

**FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y
URBANISMO**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL Y COMERCIO EXTERIOR**

TESIS

**OBTENCIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES POR
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA A PARTIR DE LOS
RESIDUOS DE MANGO (*Mangífera
Indica L.*)**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
AGROINDUSTRIAL Y COMERCIO EXTERIOR**

Autores:

**Bach. Cajo Guerrero, Sergio Iván
Bach. Vásquez Ramos, Dífero**

Asesor:

Ing. Símpalo López Walter Bernardo

**Línea de Investigación
Biotecnología**

Pimentel - Perú

2017

**OBTENCIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES POR HIDRÓLISIS
ENZIMÁTICA A PARTIR DE LOS RESIDUOS DE MANGO (*Mangífera
Indica* l.)**

PRESENTADO POR:

**Bach. Cajo Guerrero, Sergio Iván
Autor**

**Bach. Vásquez Ramos, Dífero
Autor**

**Ing. Walter Bernardo símpalo López
Asesor especialista**

APROBADO POR:

**Ing. Augusto Mechato Anastasio
Presidente**

**Ing. Walter Bernardo Símpalo López
Secretario**

**Ing. Williams Esteward Castillo Martinez
Vocal**

DEDICATORIA

A Dios, por ser el creador y divino maestro que rige la existencia y me permite ser parte del universo a través de la vida, por darme las fuerzas en estos 5 años para lograr el objetivo de ser profesional.

A mis padres, de manera especial por darme la vida y ser un ejemplo de superación para mí, instruyéndome siempre por el camino correcto de los buenos principios.

A mis hermanos, que siempre me han ofrecido el amor y la calidez de la familia a la cual yo amo.

Dedico de manera especial a mi hermana Jennifer pues ella es el principal cimiento para la construcción de mi vida profesional, sentó en mi las bases de responsabilidad y deseos de superación, en ella tengo el espejo en el cual me quiero reflejar pues sus virtudes y deseos infinitas y su gran corazón me llevan a admirarla cada día más

Los autores.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la vida y ayudarme a terminar este proyecto, gracias por darme la fuerza y el coraje para hacer este sueño realidad.

A mi papá Sergio, gracias por todo el apoyo que me has dado desde que era un niño hasta ahora y porque siempre ha trabajado para darnos lo mejor a mis hermanas, mi hermano y a mí, a través de estas líneas quiero decir lo mucho que te quiero, gracias por ser el mejor padre del mundo y por quitarte el pan de la boca con la intención de no faltarnos nada, además de ser un buen padre eres mi mejor amigo y consejero, te amo papá.

A mi madre Lisbania, gracias por tu apoyo incondicional, por el desvelo que has tenido por nosotros, por estar conmigo en cada etapa de mi vida y por ser una amiga y comprenderme en todo momento, como toda buena madre dando la vida por nosotros tus hijos.

Agradezco de manera especial y sincera al Dr. Carlos Sialer Guerrero y al Ing. Walter Símpalo López por su colaboración y valiosos aportes realizados durante el desarrollo de esta tesis.

Los autores.

ÍNDICE

DEDICATORIA	2
AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
INTRODUCCIÓN	11
CAPÍTULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	12
1.1 Situación problemática:	12
1.2 Formulación del problema:	14
1.3 Justificación e importancia:	14
1.4 Limitaciones de la investigación	15
1.5 Objetivos de la investigación	15
CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO	16
2.1 Antecedentes de estudios:	16
2.2 Estado del Arte:	21
2.3 Bases teórico – científicas.....	24
2.3.1. Mango.....	24
2.2.3.1. Residuos agroindustriales.....	25
2.2.3.2. Biomasa celulósica: propiedades y características	28
2.2.3.3. Compuestos lignocelulósicos	28
2.2.3.4. Enzima.....	31
2.2.3.5. Hidrólisis del material lignocelulósico	32
2.2.3.6. Factores que afectan a la hidrólisis enzimática	36
2.3 Definición de la terminología	37
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO	39
3.1 Tipo y diseño de la investigación:.....	39
3.1.1 Tipo de investigación:.....	39
3.1.2 Diseño de la investigación:.....	39
3.2 Población y muestra.....	39
3.2.1 Población	39

3.2.2	Muestra	39
3.2.3	Muestreo	39
3.2.4	Criterios de inclusión y exclusión.....	40
3.3	Hipótesis:.....	40
3.4	Variables.....	40
3.5	Operacionalización de las variables:	41
3.5.1	Variable Independiente:	41
3.5.2	Variable Dependiente: Rendimiento de azúcares fermentables	41
3.6	Métodos, técnicas de investigación	42
3.6.1	Métodos de investigación.....	42
3.6.2	Técnicas e Instrumentos de recolección de datos.....	44
3.6.3	Instrumentos de recolección de datos	45
3.6.4	Procedimiento para la recolección de datos.....	45
3.6.5	Plan de análisis estadístico de datos	47
3.6.6	Criterios éticos	48
3.6.7	Criterios de rigor científico	50
CAPÍTULO IV: ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.....		52
4.1.	ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.....	52
4.1.1.	Características fisicoquímicas de la materia prima:.....	52
4.1.2.	Hidrólisis enzima de cáscara de mango	53
4.1.3.	Evaluación estadística y comportamiento de la variable dependiente	55
4.2.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	63
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		66
5.1.	Conclusiones.....	66
Referencias Bibliográficas		67
ANEXO		73

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 3.1. Operacionalización de las variables Independientes.....	41
Cuadro 3.2. Operacionalización de las variables dependiente.....	41
Cuadro 3.3. Matriz de experimentos según el Diseño D-óptimo.	48
Cuadro 4.1. Características Fisicoquímicas de la Cáscara de mango deshidratada	52
Cuadro 4.2. Matriz de resultados para la variable dependiente Rendimiento según el diseño experimental.....	55
Cuadro 4.3. Análisis de varianza para la variable rendimiento de azúcares fermentables.....	56
Cuadro 4.4. Valores actuales y predichos de los tratamientos experimentales para la variable Rendimiento (mg de azúcares fermentables / g de material seco).....	58
Cuadro 4.5. Optimización de la variable rendimiento de azucares fermentables ...	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Cadena de celulosa (que muestra los enlaces glucosídicos del tipo β	29
Figura 2.2. Esquema estructural propuesto para lignina Picea Abies Veloso	30
Figura 2.3. Esquema del proceso de hidrolisis enzimática de desecho de mango	47
Figura 4.1. Análisis fisicoquímico de la cáscara de mango	52
Figura 4.2. Acondicionamiento de la cáscara de mango	53
Figura 4.3. Proceso de hidrolisis enzimática de cáscara de mango	54
Figura 4.4. Distribución normal de los residuales de la variable dependiente	57
Figura 4.5. Valores predichos versus observados para la variable dependiente	58
Figura 4.6 (a) y (b) Efecto del tipo de enzima y concentración de enzima en la variable dependiente	61
Figura 4.7. Efecto del pre-tratamiento y concentración de enzima	62

RESUMEN

Dentro de las alternativas propuestas para el aprovechamiento de materiales lignocelulósicos se incluye su transformación o desdoblamiento en azúcares fermentables (reductores), que luego permiten su aplicación para la producción de etanol. La presente investigación tiene como objetivo aprovechar los residuos de mango para obtener azúcares fermentables, se evaluó dos tipos de pre tratamiento para la deslignificación de la materia orgánica (tratamiento térmico y tratamiento químico con NaOH), dos tipos de enzima (Complejo de Celulasas y Complejo de enzimas) de la marca Novo Enzyme y la concentración de enzima de 400 a 900ppm. Se aplicó el diseño experimental de D-óptimo, con 14 tratamientos experimentales teniendo como variable respuesta el rendimiento en azúcares fermentables como resultado de la deslignificación. Obteniéndose como mejor pre-tratamiento la deslignificación química, con aplicación enzimática (Complejo Celulasa) a 400 ppm maximizando el rendimiento de azúcares fermentables.

Palabras claves: Hidrolisis enzimática, Pre-tratamiento térmico, Pre-tratamiento químico, azúcares fermentables.

ABSTRACT

Among the alternatives proposed for the use of lignocellulosic materials processing or splits in (reducing) fermentable sugars, which then allow their application for the production of ethanol is included. This research aims to harness waste handle to obtain fermentable sugars, two types of pre-treatment for delignification of organic matter (heat treatment and chemical treatment with NaOH), two types of enzyme (complex cellulases and Complex evaluated enzyme) brand Novo enzyme and enzyme concentration of 400 to 900ppm. experimental design D-optimal for applied, with experimental treatments having 14 as the response variable performance fermentales sugars as a result of delignification. Obtaining as best pre-treatment chemical delignification, with application enzyme (Cellulase Complex) to 400 ppm maximizing the yield of fermentable sugars

Keywords: Enzymatic hydrolysis, Pre-heat treatment, Pretreatment chemical, fermentable sugars

.

INTRODUCCIÓN

Los residuos lignocelulósicos generados en el procesamiento del mango como la cáscara, son considerados de poco valor y en algunos casos son desechados. Dentro de las alternativas propuestas para el aprovechamiento de materiales lignocelulósicos se incluye la transformación en azúcares, que luego permitan su aplicación como materia prima en la producción de etanol.

Dentro de los residuos producto de los procesos agroindustrial, se encuentran los residuo del procesamiento de mango parte empleada en la alimentación animal y en otros casos degradada al ambiente como abono orgánico, sin embargo ocasionando problemas de contaminación ambiental, ya que no cuenta con un manejo y control.

Como alternativa para dar solución a este problema y generar valor agregado a estos residuos agroindustriales del mango (*Mangífera indica L*), este puede ser utilizado como sustrato para la degradación biológica del material lignocelulósico lo convierte en un sustrato altamente productivo de azúcares fermentables, el que a su vez tienen numerosas aplicaciones en procesos industriales, como la obtención de alcohol carburante permitiendo el máximo aprovechamiento de la materia prima, y a largo plazo un incremento en su productividad a través del buen uso de sus recursos.

Sin embargo, su aprovechamiento se ve limitado por la fuerte asociación que existe en su estructura (lignina, celulosa, hemicelulosa), siendo necesaria la aplicación de pre tratamientos que tienen como objetivo desintegrar esta matriz compleja de tal manera que se mejore la hidrólisis, ya sea enzimática o química, para la producción de azúcares especialmente glucosa. Durante el pre tratamiento se desagregan y rompen las fibras, ocurre un proceso de despolimerización y se destruyen parcialmente los enlaces lignina-carbohidrato, como resultado, se obtiene un producto fibroso cuya celulosa es más accesible a la hidrólisis que se quiera aplicar.

CAPÍTULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Situación problemática:

En la actualidad el crecimiento y desarrollo de la industria ha conllevado a la generación de una gran variedad de residuos, poco aprovechados, que vienen generando contaminación, de igual forma el perfeccionamiento e implementación de nuevas técnicas o métodos para el aprovechamiento de éstos debe investigarse y aplicarse. En el proceso productivo de los alimentos, además del producto deseado, se generan subproductos, residuos y productos fuera de norma (Méndez, 1995), cada uno de los cuales pueden servir para consumo humano o animal y aplicación industrial, lo que traería beneficios económicos. Sin embargo, la mayoría de este tipo de industrias no tiene algún plan de manejo, que involucre su industrialización posterior, debido posiblemente al alto costo de su reutilización. (C.E. Castrellón Castaño; et al. 2007)

La agroindustria produce grandes cantidades de residuos que pueden ser aprovechados de diversas formas. Entre estos residuos se encuentran los provenientes de las frutas, los cuales pueden ser utilizados en alimentación animal y humana, abonos, obtención de biogás, en la extracción de aceites esenciales, pectinas, flavonoides, entre otros. Para la elección adecuada de alguna de estas tecnologías se deben realizar evaluaciones tecnológicas, comerciales y de riesgos. (Yepes, Sandra Milena, Montoya Naranjo, Lina Johana, & Orozco Sánchez, Fernando, 2008)

En nuestro país los residuos agroindustriales se arrojan a las basuras o en algunos casos, se utilizan como abono y concentrados para animales. (Quizhpi. L. 2008)

En la actualidad, los valles Piura (77.42 % de la producción nacional total pertenecen a este departamento) y Lambayeque se registra el mayor porcentaje de producción de mangos en el Perú, debido a las condiciones favorables que permiten su cultivo. (Minag, 2012). Las empresas procesadoras de pulpa de mango mantienen un rendimiento de pulpa promedio de un 36%, es evidente que el porcentaje no aprovechado se convierte en residuo que incluye cascara y pepas, residuos que no son aprovechados sino enterrados para uso como abonos.

Actualmente, la producción de azúcares fermentables enfrenta una crisis socio-energética ya que estos se derivan exclusivamente del sector alimenticio, una alternativa atractiva es la producción a partir de materiales lignocelulósicos, residuos que no compiten directamente con los alimentos destinados al consumo humano y animal y, además, permite aprovechar grandes cantidades de biomasa que generan los procesos agroindustriales. (Soccol et al. 2010)

Para el caso de mango congelado la cantidad de desechos es aproximadamente de 40%, es por ello que se plantea una forma como aprovechar estos residuos lignocelulósicos para obtener azúcares fermentables. (Moreno et al. 2009)

Estos residuos son materiales constituidos en su mayor parte por tejidos lignocelulósicos, los cuales se deben someter previamente a diferentes tipos de tratamientos hidrolíticos para poder aprovecharlos favorablemente en la producción de compuestos susceptibles de fermentación (glucosa, fructosa, manosa, xilosa, entre otros) elementos esenciales para la producción de diferentes compuestos de alto valor agregado. (L. F. Mejía Giraldo, et al. 2007)

Una alternativa para el tratamiento de este residuo es la hidrólisis, con el fin de obtener azúcares reductores capaces de poder fermentar y de esta manera obtener alcohol. La hidrólisis tradicionalmente se realiza utilizando agentes químicos, denominándola “hidrólisis ácida” e “hidrólisis alcalina”, la cual es un proceso complejo que tienen varias desventajas, entre ellas: El desdoblamiento de celulosa a glucosa que puede provocar la descomposición de esta última, y en forma simultánea la hemicelulosa se puede desdoblar a pentosas, situación que no es posible de controlar. Al mismo tiempo, se forman los productos de la degradación de la lignina que son inhibidores de la fermentación. (Guarnizo, et al. 2009)

Otra alternativa es el uso de las enzimas para lograr la hidrólisis lo cual es una técnica que aún se encuentra en estudio, debido que para aplicarla es necesaria la modificación genética de los microorganismos que puedan coexistir bajo las mismas condiciones que los microorganismos responsables de la sacarificación y las levaduras fermentativas,

responsables de la conversión de los azúcares reductores en etanol. (López-Miranda et al. 2009)

1.2 Formulación del problema:

¿Qué pre-tratamiento, tipo y concentración de enzima, permitirá obtener la mayor concentración de azúcares fermentables a partir de residuos de mango?

1.3 Justificación e importancia:

Los residuos (materiales lignocelulósicos) agroindustriales tales como cáscaras, semillas y huesos, representan alrededor del 50% de la agroindustria nacional. Estos residuos no tienen importancia comercial y se eliminan como desechos o se utilizan como alimentos para ganado.

