 2.3%, si se toma en cuenta que la fuerza edulcorante de la dextrosa es del orden del 75% de la del azúcar de caño, este porcentaje se reduce a únicamente 1.73%.

Así pues, para hacer rentable este proceso, habría que -

procesar desechos de otras plantas procesadoras de frutas de las cercanías de la localidad, para así incrementar la producción a un nivel que tuviera algún impacto en la economía de la empresa. Una lista de dichas plantas se encuentra en el apéndice.

Ahora bien, conjuntando el gasto actual que realiza la empresa para acarrear y tirar los desechos y que es de alrededor de 1,000,000. de pesos anuales con el gasto que ocasionaría la producción anual de 211 toneladas de glucosa a partir de bagazo (Usando el mínimo costo de \$265.<sup>00</sup>/kg) que resulta de 56 millones de pesos, realmente el primero parece insignificante e indica que mientras no se les de a tales desperdicios un fin más útil, puede considerarse este gasto como un mal menor.

Ahora en la contraparte existen razones para afirmar que el proceso sería algo más costoso de lo debido a lo calculado.

- 1.- Aún no se han incluido los demás conceptos tales como mano de obra, energía, merma, depreciación, inversión fija etc. a los costos expuestos en las tablas XX y XXI.
- 2.- Se prevee la necesidad de un proceso de refinación del jarabe y que requiere de posterior investigación, donde productos - que resultan extraídos junto con los azúcares (los cuales le dan un tono café oscuro indeseable para aplicación directa - sobre néctares claros o jugos transparentes) serían eliminados. También aparte de los compuestos coloridos otros quedan al jarabe un sabor extraño o de la fruta de que proviene el desecho serían retirados.
- 3.- Existe la necesidad de evaporar el jarabe a concentraciones - que permitan el manejo de menores volúmenes y de una mejor - conservación, ésto incrementaría aun más los costos.

Es por todas estas razones que en las presentes circunstancias económicas del país, este proceso no es viable si como fin se pretende producir edulcorantes que compitan al menos en precio, si nó en calidad con el azúcar de caña.

## VII.2.- CONCLUSIONES

Sobre el primer objetivo:

En él se menciona la factibilidad de obtener azúcares a partir de residuos de frutas tras un proceso técnicamente sencillo y económicamente atractivo; y de ello se concluyó lo siguiente:

- 1° Definitivamente si es posible la obtención de azúcares a partir de desechos del procesamiento de frutas usando una combinación de pre-tratamiento alcalino con NaOH y una digestión enzimática con celulasas.
- 2° La potencialidad de los desechos del procesamiento de frutas en la planta en estudio como fuente de carbohidratos es digna de consideración.
- 3° Las instalaciones que posee la empresa en estudio permiten con sencillas modificaciones la implementación del proceso.

Sobre el segundo objetivo:

El habla de la selección de las condiciones de pre-tratamiento óptimas que combinadas con la acción enzimática den el mejor rendimiento y que sean fáciles de obtener en la mencionada planta, al respecto se concluyó:

- 1° El rendimiento de la hidrólisis está afectado por varios factores, unos son los inherentes a cualquier proceso enzimático (pH, conc. enzima, temperatura, etc.), pero además también influyen el tipo de pre-tratamiento empleado y la naturaleza de los desechos.
- 2° El pre-tratamiento alcalino es de suma importancia para el rendimiento final después de la digestión enzimática, llegando a incrementarlo hasta en un 140%.

- 3° El pre-tratamiento es quien mayormente aporta azúcares reductores al rendimiento global, produciéndose el 73% de los mismos durante esta fase y en algunos casos aún más.
- 4° Las condiciones que mejor rendimiento dieron dentro de las revisadas fueron las que siguen:

Mezcla: Pñ/Gb (Bagazo de Piña 90%/Bagazo de Guanábana 10%)  
Pre-tratamiento: Remojo con NaOH al 15% (15 g NaOH/100 g sólidos de bagazo) a temperatura ambiente durante 24 horas.  
Digestión enzimática: Enzima Celulasa AIE 1% base sólidos de bagazo -  
pH = 4.5, T = 60°C durante 12 horas.

