

Valorización de residuos agroindustriales ricos en pectinas por fermentación

Valorization of Pectin-rich Agroindustrial Wastes by Fermentation

Dr.C. Manuel Serrat-Díaz, mserrat@cebi.uo.edu.cu; Lic. Cassamo Ussemame-Mussagy, MSc. Miladis Isabel Camacho-Pozo, MSc. Abelardo Allán Méndez-Hernández,

Dra. C. Rosa Catalina Bermúdez-Savón

Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba

Resumen

La búsqueda de alternativas biotecnológicas para el aprovechamiento integral de los residuales generados en el procesamiento agroindustrial del café y los frutos cítricos constituye una problemática actual. En el presente trabajo se evalúa la biotransformación de la pulpa de café y el mesocarpo de naranja, sometidos a fermentación en condiciones aerobias y anóxicas con la levadura pectinolítica *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011. Se encontró que pulpa de café aporta condiciones más favorables para el crecimiento de la levadura, reflejado en una mejor conversión de la fuente de carbono y energía. La levadura utilizó eficazmente los azúcares reductores y neutros de los sustratos en 24 h, tanto en cultivos aerobios como limitados de oxígeno. La excreción de la enzima endopoligalacturonasa por la levadura facilitó la extracción de las sustancias pécticas contenidas en la pulpa de café y el residual de naranja, produciendo incrementos del 225 % y 33 %, respectivamente, con respecto a las cantidades extraídas durante la esterilización de los sustratos. La producción de esta enzima por el microorganismo no presentó diferencias significativas con respecto al sustrato empleado, pero sí con respecto a la concentración de glucosa en el medio. Estos resultados apuntan al empleo promisorio de *K. marxianus* CCEBI 2011 en la valorización de residuales agrícolas ricos en pectinas a través de su conversión en fuentes potenciales de estimuladores vegetales y prebióticos basados en oligogalacturonidos.

Palabras clave: *kluyveromyces marxianus*, levadura pectinolítica, pulpa de café, mesocarpo de naranja, valorización de residuos.

Abstract

The search of the biotechnological ways to the integral use of the wastes generated by the coffee and citric agroindustries, is a current problem. The biotransformation of coffee pulp and orange mesocarp during aerobic and anoxic fermentation with the pectinolytic yeast *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 was studied in this research. It was found that coffee pulp is a better substrate to yeast growth, which was evidenced throughout a better conversion of the carbon and energy source. The yeast used in 24 h the reducing and neutral sugars from substrates efficiently, either under aerobic or oxygen-limited cultures. The excretion of the polygalacturonase enzyme by the yeast lead to the increasing in the pectic substances extraction, which reached the 225 % and 33 % for coffee pulp and orange mesocarp, respectively,

compared with the amounts which were extracted during substrates sterilization. The enzyme production by the microorganism presented not significantly differences in relation to the substrate used, but the contrary occurred with respect to glucose concentration in the medium. These results point to the promissory use of the *K. marxianus* CCEBI 2011 yeast strain in the valorization of pectin-rich agricultural wastes by means of their conversion in potential plant elicitors and prebiotics oligogalacturonides-based.

Keywords: *kluveromyces marxianus*, pectinolytic yeast, coffee pulp, orange mesocarp, wastes valorization.

Introducción

Una problemática actual con respecto a la conservación medioambiental radica en cómo otorgarle utilidad a los residuos ocasionados por la actividad industrial y social del hombre. Actualmente, los procesos de reciclaje de desechos constituyen una vía muy utilizada para paliar las consecuencias ambientales derivadas del vertimiento incontrolado de estos al medio ambiente. Sin embargo, estos métodos no siempre pueden ser aplicados, sobre todo en el caso de los subproductos y residuos generados por la agricultura y el procesamiento industrial de los productos agrícolas, debido a muchas peculiaridades inherentes a estos, como su heterogeneidad, dispersión en espacio y tiempo y alto contenido de humedad, fundamentalmente.