La utilización de materiales lignocelulósicos viene siendo investigada intensamente, debido a que estos representan el mayor componente de los residuos agrícolas y desechos agroindustriales en el mundo, y constituyen una fuente abundante y segura de recursos renovables y energía. (P. Florián, C. León F. Villanueva & C. Bardales, 2015). Sin embargo, actualmente en Colombia estos residuos están siendo subutilizados en la mayoría de los casos causando serios problemas de contaminación ambiental por la deficiencia en disposición final, a pesar de que son potencialmente buenos para ser utilizados como materia prima en la producción de azúcares, alimento para animales, biomasa microbiana, producción de ácidos orgánicos y alcoholes, entre otros. (Mejía L., Martínez H., Betancourt J, Castrillon C, 2007)

La hidrólisis enzimática, por lo general, se aplica una vez que los residuos han sido previamente tratados, para dejar las cadenas poliméricas más expuestas. Implica la acción de diferentes grupos de enzimas: las celulasas (endoglucanasas, celobiohidrolasas también llamadas exoglucanasas y β -glucosidasas); las hemicelulasas (endo-1,4- β -xilanasas, β -xilosidasa, α -L-arabinofurosidasa y α -glucoronidasa); además de β -manosidasa y β -galactosidasa, así como las fenol-oxidasas (peroxidasas y lacasas que actúan sobre los alcoholes fenólicos de la lignina).

Uno de estos posible subproductos puede ser el etanol, para llegar a ello se

deben realizar estudios previos para el mejor aprovechamiento de los sustratos contenido en este residuos, como son la enzima más eficiente durante la hidrólisis enzimática, y el tiempo de acción en el sustrato de la misma para el desdoblamiento de las cadenas que finalmente resultan en azúcares reductores a partir de los cuales recién podríamos obtener el alcohol.

1.4 Limitaciones de la investigación

Se empleó un método espectrofotométrico para la cuantificación de los azúcares fermentables y la reacción enzima se realizó a nivel de laboratorio con volúmenes de reacción de 10ml.

1.5 Objetivos de la investigación

Objetivo general.

- Obtener azúcares fermentables a partir de los residuos de mango (*Mangífera indica* L.).

Objetivos específicos.

- Caracterizar fisicoquímica de la cáscara de mango (*Mangífera Indica*), de la variedad Kent.
- Determinar el mejor pre tratamiento previo a la hidrólisis enzimática.
- Determinar el tipo y concentración de enzima que permita la mayor producción de azúcares fermentables, a partir de la cáscara de mango (*Mangífera Indica*).

CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de estudios:

Autores: José Ángel Granados Arvizu, Carlos Regalado González, Blanca Estela García Almendárez, Aldo Amaro Reyes, Jorge E, Gracia Rodríguez, Alfredo Martínez Jiménez.

Año: 2015

Lugar: MEXICO

Título: Estudios sobre la optimización del pre tratamiento ácido del pericarpio de maíz para evaluar su viabilidad en la producción de azúcares fermentables

El objetivo de este trabajo consistió en optimizar el pre tratamiento con ácido sulfúrico diluido para maximizar la liberación de azúcares fermentables del PM (Pericarpio de maíz). Se empleó un diseño central compuesto y la metodología de superficie de respuesta para estudiar el efecto del ácido sulfúrico (1.5 - 5 % v/v), tiempo (15 -40 min) y PM (10 - 20 % p/v), sobre la liberación de azúcares reductores (AR) y glucosa (G). Las muestras se sometieron a tratamiento térmico (120 °C), se neutralizaron con NaOH, se filtraron y a la fracción líquida se le determinaron azúcares reductores por DNS y glucosa (kit D-glucosa, Boehringer Mannheim). El punto máximo alcanza los niveles requeridos para una fermentación eficiente, 50-100 g-L, Los azúcares reductores obtenidos son mayores a los reportados para bagazo de agave: 25.8 g-L, usando 2% de ácido sulfúrico a 147 °C por 15 min. Se logró optimizar el pre tratamiento con ácido sulfúrico del PM como primera etapa del proceso de producción de bioetanol. Los niveles máximos de AR se encontraron usando ácido sulfúrico 4.9 (% v/v), sólidos de PM 20 (%p/v) y 34.92 min; produciéndose 90.57 g-L, de azúcares reductores y 20.22 g-L, de glucosa. Experimentos posteriores se enfocaran en la hidrólisis enzimática de la fracción sólida para conseguir una mayor liberación de azúcares.

Autores: S.M. González - Rentería, N.O. Soto-Cruz, O.M. Rutiaga-Quiñones, H. Medrano-Roldan, J.G. Rutiaga-Quiñones² & J. López-Miranda

Año: 2011

Lugar: México

Título: Optimización del proceso de hidrólisis enzimática de una mezcla de pajas de frijol de cuatro variedades (pinto villa, pinto saltillo, pinto mestizo y flor de mayo)

Se mezclaron, en igual proporción, pajas de frijol de las variedades Pinto villa, Pinto saltillo, Pinto mestizo y Flor de mayo. Se determinó la composición química de la mezcla y se sometió a pre tratamiento con hidróxido de sodio al 0.1, 0.5 y 1.0%, a 121°C durante 30, 60 y 90 min. Las pajas pre tratadas se analizaron y sometieron a hidrólisis enzimática durante 10 días a 45°C y pH 4.5, utilizando una carga enzimática de 25 UPF/g de celulosa, de un concentrado enzimático comercial (Celluclast 1.5 L) proporcionado por Novozyme. Los azúcares producidos se determinaron por el método de Miller y los valores obtenidos se utilizaron para calcular el rendimiento de hidrólisis. Las condiciones óptimas de pre tratamiento e Hidrólisis se obtuvieron utilizando el método de superficie de respuesta. Los resultados muestran que la mezcla de pajas de frijol está compuesta por 31% de celulosa, 23% de hemicelulosa y 9% de lignina, que el pre tratamiento afecta significativamente al rendimiento de hidrólisis y que la sacarificación máxima ($98.95 \pm 8.38\%$) se obtuvo para un pre tratamiento con 0.5% de NaOH durante 90 minutos a 121°C, con un tiempo de hidrólisis de 240 h a pH 4.5 y 45°C, utilizando una carga enzimática de 25 UPF/g de celulosa.

Autores: Javier López-Miranda, Nicolás o. soto-cruz, Olga m. Rutiaga-quiñones, Hiram Medrano-Roldán & katuska Arévalo-niño

Año: 2009

Lugar: México

Título: Optimización del proceso de obtención enzimática de azúcares fermentables a partir de aserrín de pino

Con el propósito de aprovechar un recurso que en la actualidad es un desecho contaminante generado durante el aserre de la madera en Durango, México, se probaron los métodos de pre tratamiento alcalino, ácido y explosión con vapor a temperatura de autoclave, para realizar la hidrólisis enzimática de aserrín de pino obtenido de tres aserraderos de la ciudad de Durango y recuperar los azúcares contenidos en él. Se encontró que el pre tratamiento con NaOH a 120 °C proporciona mejores resultados que los tratamientos con ácido sulfúrico diluido y por explosión con vapor a 121 °C. Se optimizó el pre tratamiento alcalino por el método de superficie de respuesta. Los resultados muestran que la concentración óptima de azúcares reductores, con un valor de 48 %, se obtuvo después de un pre tratamiento con 8 % de NaOH durante 85 minutos a 120 °C, a un pH de hidrólisis de 4.5, durante 240 h, con una carga enzimática de 25 UPF/g de carbohidratos totales. Por comparación con los resultados reportados en la literatura, se encuentra que el procedimiento obtenido es susceptible de ser utilizado para el aprovechamiento de este recurso.

Autores: J. Saucedo-Luna, A. J. Castro-Montoya, M. D. C. Chávez-Parga, J. Campos-García

Año: 2009

Lugar: México

Título: Sacarificación del bagazo de agave tequilana weber

El objetivo del trabajo es evaluar la composición del residuo y su factibilidad de conversión a azúcares fermentables, para su posterior uso en la producción de bioetanol. El residuo de Agave Tequilana Weber fue recolectado, secado, molido y se homogeneizó. Se determinó la composición principal (2, 3 y 4). El material se sacarificó con métodos diferentes obteniendo las condiciones óptimas, la fracción líquida de todas las muestras se analizaron para determinar los azúcares fermentables en un cromatógrafo de líquidos (HPLC, Varían) con una columna Meta Carb 87C y un detector de IR (índice de refracción). Los componentes del bagazo de Agave Tequilana Weber son 42% de celulosa, 20% de hemicelulosa y 15% de lignina. La sacarificación del bagazo de agave se realizó con, a) hidrólisis ácida, b) hidrólisis enzimática y c) combinación de las anteriores. La hidrólisis ácida se realizó con ácido sulfúrico diluido en dos etapas. Se adoptó un diseño de experimentos factorial con múltiples niveles y el método de superficie de respuesta para la optimización del proceso de hidrólisis. Se obtienen con la hidrólisis ácida (dos pasos) 314 g/kg de bagazo, para un rendimiento del 45%. La hidrólisis enzimática se realizó en dos pasos utilizando celulasas comerciales obteniendo 344 g/kg de bagazo y un rendimiento del 50%. Finalmente la combinación del primer paso de hidrólisis ácida seguida de dos pasos de hidrólisis enzimática da como resultado 609 g/kg de bagazo y un rendimiento de 88.51% de azúcares fermentables con respecto al teórico. De acuerdo a los resultados obtenidos se seleccionó este último arreglo para la sacarificación del bagazo. De lo anterior se concluye que el bagazo de Agave Tequilana Weber es una excelente fuente potencial para la obtención de azúcares fermentables.

Autores: L. F. Mejía Giraldo, H. A. Martínez Correa, J. E. Betancourt Gutiérrez y C. E. Castrillón Castaño

Año: 2007

Lugar: Colombia

Título: **Aprovechamiento del residuo agroindustrial del mango común (*Mangífera indica L.*) en la obtención de azúcares fermentables**

En este trabajo se aplicaron tratamientos de hidrólisis al residuo del mango común con el fin de hacer la conversión de sus polisacáridos a unidades de azúcares fermentables. Se aplicó hidrólisis ácida a tres concentraciones diferentes de ácido sulfúrico diluido. También, se aplicó hidrólisis enzimática con dos tipos de enzimas comerciales a diferentes concentraciones en las condiciones de trabajo estándar. De igual manera se aplicó hidrólisis térmica a dos temperaturas diferentes. A cada tratamiento aplicado se le efectuaron pruebas de concentración de azúcares totales, concentración de azúcares reductores, porcentaje de celulosa y hemicelulosa residual, datos con los cuáles se determinaron los mejores tratamientos y se procedió a efectuar combinaciones de los mejores tratamientos de hidrólisis. El tratamiento más significativo de las pruebas individuales fue el de hidrólisis ácida a 0,50% v/v de ácido sulfúrico a 80°C por una hora. En los tratamientos combinados el resultado más significativo fue el tratamiento en el que se combinaron la hidrólisis enzimática (como pre tratamiento) más una hidrólisis térmica e hidrólisis ácida. Por razones de Seguridad en el uso de reactivos, así como eliminación de efectos colaterales Adversos para la fermentación alcohólica posterior, se seleccionó el procedimiento que involucra la hidrólisis térmica como pre tratamiento y la hidrólisis enzimática como tratamiento principal, como el tratamiento de mejor aplicación en la producción de metabolitos fermentables a partir de residuos de mango común con finalidad producción de alcohol posteriormente.

2.2 Estado del Arte:

La creciente demanda de energía en el mundo ha generado el consumo acelerado de los combustibles petroquímicos, agotamiento de las reservas petroleras y problemas de contaminación asociados a su combustión. En este sentido, surgen formas de energía alterna: eólica, solar, hidrógeno y biogás; los líquidos como el biodiesel y el bioetanol (García, 2008). El etanol es producido por síntesis química a partir del etileno y por vía biológica a partir de la fermentación de los azúcares; su principal aplicación es en la industria de las bebidas alcohólicas y en últimas décadas se plantearon tecnologías para usarlo como aditivo o sustituto de las gasolinas (Sánchez y Cardona, 2008). Se produce por fermentación de los azúcares obtenidos de caña de azúcar, maíz, remolacha y biomasa lignocelulósica. El término biomasa lignocelulósica se refiere a toda la materia orgánica de origen vegetal o animal, que incluye materiales procedentes de su transformación natural o artificial (Dashtban & col. 2009).

La utilización de materiales lignocelulósicos viene siendo investigada intensamente, debido a que estos representan el mayor componente de los residuos agrícolas y desechos agroindustriales en el mundo, y constituyen una fuente abundante y segura de recursos renovables y energía. (L. F. Mejía et al. 2007). Para obtener combustibles como el etanol a partir de la biomasa, se requiere una serie de procesos, siendo el primero de ellos la sacarificación o conversión de sus componentes como la celulosa y hemicelulosa en azúcares fermentables. (Narciso V. & Daniela G., 2007)

Narciso V. & Daniela G. (2007), estudiaron el proceso de hidrólisis enzimática, con lo cual se busca conocer las mejores condiciones de operación y verificar su viabilidad a nivel industrial. Para ello, realizaron una serie de pruebas de laboratorio para determinar los valores óptimos de las variables de operación (concentración de enzima, concentración de sustrato, tamaño de partícula de sustrato y tiempo de reacción), verificar las ventajas de la realización de pre tratamientos, establecer las diferencias del proceso de hidrólisis enzimática para diferentes sustratos, comparar al proceso de hidrólisis enzimática con el de hidrólisis química y establecer las características más importantes del reactor que llevará a cabo al proceso a

escala industrial. Los resultados obtenidos demuestran que la enzima celulasa es capaz de hidrolizar a la celulosa contenida en el bagazo de caña y que el proceso de hidrólisis enzimática se ajusta a los fundamentos teóricos presentados por Michaelis y Menten. De acuerdo a los resultados obtenidos, se concluyó que la concentración óptima de enzima para la realización del proceso de hidrólisis es de 12 g/l, concentración óptima de bagazo de caña es de 25 g por litro de solución y tiempo óptimo de reacción para lograr los máximos rendimientos con un tamaño de reactor pequeño es de 2 horas. A su vez, se recomienda realizar estudios más profundos en el campo de la producción de enzimas para así optimizar dicho proceso y reducir costos.

Considerando que la paja de frijol es un material lignocelulósico con potencial para ser usado como materia prima para la producción de etanol combustible; S.M. Gonzalez-Renteria et al (2011) investigaron las condiciones óptimas de pre tratamiento que permitan obtener el máximo rendimiento de azúcares fermentables por hidrólisis enzimática de una mezcla de pajas de frijol de las variedades Flor de mayo, Pinto Villa, Pinto mestizo y Pinto Saltillo. El pre tratamiento con NaOH reduce los contenidos de hemicelulosa y deja prácticamente intactos los contenidos de celulosa y lignina. El rendimiento máximo de azúcares reductores obtenido fue de $92\pm 5\%$ para la hidrólisis enzimática de la paja de frijol pre tratada con 0.66% de NaOH a 120°C , durante las 168h de hidrólisis. Es posible detener el proceso de hidrolisis a las 48 horas, a expensas de una pérdida de 15% de rendimiento. El rendimiento obtenido para la hidrólisis de la mezcla de pajas de frijol sin pre tratar ($76,37\pm 13.775$), la sitúa como una materia prima sumamente atractiva para la producción de etanol combustible, toda vez que el costo del pre tratamiento es uno de los principales factores de costo de este proceso. Los rendimientos expresados como porcentaje de azúcares reductores, en las condiciones de pre tratamiento encontradas, permiten afirmar que la paja de frijol puede ser utilizada como sustrato para la producción de azúcares fermentables y por tanto de etanol combustible. Los modelos obtenidos para el pre tratamiento y la cinética de hidrólisis

pueden ser utilizados para explicar el comportamiento de la misma en el espacio experimental investigado.