#### Sobre el tercer objetivo:

Se relaciona con el análisis económico preliminar de los procesos para ver su factibilidad económica. Aquí se concluyó lo que sigue a continuación:

- 1° El actual costo de materia prima por Kg de dextrosa es muy elevado en comparación al precio del azúcar industrial, y aún algo mayor, que el precio internacional, por lo que por este solo concepto el proceso estudiado ya resulta económicamente no viable aún sin detallar los restantes insumos.
- 2° Poniendo en una balanza los beneficios que aporta la digestión enzimática contra el costo que representa el empleo de la enzima, nos encontramos que cuando más, aporta un 27% de los azúcares producidos, y sin embargo representa alrededor del 65% del costo de materia prima del proceso.  
Esto indica que tal vez no haya objeto en realizar la fase enzimática y sea mejor realizar únicamente el pre-tratamiento.
- 3° La rentabilidad del proceso además está sujeta a la búsqueda de otras fuentes de desechos industriales de frutas y/o

vegetales provenientes de plantas localizadas en la cercana, pues de otra manera el volumen de producción sería muy pequeño en comparación al consumo de azúcar de la compañía.

No obstante aunque las conclusiones expuestas conduzcan a pensar que hay poco porvenir en el proyecto, hay que recalcar que el constante alza del precio del azúcar, tendiente a una nivelación con el precio internacional, aunado a las perspectivas de un retiro total del subsidio otorgado por el gobierno, además de la creciente demanda del carbohidrato, se podría pensar que en un futuro se pudiera contar con un proceso económicamente viable, realizando investigaciones posteriores que reduzcan al mínimo el costo del proceso.

### VII.3.- ALTERNATIVAS A FUTURO

Es necesario ante todo reducir el costo del proceso, ya sea por la búsqueda de otros métodos de pre-tratamiento tales como el incremento del tiempo de contacto de bagazo con álcali, el uso de reactivos menos caros o en menor cantidad y de una mejora sustancial del rendimiento. En caso de no encontrarse una buena solución, se podría pensar en diferir la utilización de los azúcares hacia procesos alternos como la obtención de alcohol, proteína unicelular, ó producción de ácido Acético.

Otro camino que queda es el de dar un uso distinto a los desechos, tales como forrajes, fabricación de vinagre o bien como combustible para la producción de energía/vapor que es algo que a últimas fechas ha logrado importantes avances.

A P E N D I C E

PLANTAS PROCESADORAS DE FRUTAS Y/O VEGETALES  
CERCANAS A LA LOCALIDAD DE LA CITADA EMPRESA

- 1.- Almacenes Refrigerantes, S.A. de C.V.  
Km. 14.9 Carretera México-Laredo  
Santa Clara, Edo. de México.
- 2.- Casa Ferrer, S.A.  
Dr. Arce No. 54  
México 7, D.F.
- 3.- Compañía Comercial Herdez, S.A.  
Calzada Sn. Bartolo Naucalpan No. 360  
Col. Tacuba, México 17, D.F.
- 4.- Conservas Guajardo, S.A.  
Lago Hielmar No. 44  
México 17, D.F.
- 5.- Conservas La Costeña, S.A.  
Km. 19.5 Carretera México-Pachuca  
Tulteplac, Edo. de México
- 6.- Conservas La Torre, S.A.  
Calzada A la Venta No. 13  
Cuautitlán Izcalli, Edo. de México
- 7.- El Paraíso, S.A.  
Izcabalceta No. 82  
México 4, D.F.

- 8.- Elías Pando, S.A. de C.V.  
Lago Alberto No. 438  
México 17, D.F.
  
- 9.- Empacadora Búfalo, S.A.  
Bahía de Ballenas No. 6  
Col. Verónica-Anzures,  
México 17, D.F.
  
- 10.- Empacadora de Frutas y Jugos, S.A. (Júmex)  
Antigua Carretera a Pachuca Km 12.5  
Xalostoc, Edo. de México
  
- 11.- Kraft Foods de México, S.A. de C.V.  
Pino 459, México 4, D.F.
  