En la provincia Santiago de Cuba, los procesos agroindustriales de beneficiado del café y los cítricos generan considerables volúmenes de desechos sólidos, caracterizados por un alto poder contaminante como consecuencia de su elevado contenido de humedad y azúcares fermentables. Estos desechos representan una fracción importante en peso con respecto al fruto beneficiado, que llega a ser de aproximadamente el 40 % o más. Ambos residuales comparten también como características, su alto contenido en pectinas y su escaso o nulo aprovechamiento /1/.

La pulpa del café, debido a su composición química, presenta potencialidades para ser empleada como materia prima en la obtención de biogás, alimento animal y como sustrato en la producción de setas comestibles. Estas tecnologías permiten utilizarla como subproducto, eliminar la contaminación y, a su vez, generar beneficios en el orden económico, social y ambiental /2/.

Para el mucílago y las aguas de lavado del café la digestión anaerobia para la obtención de biogás parece ser la opción más atractiva /3/.

La corteza y hollejos de naranja, constituyen subproductos que también resultan interesantes desde el punto de vista de la posibilidad de explotarlos comercialmente. Ejemplos de lo antes señalado son la extracción de aceites esenciales de la corteza externa o flavedo y la obtención de pectina del mesocarpo (hollejos o albedo), ambos productos de interés alimentario y farmacéutico y con elevados precios de comercialización /4, 5/.

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la biotransformación de la pulpa de café y el mesocarpo de naranja, cuando son sometidos a fermentación en condiciones aerobias y anaerobias con la levadura pectinolítica *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011, atendiendo principalmente a aquellos aspectos relevantes desde el punto de vista de su aprovechamiento, valorización y disminución de su impacto ambiental, como son la producción de la enzima endopoligalacturonasa, la extracción de las sustancias pécticas y la disminución del contenido de azúcares fermentables.

Materiales y métodos

Diseño experimental

Se utilizaron las siguientes variables y niveles:

- Sustratos ricos en pectina: Pulpa de café (P) y mesocarpo de naranja (M).
- Oxigenación de los cultivos/Concentración de la fuente de carbono:
- Cultivos estáticos (glucosa 20 g/L y 100 g/L).
- Cultivos agitados (glucosa 20 g/L).

Como invariantes de los experimentos se consideraron las siguientes:

- Microorganismo: Se empleó la cepa de levadura *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011, suministrada y conservada por la Colección de Cultivos del CEBI, Universidad de Oriente.
- Inóculo: Se utilizó una suspensión de la levadura en agua destilada a razón del 0,2 % (v/v).

- Medio de cultivo base: Se trabajó con un medio mineral suplementado con extracto de levadura y conteniendo glucosa como fuente de carbono y energía. La composición del medio, en gramos por litro, fue la siguiente: extracto de levadura 5, cloruro de calcio dihidratado 0,1, sulfato de magnesio heptahidratado 0,5, hidrógenofosfato de potasio 5 y sulfato de amonio 5, pH 5; glucosa 20 ó 100, según el experimento.
- Concentración del sustrato: 1% (m/v) base seca.
- Temperatura: 32 °C.
- Tiempo de fermentación: 24 h.

Se utilizaron dos réplicas por cada variante y dos controles sin inocular.

Propagación del inóculo

La levadura se propagó en frascos cónicos de 250 mL de capacidad, conteniendo 100 mL de medio YPD (extracto de levadura 1 %, peptona 2 %, glucosa 2 %) durante 18 h. Se tomaron entonces 30 mL del cultivo, se centrifugaron (5000 rpm, durante 5 min) y se desechó el sobrenadante. La biomasa se resuspendió en 6 mL de agua destilada estéril, quedando así cinco veces más concentrada que en el cultivo de propagación.

Fermentación

Los ensayos de fermentación se efectuaron en frascos cónicos de 100 mL conteniendo 75 mL (cultivos estáticos) o 25 mL (cultivos agitados) del medio de cultivo basal, a los cuales se añadió el sustrato correspondiente. Los frascos se inocularon e incubaron por 24 h a 32 °C.