Díaz A. en el 2005 investigo el empleo de residuos procedentes de la venta de verduras y hortalizas, en concreto pimientos, tomates y patatas, a los que aplico pre tratamientos de hidrólisis ácida, térmica y enzimática con el fin de seleccionar el más adecuado. Su objetivo fue extraer la máxima cantidad posible de azúcares reductores que puedan ser fermentados en la etapa siguiente a la hidrólisis. La hidrólisis térmica a 110 °C y la hidrólisis termo-ácida con H₂SO₄ al 5% demostraron, en ningún caso, ser eficaces para aumentar la extracción de azúcares reductores, produciéndose por el contrario una degradación de los azúcares a nivel general. La hidrólisis térmica, enzimática y la combinación de ambas permitieron aumentar el contenido de azúcares totales y reductores extraído en todos los casos. Mientras que la hidrólisis térmico-enzimática resulto ser el pre tratamiento más eficaz para la obtención de caldos con mayor contenido de azúcares reductores frente al material sin tratamiento, incrementándose en 54% para el pimiento y en un 59% para el tomate. El mayor incremento obtenido se observa en la patata aumentando de 0.02 g de azúcares reductores iniciales a 19.45 g de azúcares reductores extraídos por cada 100 g de residuo tras la hidrólisis.

2.3 Bases teórico – científicas

2.3.1. Mango

El mango (*Mangífera indica L*) es originario de Asia, específicamente de la región Indo - Birmanica, cultivándose en la India desde hace más de cuatro siglos. Este frutal fue introducido a nuestro país a través de los españoles, en el año de 1779, quienes trajeron las primeras variedades de las Islas Filipinas. A pesar de no ser un cultivo nativo del continente americano ha llegado a ocupar un lugar primordial. (Galán, 1999).

El mango es el miembro más importante de la familia de las Anacardiáceas o familia del marañón, género *Mangífera*, el cual comprende unas 50 especies, nativas del sureste de Asia e islas circundantes, salvo la *Mangífera* africana que se encuentra en África. Está reconocido en la actualidad como uno de los tres o cuatro frutos tropicales más finos. (Galán, 1999).

Su forma es variable, pero generalmente es ovoide-oblonga o arriñonada, notoriamente aplanada, redondeada, u obtusa en ambos extremos, con un hueso central grande, aplanado y con una cubierta leñosa, de 4-25 centímetros de largo y 1,5-10 de grosor, su peso varía desde 150 gramos hasta los 2 kilogramos. El color puede ser entre verde, amarillo y diferentes tonalidades de rosa, rojo y violeta, mate o con brillo. Su pulpa es de color amarillo intenso, casi anaranjado. De exótico, succulento, muy dulce y aromático.

Propiedades nutricionales y funcionales del mango

Desde el punto de vista del valor nutritivo, el mango es una fuente importante de fibra y vitaminas. La pulpa del mango presenta una concentración significativa de compuestos bioactivos tales vitamina A (esencial para el mantenimiento de los tejidos epiteliales piel y mucosas), así como de compuestos con una gran actividad antioxidante entre ellos la vitamina C, vitamina E, polifenoles, carotenos, entre otros, además de presentar una importante concentración de minerales como potasio y magnesio, los cuales intervienen en la transmisión nerviosa y muscular, también aporta pequeñas cantidades de hierro, fósforo y

calcio. Así mismo, la pulpa del mango contiene fibra soluble (pectinas), ácidos orgánicos (cítrico y málico) y taninos. En su composición destaca igualmente la presencia de una sustancia denominada manguiferina, que en animales de experimentación parece ejercer una acción antioxidante, inmunomoduladora, antiviral y antitumoral (Guha, S. et al, 1996; Sánchez G, et al., 2000).

Tabla 2.1.
Contenido nutricional de la fruta del mango.

Contenido por cada 100 g de mango	
Agua	83 g
Proteínas	0.5
Grasas	0
Carbohidratos	15 g
Fibra	0.8 g
Calcio	10 mg
Hierro	0.5 mg
Vitamina "A"	600 i.u
Tiamina	0.03 mg
Riboflavina	0.04 mg
Vitamina c	3 mg
Desechos ()	28.38 %

Fuente: Bangerth y Carle, 2002

2.2.3.1. Residuos agroindustriales

Llamamos residuo a cualquier tipo de material que esté generado por la actividad humana y que está destinado a ser desechado. Hoy en día la sociedad tiende en gran medida hacia los productos descartables, generándose de esta manera una necesidad de producir más y más elementos de consumo. La industria genera una gran cantidad de residuos muchos de los cuales son recuperables. El problema está en que las técnicas para aprovechar los residuos y hacerlos útiles son caras y en muchas ocasiones no compensa económicamente hacerlo. De todas formas, está aumentando la

proporción de residuos que se valorizan para usos posteriores. (Quizhpi. L. 2008).

En el sector de la industria alimentaria y agroindustria se produce un volumen elevado de estos residuos, que proceden del procesado de la materia prima y del descarte. La cantidad generada puede suponer un 20-40% de toda la materia prima introducida en la industria.

Algunos datos que proporcionan una idea del volumen de residuos que generan diferentes tipos de industrias son los siguientes: la industria de la cerveza solamente utiliza el 8% de los componentes del grano, la industria del aceite de palma utiliza el 9%, la industria del café utiliza el 9.5%, y la industria del papel utiliza menos del 30%, el resto es un residuo (Saval. 2012) En concreto, el sector de los transformados vegetales (conserva, congelados, zumos, concentrados y néctares de frutas y hortalizas) genera cantidades importantes de residuos y subproductos orgánicos.

Tabla 2.2.

Porcentajes de residuos generados en función de la materia prima procesada (Adaptada de Ros et al., 2012)

Materia prima	Tipo de restos	% de materia prima convertida en residuo
Tomate	Piel, pepita, podridos	15
Esparrago	Piel, trozos	51
Alcachofa	Brácteas, tallos	60_65
Puerro	Hojas, raíces	47
Acelga	Pencas, hojas	48
Espinacas	Hojas secas	13
Melocotón	Piel, huesos	22-28
Judía verde	Puntas	28
Pera	Piel, peciolos, corazón	42-45
Pimiento piquillo	Corazones, piel	53
Pimiento morrón	Corazones, piel	50-60

Fuente: USDA, 2006

El porcentaje de restos orgánicos generados en la elaboración de transformados vegetales es muy variable, ya que está determinado principalmente por la materia prima a procesar (tamaño, forma, partes

aprovechables...) y su proceso de transformación, lo que implica que los niveles de residuos sean distintos en cada caso (Tabla 2.2).

Al igual que otros sectores de la economía, la agroindustria ha generado grandes cantidades de residuos, causando muchos daños ambientales como la contaminación de los suelos, el agua y la atmósfera. Estos residuos se generan especialmente para las industrias de transformación de fruta, carne, pasta y papel, entre otros (Dantas & Aquino. 2010). Para suavizar los efectos de los problemas causados por la eliminación incorrecta, una serie de medidas para proteger y restaurar el medio ambiente se expanden en diversos sectores de la producción y la sociedad han reflejado con mayor profundidad el tema de la contaminación producida por los residuos generados (Silva, 2006).

Entre estas medidas, se están realizando varios estudios para disfrutar estos residuos se consideran subproductos o productos secundarios y su uso puede ser una alternativa viable y prometedor, ya que se generan en grandes cantidades y con frecuencia sin valor comercial (Santos, 2010). Los residuos orgánicos tales como el salvado de cacao, bagazo, por ejemplo, son ricos en compuestos lignocelulósicos que son compuestos orgánicos más abundantes en la tierra, disponibles en las paredes celulares de las plantas.

La formación de las paredes celulares se produce durante el proceso de la división celular, y que son: la pared primaria, que se compone de celulosa, hemicelulosa y otros polisacáridos y la pared secundaria, que básicamente consiste en celulosa y otros polisacáridos, y otras sustancias tales como lignina se depositan en la pared. La lignina se une fuertemente a la fibra de celulosa y la hemicelulosa, y que la formación del complejo lignocelulósico es resistente a la conversión por agentes químicos y microbianos (Zúñiga 2010). El porcentaje de la composición puede variar según la especie, pero la mayor parte es la celulosa, la lignina y la hemicelulosa seguido de (Santos et al. 2011).

2.2.3.2. Biomasa celulósica: propiedades y características

La biomasa, en general se refiere a cualquier materia orgánica procedente de las plantas, los animales o los procesos de transformaciones naturales o sintéticas. Entre los tipos existentes de la biomasa, biomasa lignocelulósica residual ha recibido una gran atención en los últimos años debido a la disponibilidad a gran escala y bajo costo en la obtención. Además, es una fuente abundante de energía renovable que puede utilizarse para la producción de forma respetuosa del medio ambiente de combustible (Betancur et al. 2010). Las ventajas que presentan frente a las materias primas tradicionales para la producción de combustibles como el petróleo y el azúcar de caña, son numerosos. En primer lugar, los materiales lignocelulósicos son los más abundantes de la biomasa en la Tierra, no se concentra en unas pocas regiones del mundo, como el petróleo. En segundo lugar, el etanol es menos contaminante que los combustibles derivados del petróleo. Por último, dado que el material lignocelulósico es residuos procedentes de actividades industriales y agrícolas, el conflicto entre el uso del suelo para la producción de alimentos y el cultivo de materias primas para la industria de la energía se reduce al mínimo (Hahn-Hagerdal et al. 2006).

2.2.3.3. Compuestos lignocelulósicos

a. Celulosa

La celulosa es un polímero lineal formado por unidad estructural β -D-glucosa, unidas por enlaces glucosídicos β -del tipo (1 \rightarrow 4) como se muestra en la Figura 1 (Santino et al., 2008). Dos unidades adyacentes forman un enlace glucosídico la eliminación de una molécula de agua e implica los grupos hidroxilo de los carbonos 1 y 4, esta estructura disacárido recibe el nombre de celobiosa, que es la unidad conformacional mínimo de celulosa, de los que la glucosa es la unidad fundamental de la cadena (Aguilar, 2010).

Típicamente, el tamaño de la molécula de celulosa se expresa en función del número de unidades de glucosa presentes en la fibra

(Santos, 2010). En la síntesis de las moléculas de celulosa, se someten a un reordenamiento y forman un gran número de enlaces puente de hidrógeno para competir con el agua para la hidratación de hidroxilos, donde forma un complejo cristalino llamado microfibrillas muy comprimido, deshidratada que resiste grandes acciones exteriores, tales como la hidrólisis ácida y también la enzima (Santos, 2011). Sin embargo, la cristalinidad no sólo es capaz de prevenir la hidrólisis enzimática si una alta concentración de enzima se utiliza (Santos, 2010).

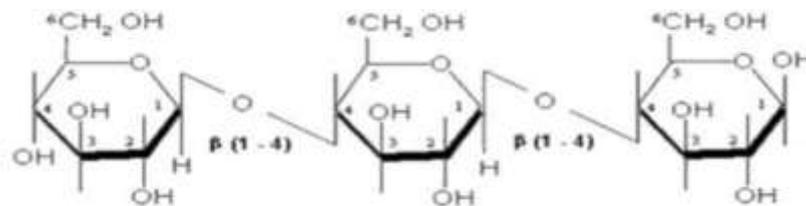


Figura 2.1.

Cadena de celulosa (que muestra los enlaces glucosídicos del tipo β - (1 \rightarrow 4)). BIOMASA, 2012.

Fuente: Santino et al. (2008)

b. Hemicelulosa

La hemicelulosa no es químicamente homogénea, a diferencia de la celulosa, es un heteropolisacárido, que tiene cadenas laterales cortos de los diferentes tipos de azúcares (Santino et al. 2008). Entre las sustancias que se encuentran en la mayoría de las hemicelulosas son pentosas (xilosa, ramnosa y arabinosa), hexosas (glucosa, manosa y galactosa) y los ácidos urónicos (ácido 4-O-metil-glucurónico y galacturónico ácido). Hemicelulosas polímeros pécticas están interconectados por fibrillas de interconexión (Cutter, 1986). Según Santos (2008), el término hemicelulosa se refiere a un compuesto químico no se define, pero una clase de componentes poliméricos presentes en

los vegetales fibrosos, que poseen, cada uno propiedades peculiares que lo componen.

c. *La lignina*

La lignina es una macromolécula ramificada (Figura 2.2) en amorfo, con estructura heterogénea formando una red de anillos aromáticos unidos principalmente enlaces de éter de alquilo arilo. Los actos de lignina como un soporte de defensa que actúa como una barrera natural contra el tejido de las plantas y los microorganismos que pueden formar complejos con enzimas de alta estabilidad (Zúñiga 2010). También se sabe que la lignina es importante en el transporte de agua, nutrientes y metabolitos (Saliba et al. 2001).

La estructura tridimensional de la lignina confiere rigidez y resistencia de compresión en la pared celular, que también actúa como un agente de unión permanente entre las células (Santos, 2008).

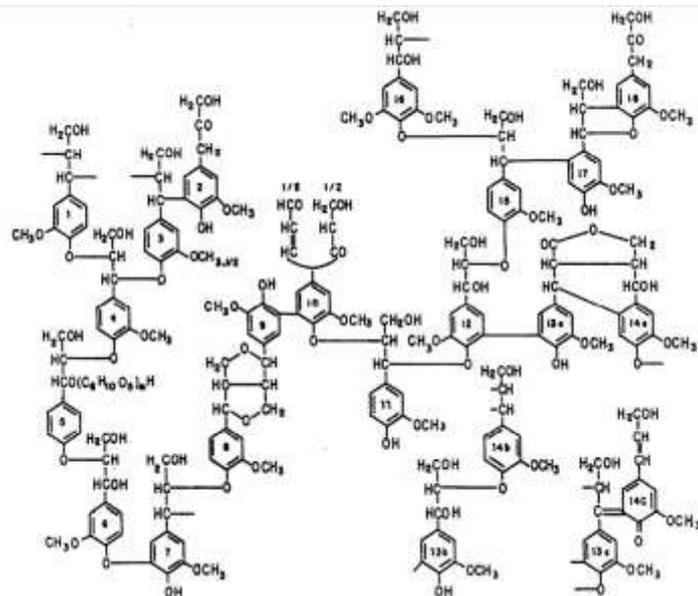


Figura 2.2.

Esquema estructural propuesto para lignina Picea Abies Veloso (1993)

Fuente: <http://academic.scranton.edu/faculty/CANNM1/inorganic/inorganicmodulespan.html>

d. Otros Componentes

Componentes no estructurales como extractivos, los no extractivos y proteínas también son importantes al considerar la constitución del material lignocelulósico. Están presentes en proporciones menores, que consta de grasas, aceites esenciales, grasas, gomas, almidones, alcaloides, resinas y otros componentes citoplasmáticos (Fengel & Wegener. 1989).

Los extractos pueden ser extraídos con disolventes orgánicos o acuosos y determinar algunas características de la planta, como el color, el olor, la resistencia natural a la putrefacción, el sabor y propiedades abrasivas (Fengel & Wegener. 1989).