- 12.- La Cubana S.A.  
Cedro No. 208, México 4 D.F.
  
- 13.- La Suiza S.A.  
Lago Alberto No. 416, México 17, D.F.
  
- 14.- Mundet S.A. Jugos de Frutas  
Autopista México-Querétaro Km 37 1/2  
Cuautitlán Izcalli, Edo. de México
  
- 15.- Productos La Vera S.A.  
Poniente 122 No 352  
Col. Industrial Vallejo, México 16, D.F.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Berliner Research Center Inc.  
F-217 "Use of cellulosic wastes to produce sugar to alcohol"  
Berliner Research Building. (1980).
- 2.- J.L. Cooper  
"The potential of food processing solid wastes as source of  
cellulose for enzymatic conversion".  
Biotechnol. & Bioeng. Symp. No 6 251-281 (1976)
- 3.- C.E. Dunlap  
"Nutrients from Cellulose"  
Food. Technology p. 62-67 (Dec 1975)
- 4.- L.A. Spano-J. Medeiros-M. Mandel  
"Enzyme conversion of Cellulose to sugar opens vast food/  
protein resource."  
Food processing p. 43-44 (Apr. 1975)
- 5.- R. Kamm-K. Meacham - L.S. Harrow - F. Monroe  
"Evaluating new business opportunities from food wastes".  
Food Technology p. 36 - 40 (June 1977)
- 6.- E.B. Cowling  
"Structural features of Cellulose That influence its  
susceptibility to enzymatic hydrolysis." Advances in  
enzymic hydrolysis of Cellulose and related materials.  
Ed. by E.T. Reese. Mc. Millan Co. N.Y. (1963)
- 7.- C.E. Dunlap - J. Thomson - L.C. Chiang  
"Treatment processes to increase cellulose microbial  
digestibility."  
Aiche Symposium Series No. 158 Vol. 72 p. 58-63

- 8.- M.A Millet - A.J. Baker - L.D. Satter  
"Physical and Chemical Pretreatments for enhancing Cellulose saccharification."  
Biotechnology & Bioengineering Symp No. 6  
125 - 153 (1976)
- 9.- E.T. Reese - M. Mandels  
"Enzymatic hydrolysis of beta-glucans." Advances in enzymic hydrolysis of cellulose and related materials."  
Ed. by E.T. Reese, Mc Millan. Co. N.Y. (1963)
- 10.-K.W. King.  
"Endwise degradation of cellulose"  
Adv. in enzymic hydrd. of cellulose and rel. mats.  
Ed. by E.T. Reese Mc. Millan N.Y (1963)
- 11.-K.Nisizawa - Y. Hashimoto - Y. Shibata.  
"Specifications of some cellulases of the random type"  
Adv. in enzymic hydroly. of cellulose and rel. mats.  
Ed. by E.T. Reese. Mc. Millan N.Y (1963)
- 12.-A.S. Perlin  
"The action of beta - glycanases on beta - glycans of mixed linkage."  
Adv. in enzymic hydrolysis of Cellulose and related materials.  
Ed. by E.T. Reese Mc. Millan N.Y. (1963)
- 13.-N, Toyama  
"Degradation of food stuffs by cellulase and related enzymes."  
Adv. in enzymic hydroly. of Cellulose and rel. mats."  
Ed. by E.T. Reese Mc. Millan Co. N.Y (1963)
- 14.-A.O.A.C  
"Official methods of analysis of the Asociation of Official Analytical Chemists."  
Ed. by W. Horwitz, A. Senzel, H. Reynolds and D.L. Park.  
20 th edition (1975)

15.- J.A. Ruck

Chemical methods for analysis of fruit and vegetable products,  
Canada Dept. of Agriculture  
Publication No 1154 (1963)

16.- G. Halliwell

"Measurement of cellulase and factors affecting its activity".  
Ed. by E.T. Reese  
The Mc Millan Co. N.Y (1963)

17.- M. Mandels - R. Andreotti - C. Roche

"Measurement of Saccharifying Cellulase".  
Biotechnol & Bioeng. Symp. No.6 21 - 23  
by John Wiley & Sons Inc. (1976)