Procesamiento de los cultivos

Después de 24 h de fermentación, los cultivos se homogenizaron, se tomaron 10 mL de la suspensión y se centrifugaron a 3000 rpm por 30 min a 4°C. Se llevó el sobrenadante a tubos termorresistentes provistos de tapa con cierre hermético y el sedimento se lavó dos veces con 5 mL de agua destilada, se resuspendió y se homogenizó en 5 mL de agua destilada. Se tomaron tres alícuotas de 1 mL de esta suspensión para la realización del conteo celular. Todos los cultivos se conservaron en congelación (-20 °C).

Determinación de la concentración de biomasa microbiana

La concentración de biomasa se determinó mediante conteo directo al microscopio óptico (400X) utilizando una cámara de conteo celular Füchs-Rosenthal (altura capilar de 0.2 mm y 1/16 mm² de área del cuadrante). La concentración celular (en cél/mL) se convirtió a concentración másica multiplicando por el factor de conversión 1,41x10⁻⁹ mg/cel, determinado experimentalmente en el laboratorio.

Cálculo del rendimiento microbiano

Se calculó según la siguiente expresión:

$$Y \frac{x}{s} = \frac{x}{S_i - S_f}$$

donde

x: biomasa formada

S_i: concentración inicial de azúcares reductores

S_f: concentración final de azúcares reductores

Métodos analíticos

Se utilizaron los siguientes métodos:

- Determinación de azúcares reductores: Método de Somogyi-Nelson /6/.
- Determinación de ácidos urónicos: Ensayo del carbazol /7/.
- Determinación de azúcares neutros: Ensayo de la antrona /8/.

Determinación de la actividad enzimática poligalacturonasa

Previo a la determinación de la actividad enzimática, el sobrenadante de los cultivos conteniendo la enzima se clarificó mediante precipitación con etanol. Para ello se utilizó 1 mL del sobrenadante del cultivo, se enfrió en baño de hielo y se precipitó con tres volúmenes de etanol absoluto helado. Se homogenizó rápidamente por inversión y se incubó en hielo nuevamente por espacio de 10 minutos. Se centrifugó durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante, el precipitado se lavó dos veces con etanol absoluto helado y por último se disolvió en 4 mL de buffer acetato 50 mM (pH 5). Se conservó en congelación (aproximadamente -10 °C).

Como sustrato para el ensayo enzimático se utilizó ácido poligalacturónico (Sigma) a $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, en tampón acetato de sodio 50 mM (pH 5). La mezcla de reacción estuvo conformada de 0,1 mL de la enzima y 0,4 mL de sustrato, para un volumen total de 0,5 mL. La reacción se desarrolló por espacio de 10 min a 37 °C. La actividad enzimática se estimó de la pendiente de la recta de regresión correspondiente a la curva de avance de la reacción enzimática, dada como concentración de extremos reductores vs. Tiempo de reacción. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que cataliza el incremento del poder reductor de la mezcla de reacción en $1 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$, expresado como ácido galacturónico, bajo las condiciones de ensayo especificadas.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con ayuda del paquete estadístico Statgraphics Centurion XV (Stat Point, Inc., USA).

Resultados y discusión

Comportamiento del crecimiento microbiano durante la fermentación de la pulpa de café y el mesocarpo de naranja

El crecimiento microbiano es un elemento fundamental a considerar en un proceso fermentativo ya que, como consecuencia de él, tiene lugar las transformaciones bioquímicas del sustrato debido a la actividad metabólica de las células microbianas. Este proceso puede ser caracterizado por dos parámetros básicos: uno relacionado con la velocidad a que tiene lugar, que es la velocidad específica de crecimiento (μ) y otro relacionado con la estequiometría del proceso, o sea, con la eficacia en que es aprovechado el contenido energético del sustrato, que es el rendimiento de crecimiento o rendimiento biomasa/sustrato ($Y_{x/s}$).