El no extractivo consisten en compuestos inorgánicos tales como sílice, carbonatos y oxalatos. Estos componentes generan problemas con la bioconversión debido a la presencia de inhibidores en el pre-tratamiento (Mc Millán, 1996).

2.2.3.4. Enzima

La historia de las enzimas comienzan a principios del siglo XIX, cuando fueron descubiertos y desde entonces muchos estudios sobre ellos, se han realizado (Santino, 2008).

Ellos catalizan diferentes estructuras y realizar diversas tareas como la biosíntesis de muchos metabolitos. Actualmente enzimas para uso industrial son uno de los principales intereses del mercado de la biotecnología. Las enzimas Celulásas son un complejo de enzima responsable de la degradación celulosa y se divide en: endoglucanasas y exoglucanasas. Las endoglucanasas son responsables de iniciar la hidrólisis y rápidamente solubilizar el polímero celulósico, rompiendo primero los enlaces internos oligosacáridos producción de bajo peso molecular (Santos et al. 2011), y así liberar nuevos terminales, un reductor y un no reductor. Los exoglucanasas son enzimas que actúan sobre la región exterior de la celulosa, que se dividen en celobiohidrolasas, liberando celobiosa de las extremidades de pulpa y de los glucanohidrolasas,

hidrolizar fibra de celulosa liberación de la glucosa directamente de polímero (Santos et al. 2011). La xilanasas es una enzima que hidroliza presente xilano en hemicelulosa (Alexandrino et al. 2007), ya su vez, ha atraído la atención de la industria de la alimentación y la industria de los combustibles líquidos, entre otros. La lacasa, peroxidasa de lignina peroxidasa y manganeso, que son enzimas lignolíticas responsables de la degradación de la lignina, también se destacan en diversos estudios.

2.2.3.5. Hidrólisis del material lignocelulósico

Los polímeros presentes en los materiales lignocelulósicos necesitan ser convertidos en azúcares simples antes de la fermentación, a través de un proceso llamado hidrólisis. Varios métodos han sido descritos para la hidrólisis de estos materiales. El más comúnmente citados son la hidrólisis ácida y enzimática. Muchos productos pueden ser resultado de la hidrólisis del material lignocelulósico. Cuando se hidroliza la hemicelulosa, el producto generalmente se libera en el medio es xilosa, manosa, ácido acético, galactosa y glucosa. La principal aplicación de xilosa es para la bioconversión de xilitol se usa como un edulcorante. Sin embargo, la degradación de xilano produce ocho productos principales: agua, metanol, ácido fórmico, acético y propiónico, hidroxil-1-propanona, 1-hidroxil-2-butanona y furfural. En condiciones de alta temperatura y presión, la xilosa es preferiblemente degradado a furfural, mientras que la celulosa se hidroliza en glucosa (Balat, 2011).

a. La hidrólisis ácida

El material lignocelulósicos puede ser hidrolizado químicamente por adición de ácido. El ácido sulfúrico se utiliza con mayor frecuencia, según el precio y la toxicidad. La hidrólisis ácida se puede dividir en dos categorías: la hidrólisis con ácido concentrado y con ácido diluido. El proceso ácido concentrado que funciona a bajas temperaturas (40°C) para dar altos rendimientos de azúcar.

Sin embargo, el consumo de ácido es alta, mientras que se consume poca energía para la recuperación y reciclado del ácido. Además, el equipo puede corroer y se requiere un tiempo de reacción de 2 a 6 horas (Tahezadeh & Karimi 2007). El proceso de ácido diluido se lleva a cabo bajo alta temperatura y presión, con un tiempo de reacción en el intervalo de segundos o minutos, lo que facilita proceso continuo. El proceso consiste en una solución de ácido diluida de aproximadamente 1% de H₂SO₄ en un reactor de flujo continuo a una temperatura alta (aproximadamente 215 °C) (Balat, 2011).

La hemicelulosa es generalmente más susceptible a la hidrólisis ácida que la celulosa y puede obtener rendimientos superiores al 85% en condiciones relativamente suaves. Condiciones más estrictas logran altos rendimientos de glucosa a través de la celulosa, sin embargo, conducen a la degradación de los azúcares de hemicelulosa son hidrolizados por primera, lo que resulta en bajos rendimientos y productos no deseados, también son inhibidores potentes de la fermentación. Para reducir la degradación monosacárido a alta temperatura, la hidrólisis con ácido diluido se suele realizar en dos etapas: la primera con la hemicelulosa disuelta en condiciones relativamente suaves, y la segunda con los residuos sólidos hidrolizada bajo las más duras condiciones necesarias para descomponer la celulosa (Tahezadeh & Karimi. 2007).

La hidrólisis implica el tratamiento de lignocelulosa a alta temperatura en condiciones ácidas conduce a la formación y liberación de muchos compuestos. Cuando se degrada la hemicelulosa, se forman xilosa, manosa, ácido acético, galactosa y glucosa. La celulosa es hidrolizada a glucosa. La temperatura y presión alta, xilosa es más degradada a furfural y 5-hidroximetilfurfural (HMF) está formado a partir de la degradación de la manosa, galactosa y glucosa. Aunque puede haber la formación de ácido fórmico a partir de furfural y HMF a ácido

levulínico y degradación de HMF. Se generan a partir de lignina y compuestos fenólicos también se pueden formar durante la degradación de los hidratos de carbono (Palmqvist & Hahn-Hagerdal. 2000).

b. La hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática de la lignocelulosa se lleva a cabo por las enzimas Celulásas, que degradan la celulosa y por enzimas que atacan la hemicelulosa tales como glucoronidasa, acetilesterasa, xilanasa, β -xilosidasa y glucomanase galactomanase. Los productos de hidrólisis son generalmente azúcares reductores, incluyendo glucosa y xilosa (Sun & Cheng. 2002).

La ruta enzimática ha recibido gran atención entre las diferentes alternativas tecnológicas para la hidrólisis del material lignocelulósico para la producción de etanol. La principal ventaja relacionada con el uso de enzimas es la condición de la operación suave, lo que resulta en una formación reducida de productos de degradación, lo que elimina las etapas posteriores para la eliminación de, ácido acético y furfural ácido levulínico (Soccol et al. 2010).

Además, el uso de enzimas evita etapas de neutralización posteriores que además de utilizar productos químicos, consume una gran cantidad de agua, conduce a la generación de un efluente tóxico que debe ser tratada antes de la liberación al medio ambiente.

A pesar de las numerosas ventajas que ofrece la hidrólisis enzimática de residuos agroindustriales, el costo de las enzimas ha obstaculizado el despliegue y la difusión de esta tecnología. (Cheng & Qiu. 2010) afirman que las celulasas son responsables de 30% a 50% del coste total del proceso. Varias investigaciones se han desarrollado con el fin de reducir el impacto del precio de las enzimas en la cantidad de etanol producido con resultados alentadores, pero todavía no totalmente satisfactoria. Para el etanol

de segunda generación a ser económicamente viable, el costo total de las enzimas debe estar por debajo de \$ 0.16 por galón de etanol (Politzer & Bon. 2006).

La hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos está limitada por varios factores, tales como la cristalinidad de celulosa, grado de polimerización, la humedad, la superficie y lignina (Hendriks & Zeeman. 2009).

En el caso de la hidrólisis enzimática de la celulosa, la concentración de sustrato es un factor importante que afecta el rendimiento y la velocidad inicial de la hidrólisis. La alta concentración puede causar la inhibición de sustrato, lo que reduciría sustancialmente la velocidad de hidrólisis. La lignina interfiere con la hidrólisis para bloquear el acceso de las celulasas sobre la celulosa y se unen de forma irreversible las enzimas hidrolíticas. En vista de esto la eliminación de la lignina puede aumentar significativamente la velocidad de hidrólisis (Sun & Cheng. 2002).

Varios estudios incluyen el uso de la hidrólisis enzimática, lo que lleva a un aumento considerable en los últimos años. Chen et al. Hidrólisis enzimática y etanol (2007) realizaron utilizando la mazorca de maíz. Gottschalk, Oliveira & Bon (2010) probaron la acción sinérgica de celulasa, xilanasas, β -glucosidasa y ácido ferúlico esterasa en la hidrólisis del bagazo de la caña de azúcar. Aguilar (2010) estudió la hidrólisis enzimática de lignocelulósica bagazo de caña de residuos, pericarpio de maíz y paja de trigo usando celulasa producida por el hongo *Aspergillus Níger*. Además de estos, se ha informado de otras formas de hidrólisis de la celulosa, tales como en agua supercrítica (Saka; Ueno, 1999), ultrasonido (Sulaiman et al. 2010), así como la hidrólisis enzimática de la carboximetilcelulosa basados la frecuencia de transmisión de un sensor de ondas acústicas (He et al. 2000).

2.2.3.6. Factores que afectan a la hidrólisis enzimática

El pretratamiento es un paso necesario para cambiar algunas de las características estructurales de la lignocelulosa, el aumento de la accesibilidad de glucano y xilano para el ataque enzimático. Como se ha mencionado, estas modificaciones estructurales dependen en gran medida del tipo de tratamiento previo aplicado y tiene un gran efecto sobre la hidrólisis enzimática y los pasos subsiguientes (Alvira et al. 2010).

Los principales factores que influyen en la hidrólisis enzimática de la celulosa en materias primas lignocelulósicas se pueden dividir en factores relacionados con la enzima y el sustrato, aunque muchos de ellos están unidos entre sí durante la hidrólisis (Alvira et al., 2010). Los factores que afectan sustratos de hidrólisis enzimática incluyen celulosa, la actividad celulasa y las condiciones de reacción (temperatura, pH, y otros parámetros) (Sun & Cheng. 2002).

Se observó que el pretratamiento mejora la hidrólisis, pero en algunos casos aumenta el índice de cristalinidad de la fracción celulósica. Esto fue sugerido que es debido a la eliminación o reducción de la celulosa amorfa más fácilmente disponible después de pre-tratamientos como la explosión de vapor. En contraste, el pretratamiento con pH alto se encuentra que tiene menos efecto y reducir la cristalinidad de la biomasa en algunos casos (Alvira et al. 2010).

La longitud de la cadena de celulosa, tal como se mide por el grado de polimerización por una variedad de métodos, una característica importante es que el material se convierte en azúcares fermentables por digestión enzimática. La caracterización exacta de la longitud natural de la cadena de celulosa es fundamental para estudiar el rendimiento de la celulasa, especialmente en el caso de exo-Celulasas (Hubbel & Ragauskas. 2010).

El grado de polimerización se relaciona principalmente con otras características del sustrato, como la cristalinidad. Aunque el papel

de la longitud de la cadena de glucano no se conoce definitivamente, se cree que afecta a la hidrólisis de la celulosa. La despolimerización depende de la naturaleza del sustrato. En la hidrólisis enzimática, endoglucanasas sitios internos escinden de las cadenas de celulosa, preferiblemente menos ordenado, siendo el principal responsable de la reducción del grado de polimerización de sustratos celulósicos. Sin embargo, independientemente del sustrato que es atacado, que parece ser una "nivelación" GP Celulosa, correlacionado con el incremento en la obstinación de la celulosa cristalina residual (Alvira et al. 2010).

2.3 Definición de la terminología

Mango

El mango es una fruta de la zona intertropical, de pulpa carnosa y semi-ácida, de origen asiático, comprende algunas variedades, muchas de ellas obtenidas por injerto (Carro & González. 2009)

Residuos de mango

Llamamos residuo a cualquier tipo de material que esté generado por la actividad humana y que está destinado a ser desechado. Hoy en día la sociedad tiende en gran medida hacia los productos descartables, generándose de esta manera una necesidad de producir más y más elementos de consumo. (Quizhpi. L. 2008)

Celulosa

Es un polímero de D-glucosa unida por enlaces glucosídicos β -1,4 que se estructuran en largas cadenas lineales (microfibrillas) unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals intermoleculares, formando una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática. (Ovando & Waliszewski, 2005; Béguin & Aubert. 1994)

Enzima.

Las enzimas son proteínas que participan en lograr cambios y transformaciones de otras sustancias. (Suárez, 2008)

Hidrólisis.

Es una reacción en la que se rompe un enlace covalente entre dos subunidades por medio de la adición del equivalente a una molécula de agua; se agrega un átomo de hidrógeno a una sub unidad y un grupo hidroxilo a la otra.

Hidrólisis acida.

La hidrólisis catalizada con ácido diluido o concentrado ha sido ampliamente utilizada para romper los polímeros de celulosa y la hemicelulosa de la biomasa celulósica para formar moléculas de azúcar individuales que pueden ser fermentados en etanol (Orozco et al. 2011).

Hidrólisis enzimática.

Se entiende por hidrólisis enzimática a la acción de las enzimas hidrolasas que catalizan y rompen los enlaces de agua según $H-OH + R-R' \rightarrow R-H + R'-OH.$, en estructuras orgánicas como carbohidratos, lípidos o proteína.

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

3.1 Tipo y diseño de la investigación:

3.1.1 Tipo de investigación:

Según el manejo de variables es Experimental, se estudiará las variables independientes: Pre tratamiento para la deslignificación (Térmica y Química), Tipo de enzima (Complejo de Celulásas y Complejo de enzimas) y Concentración de enzima de 400 ppm (-) a 900 ppm (+); y dependientes: Miligramos de azúcares fermentables / mg de material seco, con la finalidad de determinar la mejor combinación de las variables independientes que permita la mayor obtención de azúcares fermentables.

Según su contexto se realiza en situaciones de laboratorio, lo que conlleva la creación intencionada de las condiciones de investigación establecidas en el plan estadístico descritas con mayor rigor y control de la situación.

3.1.2 Diseño de la investigación:

Nos ajustamos a una investigación experimental, cuyos procedimientos permitirá la evaluación y manipulación de las variables dependientes en función a los resultados alcanzado por las variables independientes.

3.2 Población y muestra:

3.2.1 Población

Cáscara de mango

3.2.2 Muestra

Cáscara de mango de la variedad Kent, procedente de la Empresa Procesadora SAC – Región Lambayeque.

3.2.3 Muestreo

Para el presente estudio se aplicó un muestro no probabilístico por conveniencia, ya que la cantidad de muestra a emplear está determinada por el número de tratamientos establecido en la matriz Cuadro 3.3.

3.2.4 Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión: Cáscara es proveniente del mango organolépticamente maduro entre los 12 – 14 grados Brix.

Criterios de exclusión: Cascara de mango con indicios de algún tipo de peligro físico, químico o biológico.

3.3 Hipótesis:

Hi: La aplicación de un pre-tratamiento químico (ácido) y térmico, previo a una hidrólisis enzimática (Complejo celulasa y complejo enzima), influyen en la maximización del rendimiento de azúcares fermentables.

Ho: La aplicación de un pre-tratamiento químico (NaOH) y térmico, previo a una hidrólisis enzimática (Complejo celulasa y complejo enzima), no influyen en la maximización del rendimiento de azúcares fermentables.

3.4 Variables

Variable independiente:

Pre tratamiento:

Deslignificación:

Térmica

Química (NaOH)

Tipo de enzima:

Complejo de Celulásas

Complejo de Enzimas (Péctinasas, Celulásas, arabinasa, β -glucanasa, hemicelulasas, y xilanasas)

Concentración de enzima:

400 ppm (-) a 900 ppm (+)

Variable dependiente:

Rendimiento: Miligramos de azúcares fermentables / mg de material seco

3.5 Operacionalización de las variables:

3.5.1 Variable Independiente:

Cuadro 3.1

Operacionalización de las variables Independientes

Variable Independiente	Dimensiones	Indicadores	Técnicas e instrumentos de Recolección de datos
Pre tratamiento para Deslignificación	Térmica Química		Temperatura y Tiempo Concentración de NaOH
Tipo de enzima	Complejo de Celulásas Complejo de enzimas		
Concentración de enzima	ppm	400 – 900	Análisis Volumétrico
Variable Dependiente	Dimensiones	Indicadores	Técnicas e instrumentos de Recolección de datos
Rendimiento	mg. de azúcares fermentables / g de cáscara seca		Análisis espectrofotométrico

Fuente: Elaborado por el autor, 2015

3.5.2 Variable Dependiente: Rendimiento de azúcares fermentables

Cuadro 3.2.

Operacionalización de las variables dependientes

	Tratamientos del estudio	
	Indicadores	Técnicas e instrumentos de recolección de datos
Rendimiento	mg. de azúcares fermentables / g de cáscara seca	Análisis espectrofotométrico

Fuente: Elaborado por el autor, 2015

3.6 Métodos, técnicas de investigación

3.6.1 Métodos de investigación

Análisis Físico y Químicos de los Residuos Fermentables

Humedad

La humedad se determinó por secado y por diferencia de los pesos de acuerdo al método 934.06 (37.1.10) del A.O.A.C (1996).

$$\%H = \frac{P_m - (P_f - P_i)}{P_m} \times 100\% \dots \dots \dots (16)$$

Donde:

%H: Humedad en porcentaje de masa.

P_f : Peso final de la placa con la muestra.

P_i : Peso de la placa vacía.

P_m : Peso de la muestra.

Cenizas

Se determinó por incineración de la muestra a 650°C por 3 horas según A.O.A.C (1995) 942.05.

$$\%C = \frac{P_f - P_i}{P_m} \times 100\% \dots \dots \dots (17)$$

Donde:

%C: Contenido de cenizas en porcentaje de masa.

P_f : Peso final del crisol con las cenizas.

P_i : Peso del crisol vacío.

P_m : Peso de la muestra.

Índice de Acidez

Se determinó por Método de Titulación directa. La acidez total fue determinada en las muestras utilizando un sistema de titulación, con Hidróxido de Sodio al 0.1N, utilizando como indicador fenolftaleína. Para cada una de las lecturas se introdujo 1 ml de la muestra en un vaso de precipitación para proceder a la titulación. Se registró un valor de gasto para hacer virar de incoloro a rosado fuerte, de esta manera se determinó la acidez total en base a ácido cítrico.

Grados Brix

Los grados Brix se determinó en las muestras utilizando un refractómetro ABBE, hecho en Polonia, NI: 25790/91, el cual fue previamente calibrado con agua destilada. Para cada una de las lecturas se introdujo la muestra entre dos prismas. Se registrara un valor de grados Brix, para cada una de las muestras, expresados a un lugar decimal.

Determinación de pH

El pH se determinó en las muestras utilizando un potenciómetro portátil marca Hanna Instruments, el cual fue previamente calibrado con soluciones amortiguadoras de pH 4.00 y 7.00. Para cada una de las lecturas se introducirá el electrodo en la muestra cuya temperatura fue programada entre 20-25 °C. Se registró un valor de pH a cada una de las muestras expresados a dos lugares decimales.

Contenido de Azúcares Reductores

Preparación del Reactivo DNS:

Se mezcló y disolvió en 250 ml. de agua destilada 8 gr. de NaOH y 15 gr. de tartrato de Sodio y Potasio.

Posteriormente se agregó 5 gr. de Acido 3,5 dinotrasalicilico bajo calentamiento. Se aforo a 500 ml con agua destilada y se almacenan a temperatura ambiente protegiéndolo de la luz.

Curva Patrón de Azúcares Reductores:

Se utilizó un estándar de 1.0 mg/ml. de glucosa, realizando las diluciones para obtener concentraciones de 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0.

Se realizó una curva patrón de glucosa.

Se extrajo 1 ml de cada solución y coloco en un tubo de ensayo adicionando 1 ml de la solución DNS, se agito y llevo a ebullición por 10 minutos. Se Enfrió rápidamente y se agregó 10 ml de agua destilada con previa agitación. Se llevó la muestra al espectrofotómetro a 540 nm y se leyó su absorbancia.

Análisis de Muestra:

Se diluyó 1 ml. de cada muestra en 100ml. de agua destilada en una probeta, luego extrajo 1 ml de esta solución en un tubo de ensayo adicionando un 1ml. de la solución DNS, se agito y llevo luego a ebullición por 10 min. Se enfrió rápidamente y agrego 10 ml. (o 5 ml.) de agua destilada con previa agitación.

Se llevó la muestra al espectrofotómetro a 540 nm. Y se anotó su absorbancia. Con este dato encontrado insertamos en la curva de calibración previamente construida y el resultado se lee como gramo de glucosa.

3.6.2 Técnicas e Instrumentos de recolección de datos

Se utilizaron técnicas e instrumentos de recolección de datos que garanticen la captura de información útil para el proyecto ya porten validez a los resultados. Se tomara en consideración las especificaciones técnicas de las enzimas a usar. El proceso de recolección de datos se realizara mediante la aplicación una guía de observación de campo.

3.6.3 Instrumentos de recolección de datos

Los instrumentos usados en la presente investigación fueron los protocolos de trabajo y las Guía de observación. El procesamiento de datos se realizó empleando una computadora utilizando el siguiente software:

Procesador de texto Microsoft Word XP.

Hoja de Cálculo Excel.

Programa de Análisis Estadístico Design Expert V.9.0 de la empresa Stat-Ease, Inc en versión Demo.

3.6.4 Procedimiento para la recolección de datos

La recolección de datos se siguió el procedimiento según la figura 2.3. A continuación se detalla cada una de las etapas a seguir:

Desecho de mango: Se recibió y acondicionó los desechos de mango (materia prima) proveniente de la empresa Procesadora SAC en bolsas de polipropileno.

Lavado: Se realizó un lavado con agua potable para eliminación de impurezas, posteriormente se desinfectó con cloro a una concentración de 40 ppm. Se dejó escurrir para eliminar el exceso de agua.

Cortado: Se cortó manualmente con la ayuda de cuchillos para reducir el tamaño a fin de facilitar el secado de los desechos.

Secado: El secado se realizó a una temperatura de 70°C en un horno de aire forzado por un tiempo de 8 horas.

Molienda: La molienda se realizó en un molino de tornillo con la finalidad de reducir el tamaño de partículas.

Pre-tratamiento del desecho de mango

Deslignificación química: Los desechos se sumergieron en una solución de NaOH 0,1N durante 15 minutos en una relación 1:3. Pasado ese tiempo se añadió 0.272 g de sulfato de calcio (CaSO) por 100ml solución y se dejó reposar durante 3 horas.

Deslignificación térmica: Los desechos se colocaron en una bolsa de polipropileno, se sellaron herméticamente, y se colocaron en un autoclave hasta que alcance los 110°C por un tiempo de 15 minutos.

Hidrolisis enzimática

La hidrolisis enzimática se efectuó con dos tipos de enzimas comerciales: complejo de Celulasas y complejo de enzimas de la marca Novozyme. La primera enzima es un complejo de Celulasas que actúa sobre la celulosa y la hidroliza, y la segunda es una mezcla de Péctinasas, Celulásas, arabinasa, β -glucanasa, hemicelulasas, y xilanasas, desdobla los complejos de pectina y celulosa. Las concentraciones de las enzimas será de 400ppm – 900ppm. El pH de trabajo fue de 4.7 y temperatura de 47°C.

Cuantificación de azúcares reductores:

Se realizó por el método del DNS el cual se detalló en el apartado anterior.

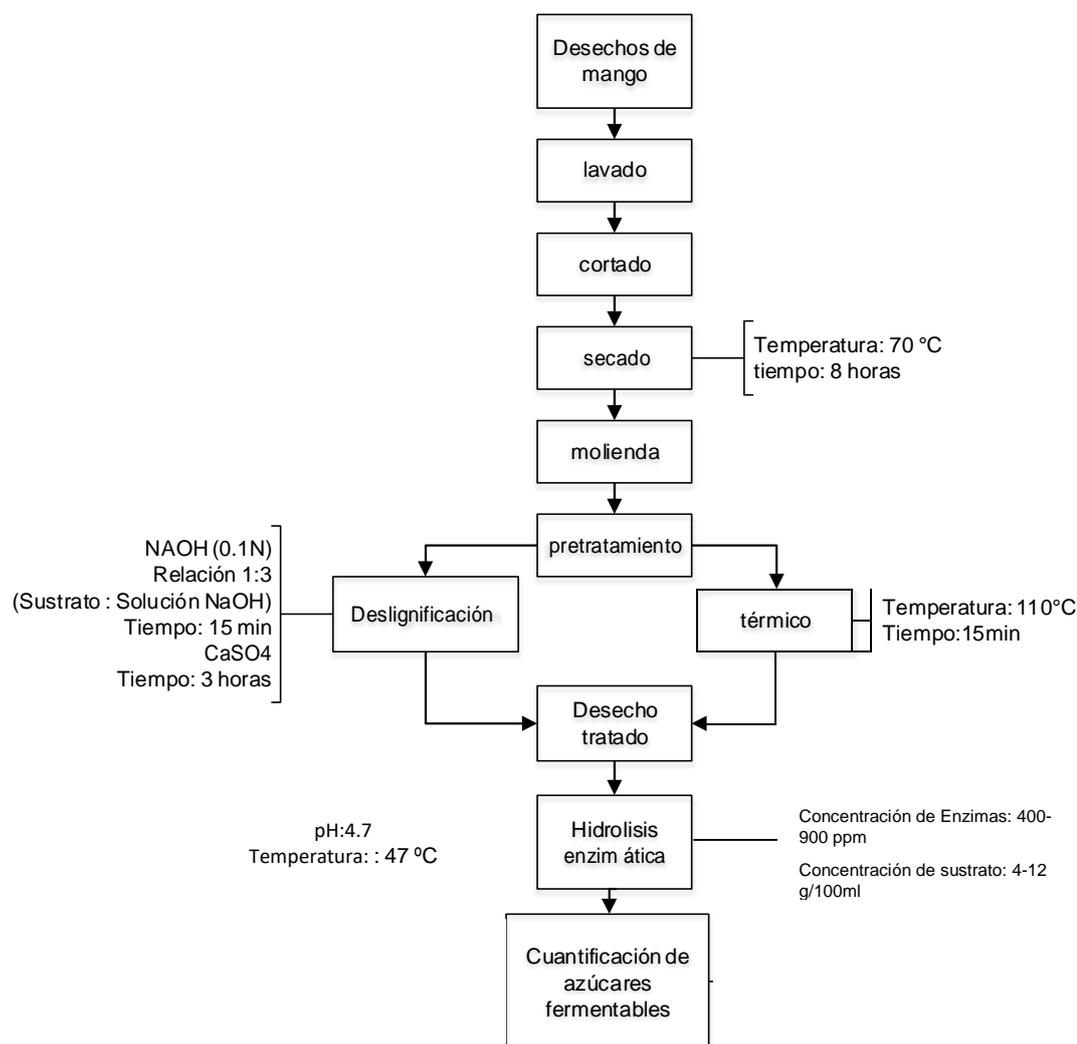


Figura 2.3.

Esquema del proceso de hidrolisis enzimática de desecho de mango

Fuente: Elaboración propia

3.6.5 Plan de análisis estadístico de datos

Se empleó el estudio tipo superficie de respuesta, como procedimiento de optimización y consiste en una colección de técnicas matemáticas y estadísticas que tienen como propósito analizar y estudiar procesos donde las respuestas dependen de múltiples variables de operación.

El diseño estadístico usado fue el Diseño Experimental D-óptimo, con las pruebas necesarias para ajustar a un modelo cuadrático los

resultados obtenidos. La matriz se elaboró empleando el paquete estadístico Desing – Expert 8.0. En el cuadro 3.2. Se presenta la matriz de experimentos a realizar en la presente investigación teniendo como variable dependiente el Rendimiento en mg de azúcares fermentables / g de cascara seca.

Cuadro 3.3.

Matriz de experimentos según el Diseño D-óptimo.

Std	Run	A: Concentración de enzima (ppm)	B: Concentración de sustrato (g/100 ml)	C:Pre-tratamiento
13	1	400.00	Complejo de celulásas	Térmico
5	2	900.00	Complejo enzimático	Térmico
8	3	400.00	Complejo de celulásas	Químico (NaOH)
10	4	650.00	Complejo de celulásas	Químico (NaOH)
9	5	400.00	Complejo enzimático	Térmico
7	6	650.00	Complejo enzimático	Térmico
4	7	900.00	Complejo de celulásas	Químico (NaOH)
11	8	650.00	Complejo enzimático	Químico (NaOH)
1	9	900.00	Complejo enzimático	Químico (NaOH)
2	10	900.00	Complejo de celulásas	Térmico
6	11	400.00	Complejo de celulásas	Térmico
3	12	400.00	Complejo enzimático	Químico (NaOH)
14	13	900.00	Complejo enzimático	Químico (NaOH)
12	14	900.00	Complejo de celulásas	Térmico

Fuente: Desing Expert v. 7.0

3.6.6 Criterios éticos

a. Respeto a la propiedad intelectual

Se respetó el principio de autonomía de autores, tanto del informe final como del proyecto, ya que no existió adulteración a la información que pueda dañar la integridad de este.

No se hará ninguna alteración en los datos obtenidos en la parte experimental.

El presente proyecto cumple con los requerimientos establecidos por OMPI (Organización Mundial de la Propiedad Intelectual) según nociones básicas sobre derecho de autor y derechos conexos, que protege los intereses de los creadores dándoles derechos de propiedad sobre sus creaciones, por lo cual cada texto extraído de

libros, tesis, artículos, que hemos tomado para redactar el mencionado estudio ha sido debidamente citado.

b. Beneficencia

El propósito del indicado estudio se fundamenta en el aporte y beneficios que trae consigo la producción de azúcares fermentables a nivel ambiental, económico y social. Desde el punto de vista ambiental beneficiará a la disminución del efecto invernadero ocasionado por las emisiones de CO₂, a nivel social ayuda a reducir los problemas de desempleo y hambre que se presenta en el ciertos sectores; nivel económico contribuirá a aliviar las finanzas de los países consumidores y productores de biocombustibles. Así mismo personalmente ayudará a afianzar nuestro desarrollo profesional debido a que estaremos aplicando las bases y conocimientos prácticos adquiridos a lo largo del proceso de aprendizaje en la Universidad Señor de Sipán.

c. Respeto a la dignidad humana

Para el desarrollo del propuesto estudio se tomó en cuenta el respeto a cada una de las personas que participen en el proceso, además de ello estaremos dispuestos a cumplir con todos los deberes estipulados según el reglamentos de la Universidad Señor de Sipán.