La concentración celular y de biomasa a las 24 h de fermentación fue menor en el residual pulpa de café para los cultivos estáticos (anóxicos), independientemente de la concentración de glucosa inicial en el medio de cultivo (20 ó 100 g/L), no siendo así para el caso de los cultivos agitados, donde la concentración de biomasa fue significativamente superior en los medios con pulpa de café (tabla 1). Esto sugiere una mayor velocidad de crecimiento de la levadura, en condiciones de oxigenación y en presencia de

pulpa de café, lo cual se corresponde con el metabolismo preferentemente respiratorio de la especie *Kluyveromyces marxianus* /9/ y al origen de la cepa utilizada en este estudio, la cual fue aislada de residuales del beneficio húmedo del café, mediante enriquecimiento en presencia de un extracto de pulpa de café /10/.

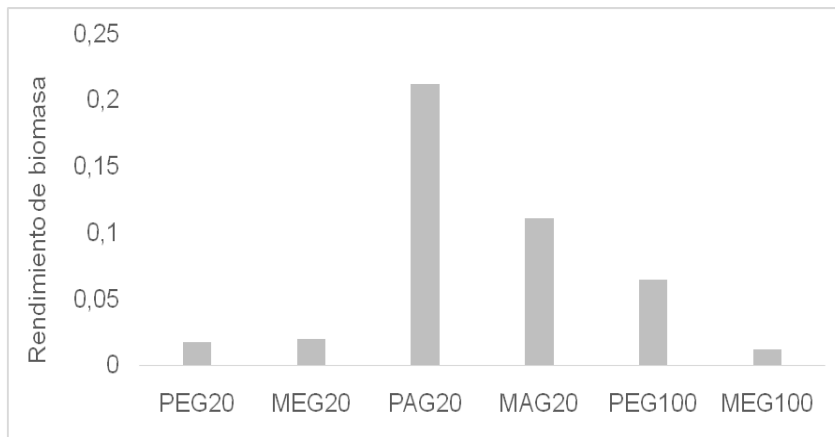


Figura 1. Rendimiento de biomasa en cultivos agitados (A) y estáticos (E) con mesocarpio de naranja (M) y pulpa de café (P) a concentraciones de glucosa(G) de 20 g/L y 100 g/L

Tabla 1

Concentración celular y de biomasa en los diferentes medios de fermentación

Cultivos	Conc. Celular (cel/mL)	Conc. Biomasa (mg/ml)
PA-G20	$2,62 \times 10^9$	3,69
+		
MA-G20	$2,13 \times 10^9$	3,00
PE-G20	$2,11 \times 10^8$	0,30
ME-G20	$3,80 \times 10^8$	0,54
PE-G100	$3,58 \times 10^8$	0,51
ME-G100	$5,70 \times 10^8$	0,80

Para los cultivos estáticos o anóxicos, se obtuvo un menor crecimiento en los medios donde la concentración de glucosa fue de 20 g/L, comparado a los de 100 g/L, en correspondencia con la mayor disponibilidad de la fuente de carbono y energía el medio de cultivo. Este resultado indica que la levadura tolera bien concentraciones de etanol del orden del 4 % (v/v)

(considerando un 40 % de rendimiento alcohólico), sin inhibición apreciable del crecimiento. Serrat y col. /11/ plantearon la posibilidad de producir concomitantemente alcohol enzima poligalacturonasa con esta levadura, utilizando concentraciones de glucosa de 100 g/L.

Según puede observarse en la figura 1, los cultivos agitados presentan un mayor rendimiento de biomasa, alrededor de 10 veces mayor que el de los cultivos estáticos. Esto se corresponde con la mayor eficiencia energética de los procesos respiratorios con respecto a los fermentativos. Sin embargo, resulta notable que para el caso de los cultivos estáticos en presencia de pulpa de café como sustrato, el rendimiento de biomasa aumenta casi cuatro veces cuando la concentración de glucosa inicial se incrementa de 20 a 100 g/L. Aunque en primera instancia resulta difícil explicar este comportamiento, debido a los múltiples factores que pueden estar implicados, podría suponerse la acumulación intracelular de compuestos energéticos de almacenamiento (p.e, glicógeno) ante el exceso de fuente de carbono y la limitación de fuente de nitrógeno /12/ o de sustancias intracelulares con efecto protector, como la trehalosa, ante el incremento de la concentración de etanol en el medio /13/.

Cambios en la composición de azúcares solubles en los medios de fermentación

La concentración de azúcares reductores inicial en los cultivos fue, aproximadamente, un 50 % superior en los medios conteniendo mesocarpo de naranja con respecto a los que contenían pulpa de café (ver figuras 2 y 3). Este incremento es causado por la extracción de azúcares solubles presentes en el mesocarpo durante el proceso de esterilización, lo cual se corresponde con el elevado contenido de azúcares en este material /4/. Entre estos azúcares que contribuyen al incremento del poder reductor se encuentran la glucosa y la fructosa, presentes en cantidades importantes /4/; también las sustancias pécticas aportan al incremento del poder reductor, aunque en menor grado debido a su elevado grado de polimerización. En todos los cultivos donde la concentración de glucosa fue de 20 g/L, independientemente del nivel de oxigenación, se produjo un consumo casi total de los azúcares reductores inicialmente presentes (figuras 2 y 3). Estos azúcares, constituidos por la

glucosa presente en el medio basal y los azúcares incorporados al medio por los sustratos, son utilizados por el microorganismo como fuente de carbono y energía para su crecimiento. Este resultado es importante, desde el punto de vista práctico, pues nos indica la eficacia de proceso fermentativo conducido por *K. marxianus* CCEBI 2011, que en apenas 24 h agotó la fuente de carbono presente en el medio del cultivo. Esto también se traduce en un impacto ambiental mucho menor de los sustratos fermentados, debido a su bajo contenido de azúcares potencialmente fermentables.

En la figura 2 se presenta la concentración de azúcares reductores y neutros en cultivos con pulpa de café (P) y mesocarpo de naranja (M) a concentraciones de glucosa (G) de 20g/L en cultivos agitados (A) y estáticos (E).

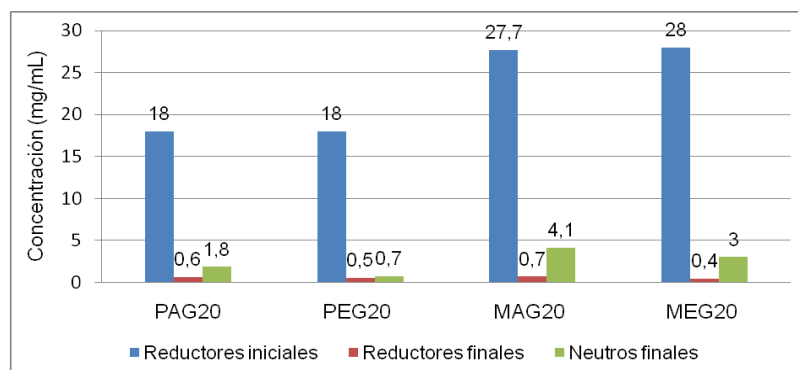


Figura 2. Concentración de azúcares reductores y neutros en cultivos con pulpa de café (P) y mesocarpo de naranja (M)

En la figura 3 se presenta la concentración de azúcares reductores y neutros en cultivos con pulpa de café (P) y mesocarpo de naranja (M) a concentraciones de glucosa (G) de 100g/L en cultivos agitados (A) y estáticos (E).

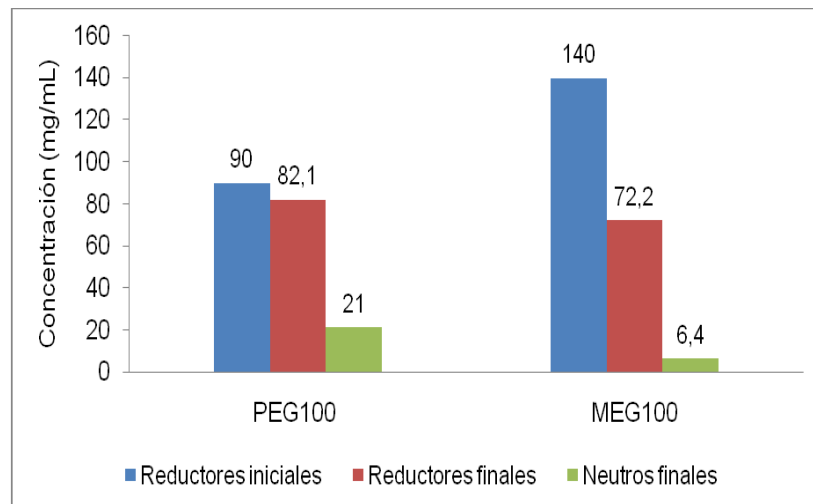


Figura 3. Concentración de azúcares reductores y neutros en cultivos con pulpa de café (P) y mesocarpio de naranja (M)