3.6.7 Criterios de rigor científico

a. Credibilidad, valor de la verdad/autenticidad:

La información requerida para el desarrollo de este trabajo ha sido tomada de estudios validados científicamente, así mismo los resultados obtenidos en el estudio fueron plasmados tal y como se obtendrá y no será modificado, permitiendo generar confianza y credibilidad en la investigación.

b. Transferibilidad, aplicabilidad

La transferibilidad a favorecer con este estudio está dirigido a estudiantes, profesionales y aquellas personas que busquen no solo el desarrollo personal sino también de su comunidad para ello se ofrecerá una descripción densa que permita al lector manejar la información necesaria y suficiente que facilite establecer comparaciones y transferir dichos resultados.

c. Consistencia, dependencia / Replicabilidad

Se ha de contrastar los resultados obtenidos por los diferentes métodos aplicados, entre los que podemos citar: reactivo DNS (determinación de azúcares reductores), brixómetro (determinación de grados Brix), potenciómetro (determinación de pH), titulación con hidróxido de sodio al 0.1N (determinar el índice de acidez), estufa (determinación de humedad), mufla (determinación de cenizas), además de ello se utilizaran diagramas de flujos y ficha de trabajo lo cual constituye un adecuado método que justifica una vez más la consistencia durante el desarrollo del presente trabajo, pues a través de él se pueden establecer pistas de revisión, donde se reflejan los procesos seguidos para la recogida de datos, análisis e interpretaciones de los datos, lo que ayudaría a considerar el modo en que los resultados dependen de los contextos y sujetos estudiados.

d. Confirmabilidad o reflexividad, neutralidad / objetividad

Concluida la investigación se procederá hacer un análisis comparativo entre los datos aportados en el desarrollo del proyecto y los obtenidos, dando mayor confiabilidad al estudio cabe mencionar que a la medida que avance la investigación , la comprensión de la realidad objeto de estudio permite desvelar indicios y nuevos caminos a recorrer más, que presentar absoluta certeza.

e. Relevancia

Se realizó las conclusiones del trabajo resaltando la relación que existe con los objetivos y validando la hipótesis planteada

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

4.1. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

4.1.1. Características fisicoquímicas de la materia prima:

Para fines de esta investigación la materia prima está representada por la cáscara de mango seca y molida.

En la Cuadro 4.1 se presenta las características fisicoquímicas de la cáscara de mango deshidratada, para la determinación de cada característica se hicieron pruebas por triplicado para el cálculo del desvío de la lectura. Como se puede observar el contenido de humedad logrado es bajo $1.9\pm 0.012\%$, humedad ideal para la obtención de la harina condición a partir de la cual se inicia la aplicación de las variables independiente y variable dependiente según el Cuadro 3.3.

Cuadro 4.1

Características Fisicoquímicas de la Cáscara de mango deshidratada

Característica fisicoquímica	Valor
Humedad (%)	1.9 ± 0.012
Cenizas (%)	2.5 ± 0.095
Acidez Títulable (%)	0.38 ± 0.024
pH	4.52 ± 0.12

Fuente: Laboratorio de Química y Suelos de la Universidad Señor de Sipán

En la Figura 4.1 se presenta los análisis realizados para caracterizar fisicoquímicamente la cascara de mango.



(a) Análisis de Humedad de la cáscara de mango (b) Análisis de cenizas de la cáscara de mango

Figura 4.1

Análisis fisicoquímico de la cáscara de mango.

Fuente: Laboratorio de Química y Suelos de la Universidad Señor de Sipán

4.1.2. Hidrólisis enzima de cáscara de mango

Para esta experiencia se sigue el flujo establecido en la Figura 2.3 y los tratamientos a ejecutar como fueron planteados en el Cuadro 3.3.

En la Figura 4.2 se presenta el procesos de acondicionamiento de la cascara de mango previo al proceso enzimático.

En la Figura 4.3 se presenta el proceso de hidrolisis enzimática realizado para obtener los resultados.



(a) Lavado de la cáscara de mango



(b) Secado de la cáscara de mango



(c) Cáscara de mango seca



Molienda de la cáscara de mango

Figura 4.2.

Acondicionamiento de la cáscara de mango.

Fuente: Laboratorio de Química y Suelos de la Universidad Señor de Sipán



(a) Deslignificación con NaOH



(b) Preparación del sustrato



(c) Adición de enzima



d. Catálisis enzimática en shakers



e. separación de residuos fibrosos de los azúcares fermentables disueltos

Figura 4.3.

Proceso de hidrólisis enzimática de cáscara de mango.

Fuente: Laboratorio de Química y Suelos de la Universidad Señor de Sipán

A partir de la cuantificación de los azúcares fermentables mg de azúcares fermentables/gramos de material seco se establece el Cuadro 4.2, la ejecución de la matriz planteada en el cuadro 3.3 y la del proceso de hidrólisis enzimática detallado en las figuras anteriores.

Cuadro 4.2

Matriz de resultados para la variable dependiente Rendimiento según el diseño experimental.

Run	A: Concentración de enzima (ppm)	B: Tipo de enzima	C: Pre-tratamiento	Rendimiento mg de azúcares fermentables / g de material seco
1	400.00	Complejo de celulásas	Térmico	31.4523
2	900.00	Complejo enzimático	Térmico	32.9503
3	400.00	Complejo de celulásas	Químico (NaOH)	48.5277
4	650.00	Complejo de celulásas	Químico (NaOH)	30.9052
5	400.00	Complejo enzimático	Térmico	17.5469
6	650.00	Complejo enzimático	Térmico	19.2004
7	900.00	Complejo de celulásas	Químico (NaOH)	24.0303
8	650.00	Complejo enzimático	Químico (NaOH)	21.4195
9	900.00	Complejo enzimático	Químico (NaOH)	30.7529
10	900.00	Complejo de celulásas	Térmico	21.0279
11	400.00	Complejo de celulásas	Térmico	30.4701
12	400.00	Complejo enzimático	Químico (NaOH)	21.7894
13	900.00	Complejo enzimático	Químico (NaOH)	22.8119
14	900.00	Complejo de celulásas	Térmico	21.1234

Fuente: Desing Expert v. 7.0

4.1.3. Evaluación estadística y comportamiento de la variable dependiente

De los resultados del Cuadro 4.2 se procedió hacer el análisis de varianza y determinar la significancia de las variables independiente sobre el rendimiento de azúcares fermentables el cual se presenta en el Cuadro 4.3.

Como se puede observar en el Cuadro 4.3 las variables B: Concentración de sustrato, C: Pre-tratamiento y las interacciones AB, AC y BC son estadísticamente significativas al 95% de confiabilidad al tener P-valores menores a 0.05.

Cuadro 4.3

Análisis de varianza para la variable rendimiento de azúcares fermentables

Variable	suma de cuadrados	grados de libertad	Cuadrados medios	Valor F	p-Valor Prop > F
Modelo	825.67	7	117.95	18.48	0.0012
A-Concentración de enzima	29.42	1	29.42	4.61	0.0754
B-Tipo de enzimas	125.38	1	125.38	19.65	0.0044
C-Pre-tratamiento de Deslignificación	84.48	1	84.48	13.24	0.0109
AB	455.80	1	455.80	71.43	0.0001
AC	102.12	1	102.12	16.00	0.0071
BC	78.71	1	78.71	12.33	0.0126
A ²	46.80	1	46.80	7.33	0.0352
Residual	38.29	6	6.38		
Lack of Fit	6.27	3	2.09	0.20	0.8932
Pure Error	32.02	3	10.67		
Cor Total	863.95	13			
R ²	0.9557				
Desviación estándar	2.53				
Coeficiente de variabilidad	9.49				

Fuente: Desing Expert v. 7.0

En el Cuadro 4.3 se indica un valor de 9.49% como coeficiente de variabilidad, indicando que existe un 90.51% de confiabilidad en la toma de datos. El ajuste del modelo fue expresado por el coeficiente de regresión R² el cual fue de 0.9557. El estadístico R² indica que 95.57% de la variabilidad en la respuesta pueden ser explicada por el modelo y responder a la ecuación 1. El valor también indica que sólo el 4.43 % de la variación total no se explica por el modelo. Esto muestra que la ecuación 1. Es un modelo conveniente para describir la respuesta del experimento mg de azúcares fermentables / g de material seco.

Ecuación 1

$$\text{Rendimiento} = +23.13 - (1.61 * A) - (3.02 * B) - (2.61 * C) + (6.71 * A * B) + (3.26 * A * C) + (2.56 * B * C) + 4.77 * A^2$$

En la Figura 4.4 presenta la distribución normal de los residuales, los tratamientos más cercanos a la línea nos indica que los residuales siguen una distribución normal indicando que el rendimiento obtenido a través de la aplicación de la ecuación 1 (valores predichos) son iguales a los valores observados (tratamientos ejecutados Cuadro 3.3), a partir de la diferencia de ambos se obtiene el valor residual, mientras más cercano a cero más próximo se encontrará a la recta de la normal, a

excepción de los tratamientos 5, 9 y 13, con valores residuales de 1.09, -3.95 y 3.99 respectivamente.

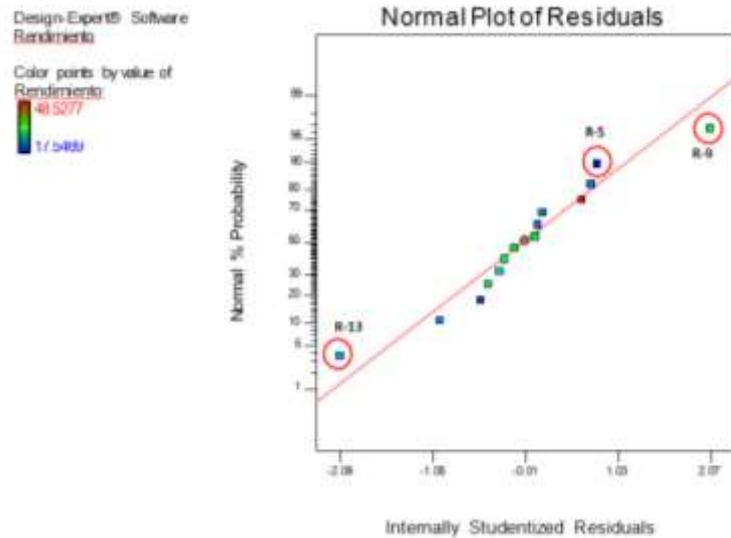


Figura 4.4.

Distribución normal de los residuales de la variable dependiente Rendimiento (mg de azúcares fermentables / g de material seco).

En la Figura 4.5 se presenta los valores predichos versus los valores observados, a fin de verificar cuales son los tratamientos ejecutados en laboratorio se acercaron a los valores predichos por la ecuación 1, esto se evidencia por su aproximación a cero y ubicación sobre la recta.

Los tratamientos 9 y 13 son los tratamientos que presentan residuales de +/- 3.97; representando el 4.43% de los datos que no logra explicar el modelo, los demás tratamiento presentan residuales próximos a cero y por debajo del +/- 0.15, estos valores próximos a cero indican la proximidad entre el valor predicho a través de la ecuación 1 y los valores actuales obtenidos experimentalmente e indicadas en la Cuadro 4.4, donde los valores negativos indican que el valor predicho es mayor al valor actual.

Design-Expert® Software
Rendimiento

Color points by value of
Rendimiento:

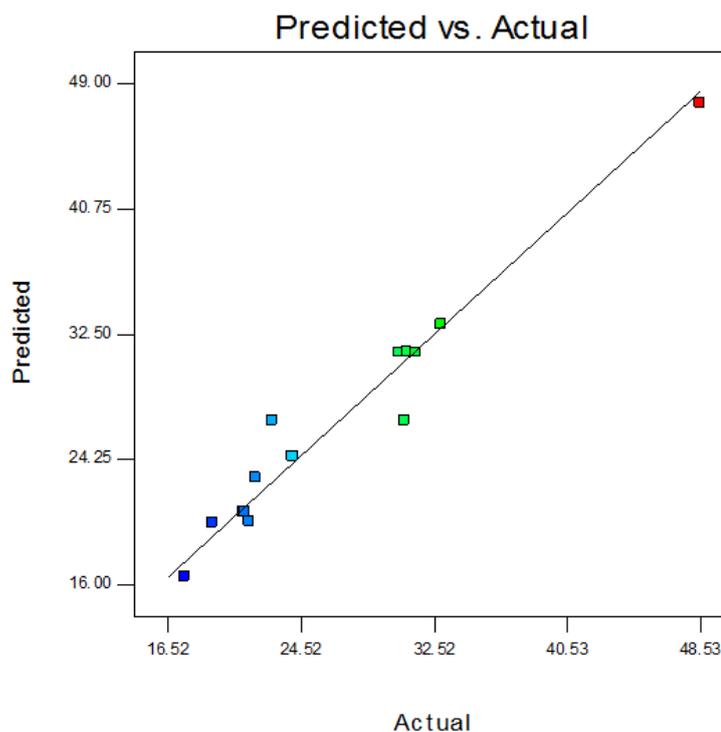


Figura 4.5

Valores predichos versus observados para la variable dependiente Rendimiento (mg de azúcares fermentables / g de material seco)

Cuadro 4.4

Valores actuales y predichos de los tratamientos experimentales para la variable Rendimiento (mg de azúcares fermentables / g de material seco)

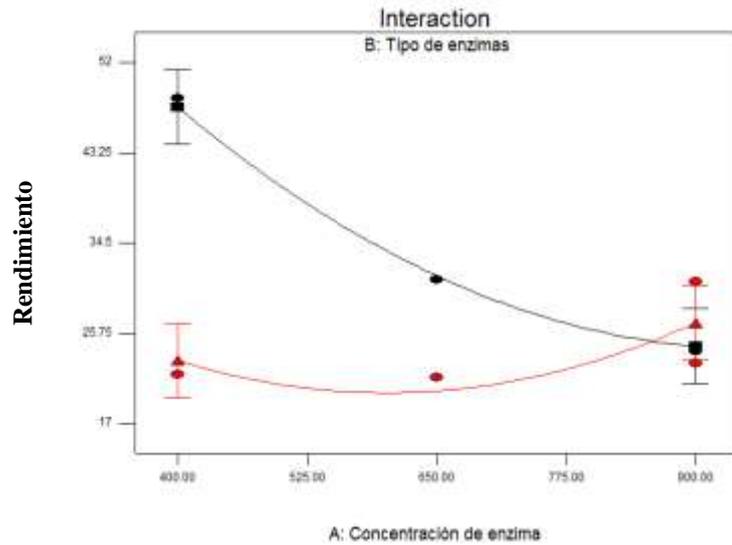
Tratamiento	Valor Actual	Valor Predicted	Residual
1	30.47	30.80	-0.33
2	32.95	33.19	-0.24
3	48.53	47.66	0.87
4	30.91	31.31	-0.41
5	17.55	16.45	1.09
6	19.20	20.06	-0.85
7	24.03	24.49	-0.46
8	21.42	20.16	1.26
9	30.75	26.76	3.99
10	21.03	20.69	0.33
11	30.47	30.80	-0.33
12	21.79	23.09	-1.30
13	22.81	26.76	-3.95
14	21.03	20.69	0.33

Fuente: Desing Expert

En la Figura 4.6 (a) para el pre-tratamiento de deslignificación química, conforme aumentamos la concentración para el tipo de enzima complejo de celulasa disminuye el rendimiento de 47.72 hasta 24.42 mg de azúcares fermentables/g de material seco, representando una disminución de 23.30 mg de azúcares fermentables/g de material seco sucediendo todo lo opuesto para el tipo complejo enzimático pasado de 23.02 hasta 26.8 mg de azúcares fermentables/g de material seco con sólo un incremento de 3.78 mg de azúcares fermentables/g de material seco. Así mismo en un nivel inferior de concentración de enzima (400 ppm) se presenta un mayor rendimiento de azúcares reductores en el complejo celulasa con un incremento de hasta 24.7 mg de azúcares fermentables/g de material seco. Para un nivel superior el escenario es inverso, donde el complejo enzimático presenta un mayor rendimiento en niveles de hasta 2.38 mg de azúcares fermentables/g de material seco. Ambos complejos consiguen un mismo rendimiento de 24.93 mg de azúcares fermentables/g de material seco, empleando 858 ppm de concentración de enzima, a partir de esta el comportamiento es inversamente proporcional.