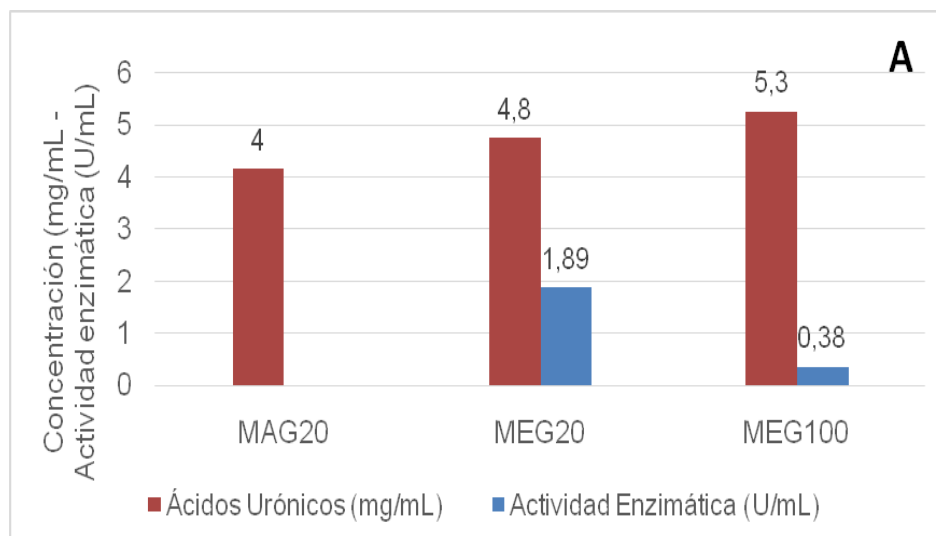
En los cultivos donde está presente el residual de naranja y la concentración de glucosa inicial fue de 20 g/L, se apreció un menor consumo de azúcares y, por ende, la existencia de una mayor cantidad de azúcares neutros residuales con respecto a los medios conteniendo pulpa de café (ver figura 2). Este hecho sugiere la existencia, en el mesocarpio de naranja, de azúcares neutros no asimilables por esta cepa de levadura. El contenido de azúcares neutros residuales fue siempre mayor en los cultivos agitados que en los estáticos, lo que pudiera estar asociado a la síntesis de alguna enzima glucohidrolasa (por ejemplo, endoglucanasas) por la levadura, capaz de hidrolizar los polisacáridos estructurales de los sustratos. En levaduras del género **Kluyveromyces** ha sido descrita la síntesis de β -(1,3)-glucanasas /14/ e inulinasas /15/, entre otras.

En el caso de los cultivos estáticos, donde la concentración de glucosa inicial fue de 100 g/L, se apreció un mayor consumo aparente de azúcares reductores y neutros en los medios con mesocarpio de naranja con respecto a los que contenían pulpa de café (figura 3). Este resultado, aparentemente contradictorio con lo observado en los cultivos agitados y en los cultivos estáticos, cuando la concentración de glucosa fue de 20 g/L, podrían ser el resultado de la acción hidrolítica de la poligalacturonasa de la levadura, la cual solo se produce en condiciones de anoxia y en proporción directa con las concentraciones de glucosa en el medio /10/.

Se conoce también que esta enzima actúa preferentemente sobre pectinas de bajo grado de esterificación /10/, como es el caso de la pectina de café /16/; de modo, que el elevado contenido de azúcares reductores al final de la fermentación pudiera atribuirse, fundamentalmente, a la existencia de oligómeros pécticos (oligogalacturónidos) en el medio, extraídos de la matriz del sustrato. En tanto, el mayor contenido de azúcares neutros residuales observado en los medios con pulpa de café, se corresponde muy bien con el menor crecimiento de la levadura en este medio (tabla 1). El sustrato pulpa de café se caracteriza por presentar determinados factores de inhibición del crecimiento microbiano, como la cafeína y el ácido cafeico /17/.

Influencia de los sustratos pulpa de café y mesocarpo de naranja en la producción de endopoligalacturonasa y en la extracción de sustancias pécticas

Uno de los productos biotecnológicos de mayor significación que puede obtenerse con la levaduras *K. marxianus* CCEBI 2011 es la enzima endopoligalacturonasa /18/. En este estudio se evalúan las potencialidades de los residuales pulpa de café y mesocarpo de naranja como sustratos para la producción de esta enzima, lo cual resulta de gran interés práctico, por constituir una vía para la valorización de estos residuos. En este estudio se consideró solamente a los cultivos estáticos (anóxicos), pues la levadura *K. marxianus* CCEBI 2011 solo produce la enzima endopoligalacturonasa en ausencia de oxígeno /10/.



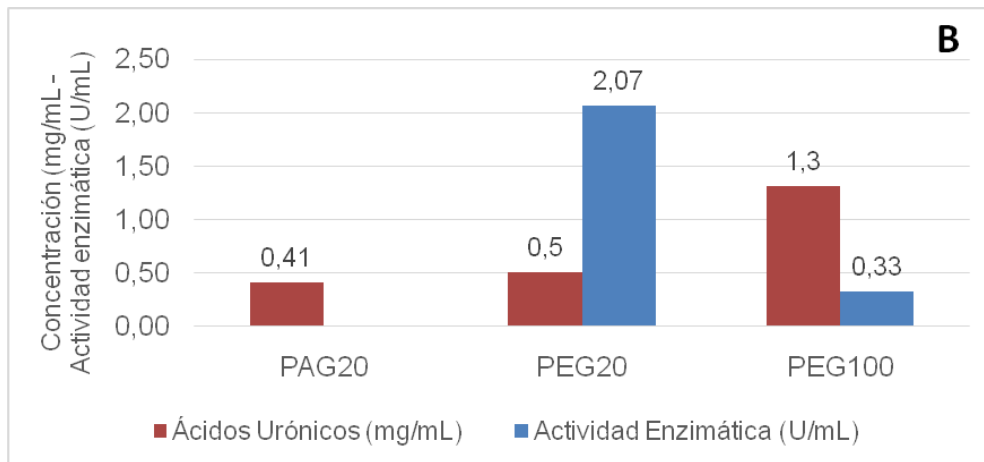


Figura 4. Concentración de sustancias pécticas (como ácidos urónicos totales) y actividad enzimática poligalacturonasa en la fracción líquida de los cultivos

Como puede observarse en la figura 4 (A y B), la producción de la enzima por la levadura, para ambos sustratos, fue mayor cuando la concentración inicial de glucosa fue de 20 g/L, no existiendo diferencia significativas ($p < 0,05$) entre los sustratos. Estos resultados no están en concordancia con el carácter *pseudoconstitutivo* de la síntesis de esta enzima por esta cepa de levadura /10/. Si se tiene en cuenta la complejidad que le confiere al sistema la introducción de sustratos de naturaleza química compleja, como son la pulpa de café y el mesocarpo de naranja, podría suponerse la existencia de factores inhibitorios o inactivantes sobre la enzima producida.

La concentración de sustancias pécticas, expresada como ácidos urónicos totales, fue significativamente mayor en los medios que contienen el residual de naranja con respecto a los que se formularon con la pulpa de café (figura 4, A y B). Esto guarda una estrecha relación con la composición informada para estos sustratos /16, 19/, donde al mesocarpo de naranja corresponde una mayor concentración de pectina, lo cual es la base de su empleo como una de las materias primas principales en la obtención de este polisacárido a escala comercial. El microorganismo utilizado en este estudio no consume pectinas ni su monómero, el ácido galacturónico /10/, por lo que los valores observados son el resultado del aporte de cada uno de los sustratos al medio.