Verificamos que resulta efectivo en la producción de azúcares reductores emplear una concentración de enzima de 400 ppm, aplicando como pre-tratamiento una deslignificación Química (NaOH). La acción del NaOH como pre tratamiento permite lograr el mayor desdoblamiento de las cadenas lignocelulósicas presentes en la harina de cáscara de mango, teniendo en cuenta que los enlaces glucosídicos β -1,4 que se estructuran en largas cadenas lineales (microfibrillas) unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals intramoleculares es donde el hidróxido logra una mayor acción.

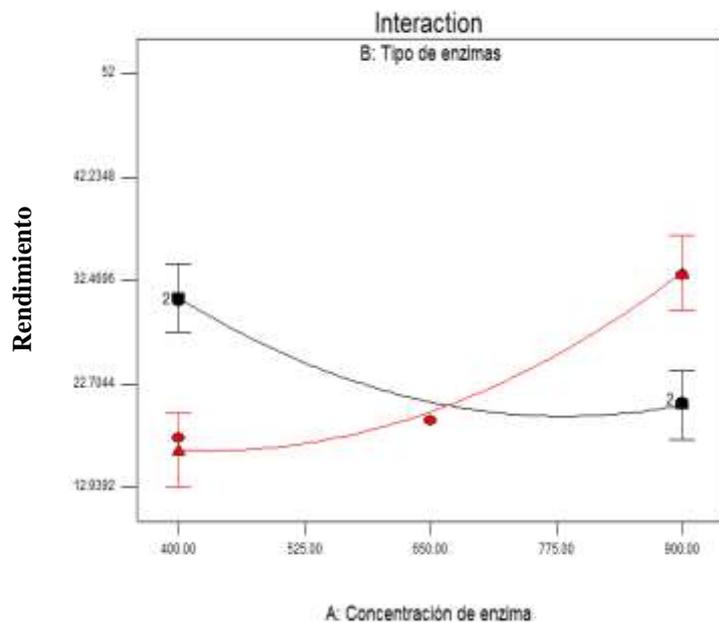
Design-Expert® Software
 Rendimiento
 ● Design Points
 ■ B1 Complejo de celulasas
 ▲ B2 Complejo enzimatico
 X1 = A: Concentración de enzima
 X2 = B: Tipo de enzimas
 Actual Factor
 C: Pre-tratamiento de deslignificación = Químico (NaOH)



a. Pre-tratamiento de deslignificación química (NaOH)

En la Figura 4.6 (b) para el pre-tratamiento de deslignificación térmica, conforme aumentamos la concentración para el tipo de enzima complejo de celulasas disminuye el rendimiento de 31.26 hasta 20.77 mg de azúcares fermentables/g de material seco, representando una disminución de 10.49 mg de azúcares fermentables/g de material seco, sucediendo todo lo opuesto para el tipo complejo enzimático pasado de 16.51 hasta 33.12mg de azúcares fermentables/g de material seco con un incremento de 16.61 mg de azúcares fermentables/g de material seco.

Design-Expert® Software
 Rendimiento
 ● Design Points
 ■ B1 Complejo de celulasas
 ▲ B2 Complejo enzimatico
 X1 = A: Concentración de enzima
 X2 = B: Tipo de enzimas
 Actual Factor
 C: Pre-tratamiento de deslignificación Térmico



b. Pre-tratamiento de deslignificación químico: Térmico

Figura 4.6 (a) y (b)

Efecto del tipo de enzima y concentración de enzima en la variable dependiente Rendimiento (mg de azúcares fermentables / g de material seco)

Fuente: Desing Expert 7.0

Así mismo en un nivel inferior de concentración de enzima (400 ppm) se presenta un mayor rendimiento de azúcares reductores en el complejo celulasa con un incremento de hasta 14.35 mg de azúcares fermentables/g de material seco. Para un nivel superior el escenario es inverso, donde el complejo enzimático presenta un mayor rendimiento en niveles de hasta 12.50 mg de azúcares fermentables/g de material seco. Ambos complejos consiguen un mismo rendimiento de 20.69 mg de azúcares fermentables/g de material seco, empleando 665.55 ppm de concentración de enzima, a partir de esta el comportamiento es inversamente proporcional.

Verificamos que resulta efectivo en la producción de azúcares reductores emplear una concentración de enzima de 400 ppm, aplicando como pre-tratamiento una deslignificación Térmica, ya que aplicar una concentración de 900 ppm sólo representa un incremento de 3 mg de azúcares fermentables/g de material seco.

Finalmente producto de los resultados resulta más eficiente aplicar un pretratamiento químico con concentración de enzima de 400 ppm ya que se logrará rendimiento de hasta 47.72 mg de azúcares fermentables/g de material seco.

En la Figura 4.7 para el tipo de enzima complejo enzimático, se puede observar que conforme se incrementa la concentración de enzima, aumenta el rendimiento para ambos pre tratamientos, siendo el térmico el mayor incremento de 16.51 hasta 33.12 mg de azúcares fermentables/g de material seco, siendo el incremento menor para el pre-tratamiento químico donde aumenta de 23.02 hasta 26.80 mg de azúcares fermentables/g de material seco. Cabe mencionar que a una concentración de enzima de 656 ppm aproximadamente se debe de obtener el mismo rendimiento 20.60 mg de azúcares fermentables/g de material seco. Para ambos pre-tratamiento.

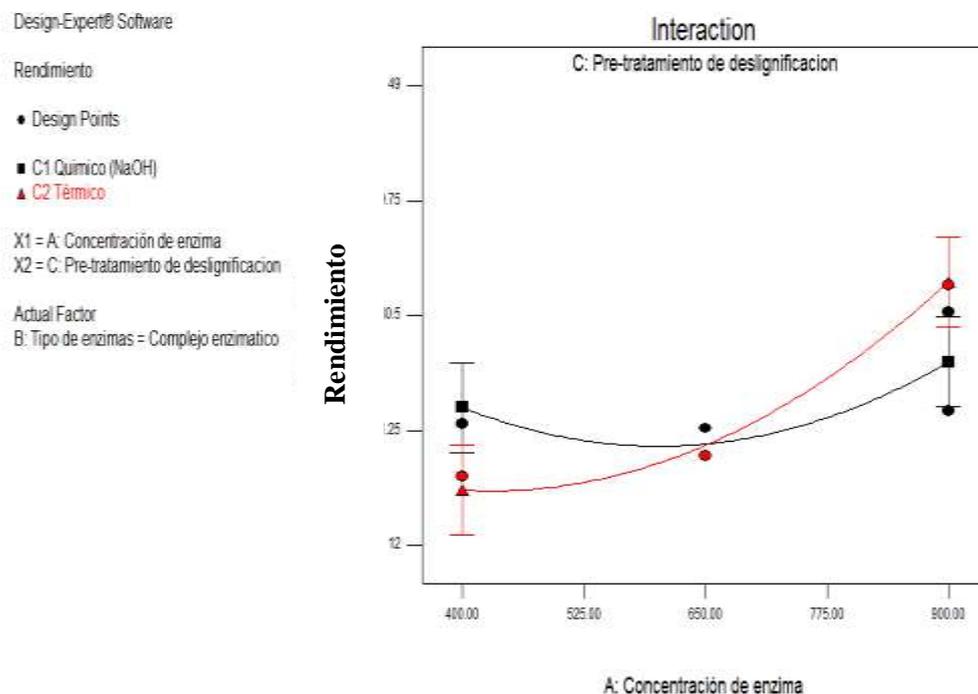


Figura 4.7

Efecto del pre-tratamiento y concentración de enzima (complejo enzimático) en la variable dependiente Rendimiento (mg de azúcares fermentables / g de material seco)

Optimización

Se realizó la optimización aplicando la metodología de función deseada, aplicando el paquete estadístico Design Expert V. 7.0, los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro 4.4, en base a las evaluaciones anteriores se tomaron las decisiones pertinentes para esta etapa con el objetivo de maximizar el rendimiento de azúcares fermentables.

Se tiene que realizar un pre-tratamiento de deslignificación química con NaOH, empleando como enzima el complejo de Celulasas a una concentración de 400ppm, los cuales permitirán obtener un rendimiento máximo de azúcares fermentables de 47.72 mg de azúcares fermentables / g de material seco.

Cuadro 4.5.

Optimización de la variable rendimiento de azúcares fermentables (mg de azúcares fermentables / g de material seco)

T	Concentración de enzima	Tipo de enzimas	Pre-tratamiento de deslignificación	Rendimiento	Desirability
1	400	Complejo de celulasas	Químico (NaOH)	47.72537	0.974103
2	900	Complejo enzimático	Térmico	33.118384	0.502617
3	400	Complejo de celulasas	Térmico	31.260002	0.442632
4	900	Complejo enzimático	Químico (NaOH)	26.800680	0.298693
5	400	Complejo enzimático	Químico (NaOH)	23.021143	0.176697

4.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el Cuadro 4.1 se puede apreciar las características físico química de la cáscara deshidratada de mango, Razo A. (2013) obtuvo valores de Humedad de 5.24% y Cenizas 4.23%, muy diferentes a los resultados obtenidos. Se precisa que para fines de la investigación se requería la menor humedad posible para obtener la cáscara de mango en polvo con tamaño de partícula lo más fino posible, para lograr la mejor acción de la enzima al entrar en contacto con el sustrato y así lograr la mayor producción de azúcares reductores.

La deslignificación representa una etapa previa de gran importancia que afecta en el rendimiento de azúcares fermentables, Salcedo (2013) evaluó la influencia del contenido de lignina sobre la facilidad para hidrolizar los sustratos para las diferentes enzimas, concluyendo que la lignina puede actuar como un inhibidor en la hidrólisis enzimática de los residuos de la caña de azúcar, siendo necesario la aplicación de pre-tratamientos efectivos; la cáscara de mango presenta en su composición compuestos lignocelulósicos que necesitan ser deslignificadas aplicando diversos

tratamientos como el químico con NaOH, un pretratamiento alcalino rompe los enlaces hemicelulosa–lignina, ocasionando que se reduzcan los contenidos de lignina y hemicelulosa en la biomasa pre tratada, que se altere la estructura de la lignina residual y que se aumente la porosidad y la superficie interna de la biomasa: que disminuya el grado de cristalinidad de la celulosa y que se facilite la penetración de las moléculas de agua a las capas interiores de la biomasa, facilitando así el ataque enzimático de la celulosa por las Celulasas (Silverstein et al., 2007).

Estudios reportados por Cortinez V. (2010), emplearon como pre tratamiento NaOH obteniéndose como rendimiento máximo de 13 a 23 mg/g materia prima. Comprobando que con este tipo de pre tratamiento se pueden alcanzar los mayores rendimientos, para nuestro caso obtuvimos 47.72 mg de azúcares fermentables/g de material seco.

La aplicación del pre tratamiento térmico, a una temperatura de 110°C por un tiempo de 15 minutos permitieron obtener resultados totalmente opuesto a los resultados obtenidos por Mejía G. et al, (2007) quienes lograron rendimientos de hasta 38,15%, con una temperatura de extracción de 98°C. Los rendimientos con tratamiento térmico son muchos menores a los que podrían lograrse aplicando un tratamiento alcalino. En los tratamientos térmicos la celulosa no resulta tan afectada por la temperatura, de lo contrario sucede con la hemicelulosa que si resulta degradada o hidrolizada por el tratamiento térmico, es decir, el tratamiento de hidrólisis térmica tiene efectos más notables sobre la hemicelulosa y en menor medida sobre la celulosa.

Desde el punto de vista de la hidrólisis enzimática, la mayor producción de azúcares reductores la tuvo la enzima complejo de celulasa, resultado similar obtuvo Mejía L. et al 2007., quien empleo la enzima Celluclast la cual actúa selectivamente sobre la celulosa obteniendo rendimiento superiores. La celulosa que se degrada, en su mayoría se convirtió en azúcares reductores, ya que la celulasa es una enzima de alta selectividad que garantiza la conversión o despolimerización de la celulosa y las

hemicelulosas, en su mayoría, a unidades fermentables de glucosa.
(Ballesteros I., 2001).

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- a) La cáscara de mango deshidratada utilizada tiene las siguientes características fisicoquímicas, 1.9% de humedad, cenizas 2.5%, pH 4.52 y acidez titulable 0.38%.
- b) El mejor pre-tratamiento de deslignificación para la cáscara de mango es el químico con NaOH (0.1 N) con un rendimiento de hasta 47.42 mg de azúcares fermentables / g de material seco.
- c) El complejo de Celulasas a una concentración de 400 ppm permite obtener el máximo rendimiento de azúcares fermentables.

5.2. Recomendaciones

- a) Evaluar otro pre tratamiento para la Deslignificación en la harina de cáscara mango, como por ejemplo: Pretratamientos ácidos.
- b) Evaluar otros complejos de enzimas industriales para la hidrolisis enzimática de la harina de cáscara de mango, como por ejemplo: Complejo péctinasas.

Referencias Bibliográficas

1. Agrobanco. (2007). *Cultivo del Mango. Perú: Area de Desarrollo - Banco Agropecuario.* Obtenido de http://www.agrobanco.com.pe/pdfs/publicacionagroinforma/3_cultivo_d_el_mango.pdf
2. Ballesteros, R. F. (2001). *Evaluación de programas: una guía práctica en ámbitos sociales, educativos y de salud.*
3. Aguilar, C. (2010). Hidrólise Enzimática de Resíduos Lignocelulósicos Utilizando Celulasas Produzidas pelo Fungo *Aspergillus niger*. Dissertação do Programa de PósGraduação em Engenharia Química. Paraná, Brasil: Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Unioeste Centro de Engenharias e Ciências Exatas.
4. Alexandrino, A., Faria, H., Souza, C., & Peralta, R. (2007). Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotusostreatus*. Obtenido de SCIELO: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612007000200026&script=sci_arttext
5. Alvira, P., Tomás, E., Ballesteros, M., & Negro, M. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. Obtenido de Science direct: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852409015983>
6. Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. Obtenido de Science Direct: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196890410003791>
7. Bangerth, F., & Carle, R. (2002). Physical, chemical and sensory properties of nine Thai mango cultivars and evaluation of their technological and nutritional potential. Obtenido de university of hohenheim: https://www.uni-hohenheim.de/fileadmin/einrichtungen/sfb564/events/uplands2002/Full-Pap-S3B-3_Vasquez.pdf
8. Betancur, G., & Pereira JR., N. (2010). Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part I: Diluted acid pretreatment optimization. Obtenido de SCIELO: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-34582010000300010
9. Chen, H., & Qiu, W. (2010). Key technologies for bioethanol production from lignocellulose. Obtenido de Science Direct: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073497501000056X>

10. Cutter, E. G. (1986). Anatomía Vegetal. Parte 1 – Células e Tejidos 2ª Ed. . Sao Paulo, Brasil: Editora Roca.
11. Cortínez V. (2010). Comparación de pretratamientos en residuos forestales para la producción de bioetanol de segunda generación: hidrólisis ácida y líquidos iónicos. Tesis para optar al grado de magister en ciencias de la ingeniería mención química. Universidad de Chile.
12. Dantas, E., & Aquino, L. (2010). Fermentação em Estado Sólido de Diferentes Resíduos para a Obtenção de Lipase Microbiana. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, p.81-87.
13. Dashtban, M., Heidi, S., & Wensheng, Q. (2009). Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues: Opportunities & Perspectives. Obtenido de International Journal of Biological Sciences: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2748470/>
14. Diaz, A. (2005). Hidrólisis de residuos de la venta de verduras y hortalizas para la producción de bioetanol. Trabajo fin de máster universitario en biotecnología alimentaria. España: Universidad de Oviedo.
15. Faostat. (2007). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Obtenido de FAO Statistics: <http://faostat.fao.org/>
16. Fengel, D., & Wegner, G. (1989). Wood chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin, Alemania: Walter de Gruyter.
17. García, M. (2011). Producción de biodiesel mediante fermentación en estado sólido de compuestos lignocelulósicos derivados del bagazo de remolacha. Mexico: Universidad Politécnica de Pachuca.
18. Giraldo, L. M., Correa, H. M., Gutiérrez, J. B., & Castano, C. C. (2007). Aprovechamiento del residuo agroindustrial del mango común (*Mangifera indica* L.) en la obtención de azúcares fermentables. Ingeniería y ciencia, (6), 41-62.
19. Gonzalez, S., Soto, N., Rutiaga, O., Medrano, H., Rutiaga, J., & López, J. (2011). Optimización del proceso de hidrólisis enzimática de una mezcla de pajas de frijol de cuatro variedades. Obtenido de Redalyc: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62019843003>
20. Gottschalk, L., Oliveira, R., & Bon, E. (2010). Cellulases, xylanases, β -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. Obtenido de Science Direct: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X10001348>
21. Guarnizo, A., Martínez, P., & Valencia, H. (2009). Pretratamientos de la celulosa y biomasa para la sacarificación. Pereira - Colombia: Scientia et

Technica Año XV, No 42. Obtenido de <http://recursosbiblioteca.utp.edu.co/dspace/bitstream/11059/684/3/celulosa%20y%20biomasa.pdf>

22. Guha, S., Ghosal, S., & Chattopadhyay, U. (1996). Antitumor, immunomodulatory and anti-HIV effect of mangiferin, a naturally occurring glucosylxanthone. Calcutta, India: Department of Tumor Immunobiology, Chittaranjan National Cancer Institute.
23. Hahn-Hagerdal, B., Galbe, M., Gorna-Grauslund, M., Liden, G., & Zacchi, G. (2006). Bioethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. Lund, Sweden: Lund University.
24. He, D., Bao, L., Long, Y., Wei, W., & Yao, S. (2000). A new study of the enzymatic hydrolysis of carboxymethylcellulose with a bulk acoustic wave sensor. Changsha, China: Hunan University.
25. Hendricks, A., & Zeeman, G. (2008). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. Obtenido de Bioresource Technology: https://www.researchgate.net/profile/Grietje_Zeeman/publication/5252683_Pretreatments_to_enhance_the_digestibility_of_lignocellulosic_biomass/links/547c47480cf2a961e489f463.pdf
26. Hubbell, C., & Ragauskas, A. (2010). Effect of acid-chlorite delignification on cellulose degree of polymerization. Obtenido de Bioresource Technology: http://www.bioenergycenter.org/besc/publications/hubbell_effect.pdf
27. López-Miranda, J., Soto-Cruz, N., Rutiaga-Quiñones, O., Medrano-Roldán, H., & Arévalo-Niño, K. (2009). Optimización del proceso de obtención enzimática de azúcares fermentables a partir de aserrín de pino. Mexico: Revista Internacional de Contaminación Ambiental 25 (2) 95-102. Obtenido de <http://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v25n2/v25n2a4.pdf>
28. Lqes. (S.F.). Biomassa oriunda de madeira e resíduos vegetais pode gerar biocombustível. Recuperado el 10 de Octubre del 2015, de Laboratorio de Química de Estado Sólido: http://lqes.iqm.unicamp.br/canal_cientifico/lqes_news/lqes_news_cit/lqes_news_2008/lqes_news_novidades_1224.html
29. Mc Millan, J. (1996). Conversion of hemicellulose hydrolyzates to ethanol. Handbook on fuel ethanol: production and utilization.
30. Mejia, L., Martínez, H., Betancourt, J., & Castrillon, E. (2007). Aprovechamiento del residuo agroindustrial del mango común (*Mangifera indica* L.) en la obtención de azúcares fermentables. Obtenido de Redalyc: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=83530603>
31. Méndez, R. (1995). Aprovechamiento de subproductos agropecuarios. Bogotá, Colombia: Universidad del Sur.

32. Narciso, V., & Daniela, G. (2007). Fermentables a partir de la celulosa contenida en desechos agrícolas o industriales, por medio de una hidrólisis enzimática. Venezuela: Universidad Central de Venezuela.
33. Ospina, S., Hernandez, E., & Lozano, C. (2012). Estudio experimental del proceso de fermentación de residuos agroindustriales del mango (*mangifera indica* L) usando *saccharomyces cerevisiae*. Colombia: Universidad Católica de Manizales. Obtenido de <http://repositorio.ucm.edu.co:8080/jspui/bitstream/handle/10839/230/Sandra%20Milena%20Ospina%20Henao.pdf?sequence=1>
34. Palmqvist, E., & Hahn-Hagerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. Obtenido de Science Direct: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852499001601>
35. Piñeros, Y., Amparo, G., Proaños, J., Cortes, W., & Ballesteros, I. (2011). Producción de azúcares fermentables por hidrólisis enzimática de cascarilla de arroz pretratada mediante explosión con vapor. Obtenido de SCIELO: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-100X2011000200004&script=sci_arttext
36. Politzer, K., & Bon, E. (2006). Enzimas industriais e especiais. . Rio de Janeiro, Brasil: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos.
37. Quizhpi, L. (2008). Obtención de etanol a partir de los residuos orgánicos de la sección de frutas del mercado mayorista de Riobamba. Riobamba, Ecuador: Escuela Superior Politecnica de Chimborazo.
38. Razo Avila, A. K. (2013). Determinación de la calidad fisicoquímica y bromatológica de la cáscara de mango manila (*Mangífera indica* L.) como alternativa de aprovechamiento.
39. Rodrigo, L., Garcia, I., Perez, R., Gutierrez, K., & Garcia, A. (2007). Obtencion de azucres fermentables a partir de inulinasas inmovilizadas por el metodo de sol-gel. *Investigacion Multidisciplinaria Universitaria*, 106-111.
40. Saka, S., & Ueno, T. (1999). Chemical conversion of various celluloses to glucose and its derivatives in supercritical water. Obtenido de Springer Link:
<http://link.springer.com/article/10.1023/A:1009232508644>
41. Salcedo J., López J.E., Pardo L.M. (2013) “Evaluación de enzimas para la hidrólisis de residuos (Hojas y cogollos) de cosecha de caña de azúcar”

42. Saliba, E., Rodriguez, N., Morais, S., & Veloso, D. (2001). Ligninas – Métodos de Obtenção e Caracterização Química. Obtenido de SCIELO: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v31n5/a31v31n5.pdf>
43. Silverstein et al. (2007). Los pequeños péptidos ricos en cisteína que se asemejan péptidos antimicrobianos han sido insuficientemente predicho en las plantas *The Plant Journal* 2007; 51: 262-280.
44. SánchezZ, G., Re, L., Giuliani, A., Nunez, A., Davison, G., & LEON, O. (2000). Protective effects of *Mangifera indica* L. extract, mangiferin and selected antioxidants against TPA-induced biomolecules oxidation and peritoneal macrophage activation in mice. La Habana, cuba: Havana University.
45. Sánchez, O., & cardona, C. (2007). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. Obtenido de SCIENCE DIRECT: https://www.researchgate.net/profile/Oscar_Sanchez25/publication/5691548_Trends_in_biotechnological_production_of_fuel_ethanol_from_diferent_feedstocks/links/551183c10cf270fd7e2fe5ed.pdf
46. Santino, M., Sciesere, L., & Bianchini, I. (2008). As Atividades das Enzimas na Decomposição da Matéria Orgânica Particulada em Ambientes Aquáticos Continentais. Obtenido de Dialnet: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2880831>
47. Santos, A. (2011). Produção, concentração e caracterização parcial de extrato celulolítico produzido por linhagem fúngica mutante – Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro, Brazil: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
48. Santos, I. (2008). Influência dos teores de lignina, holocelulose e extrativos na densidade básica, contração da madeira e nos rendimentos e densidade do carvão vegetal de cinco espécies lenhosas do cerrado. Brasília, Brasil: Universidade de Brasília.
49. Santos, R. (2010). Aproveitamento do Caroço do Açaí como Substrato para a Produção de Enzimas por Fermentação em Estado Sólido – Dissertação de Mestrado, . Brasil: Universidade Federal de São Carlos.
50. Saval, S. (2012). Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro. Mexico: UNAM.
51. Silva, D. (2006). Purificação e caracterização bioquímica de poligalacturonases produzidas pelo fungo *Penicilliumviridicatum* RFC3 em fermentação em estado sólido e submersa. Sao Paulo, Brasil: Universidade Estadual Paulista.

52. Soccol, C., Vandenberghe, L., Medeiros, A., Karp, S., Buckering, M., Ramos, L., . . . Torres, F. (2010). Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. Obtenido de Bioresource Technology: https://www.researchgate.net/profile/Fernando_Torres6/publication/40730246_Bioethanol_from_lignocelluloses_Status_and_perspectives_in_Brazil/links/00463526c7a6236599000000.pdf
53. Sulaiman, A., Ajit, A., Yunus, R., & Chisti, Y. (2010). Effects of ultrasound on enzymatic hydrolysis of soluble cellulose. Special Abstracts. Palmerston North, New Zealand: Massey University.
54. Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. Obtenido de Bio Resource Technology: <http://stl.bee.oregonstate.edu/courses/ethanol/restricted/SunCheng2002.pdf>
55. Taherzadeh, M., & Karimi, K. (2007). Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. Obtenido de Bio Resources: http://ojs.cnr.ncsu.edu/index.php/BioRes/article/view/BioRes_2_3_472_499_Taherzadeh_K_AcidHydrolysis_BioEthanol
56. Victoria Andrea Cortinez Villalobos (2010). comparación de pretratamientos en residuos forestales para la producción de bioetanol de segunda generación: hidrólisis ácida y líquidos iónicos.
57. Yepes, S., Montoya, L., & Orozco, F. (2008). Valorización de residuos agroindustriales – frutas – en Medellín y el sur del valle del Aburrá, Colombia. Medellín: Universidad Nacional de Colombia. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v61n1/a18v61n1.pdf>
58. Zuñiga, U. (2010). Desenvolvimento de um Bioprocesso para Produção de Celulases Específicas na Cadeia Produtiva do Bioetanol de Segunda Geração. Brasil: Universidade de São Paulo.
59. Yepes, Sandra Milena, Montoya Naranjo, Lina Johana, & Orozco Sánchez, Fernando. (2008). VALORIZACIÓN DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES - FRUTAS - EN MEDELLÍN Y EL SUR DEL VALLE DEL ABURRÁ, COLOMBIA. Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín, 61(1), 4422-4431. Retrieved June 17, 2017, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-28472008000100018&lng=en&tlng=.
60. P. Florián, C. León F. Villanueva & C. Bardales. (2015). Valor económico de los residuos lignocelulósicos de los principales cultivos agrícolas del valle Virú, La Libertad-Perú, 2014. Revista Araldoa 22 (1): 233 – 242.

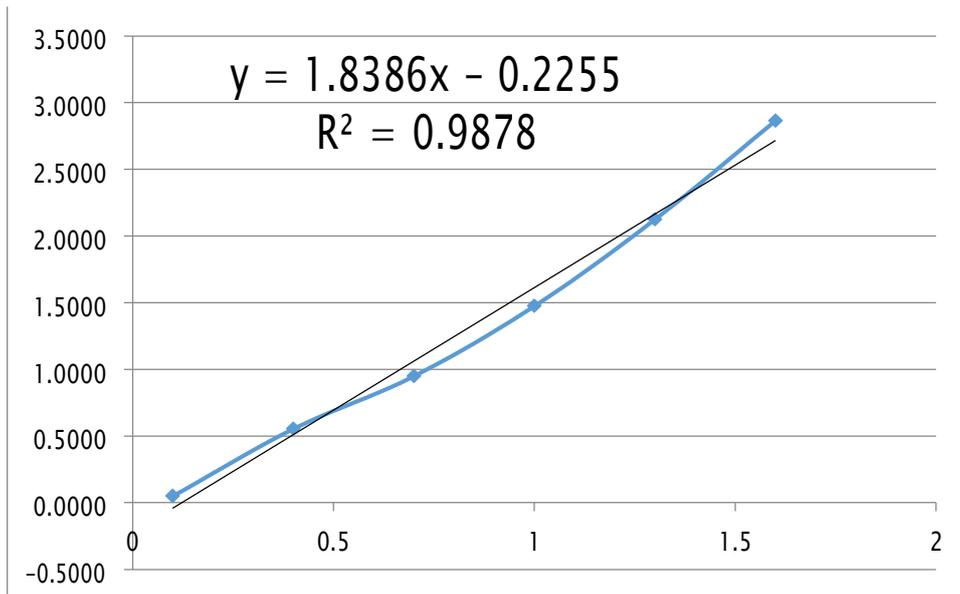
Universidad Privada Antenor Orrego. Perú.

Mejía L., Martínez H., Betancourt J, Castrillon C. 2007. Aprovechamiento del residuo agroindustrial del mango común(Mangifera indica L.) en la obtención de azúcares fermentables. Revista Ingeniería y Ciencia. Volumen 3, número 6, diciembre. Colombia.

ANEXO

Anexo 01

Curva patrón (calibrado) para del uso de espectrofotómetro



Anexo 02



Figura a: Acondicionamiento de la cascara de mango en bandejas para realizar el deshidratado.

Anexo 03



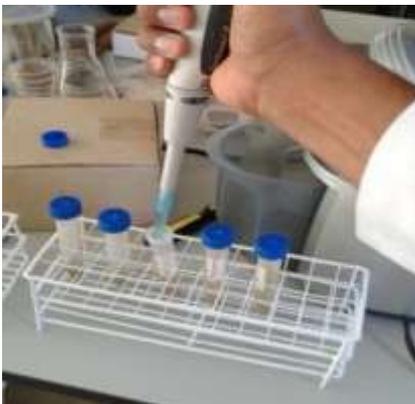
Deslignificación de la harina de cascara de mango con NAOH

Anexo 04



Determinación de humedad por estufa.

Anexo 05



Adicionando enzimas al sustrato.

Anexo 06



Muestras puestas en agitación dentro del shaker.

Anexo 07



Muestras terminadas después de la hidrolisis enzimática

Anexo 08



Muestras acondicionadas en envase de corcho con hielo gel para su conservación hasta realizar las lecturas de sus respectivas absorbancias.