En los cultivos estáticos se observó un mayor acumulado de sustancias pécticas que en los cultivos agitados, siendo superior cuando la concentración de glucosa fue de 100 g/L. Esto se relaciona con el hecho de que en los cultivos limitados de oxígeno, la levadura excreta la enzima endopoligalacturonasa, siendo mayores los acumulados de enzima a medida que se incrementa la concentración de glucosa en el medio. Es decir, el incremento observado en el contenido de sustancias pécticas en los cultivos estáticos puede atribuirse al rol desempeñado por las enzimas pécticas en la extracción de las pectinas presentes en los sustratos. Debe destacarse que se logran incrementos en el contenido de sustancias pécticas del 33 % (mesocarpo de naranja) y 225 % (pulpa de café) en los cultivos estáticos con respecto a los agitados, como consecuencia de la acción de enzima endopoligalacturonasa. La menor extracción de pectinas en el residual de naranja se corresponde con la naturaleza altamente esterificada de estas pectinas /10/.

Conclusiones

- 1. Se demuestra la factibilidad del empleo de las fermentaciones aerobia o anóxica, con la levadura pectinolítica *K. marxianus* CCEBI 2011, como alternativa para la valorización de dos residuos agroindustriales ricos en pectina y de gran impacto ambiental: la pulpa de café y el mesocarpo de naranja.**
- 2. La pulpa de café aporta condiciones más favorables para el crecimiento de la levadura, lo cual se refleja en una mejor conversión de la fuente de carbono y energía en biomasa.**
- 3. En ambos sustratos se logra un consumo eficaz de los azúcares reductores y neutros del medio de cultivo en 24 h, tanto en cultivos aerobios como limitados de oxígeno. Bajo condiciones anóxicas se logra producir la enzima endopoligalacturonasa, incrementándose la extracción de sustancias pécticas de los residuos sólidos en un 225 y 33 %, para la pulpa de café y el residual de naranja, respectivamente.**

- 4. Los caldos fermentados, ricos en levadura, enzima poligalacturonasa y sustancias pécticas, en forma de oligómeros pécticos, poseen un gran atractivo desde el punto de vista de sus potenciales aplicaciones en el sector agropecuario, como estimuladores del crecimiento vegetal y en la formulación de prebióticos para la alimentación animal.**

Bibliografía

1. GARCÍA, N. Producción de Setas Comestibles *Pleurotus ostreatus* sobre Subproductos del Café y del Cacao. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba. 1999.
2. BERMÚDEZ, R. C., GARCÍA, N., GROSS, P., SERRANO, M. "Cultivation of *Pleurotus* on agricultural substrates in Cuba". *Micología Aplicada Internacional*. 2001, 13, 1, 25–29.
3. RODRÍGUEZ, S., PÉREZ, M., FERNÁNDEZ, M. "Estudio de la biodegradabilidad de las aguas de residuales del beneficio húmedo del café". *Interciencia*. 2000, 25, 8, 386-390.
4. ALBÁN, D. Y., FREIRE, D. Obtención de Bioetanol a partir de Residuos de Naranja "*Citrus sinensis*" Provenientes del Proceso Agroindustrial en la Provincia de Bolívar. Informe Técnico de Proyecto de Investigación. Escuela Politécnica del Ejército, Quito, Ecuador. 2009.
5. SAVAL, S. "Aprovechamiento de residuos agroindustriales: Pasado, presente y futuro". *BioTecnología*. 2012, 16, 2, 14-46.
6. SOMOGYI, M. "Notes on sugar determination". *J. Biol. Chem.* 1952, 195, 19–23.
7. BITTER, T., MUIR, H. M. *Analytical Biochemistry*. 1962, 4, 330.
8. HODGE, J. D., HOFREITER, B. T. *Methods Carbohydr. Chem.* 1962, 1, 380.
9. LANE, M., MORRISSEY, J. "*Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow". *Fungal Biology Reviews*. 2010, 24, 1, 7–26.
10. SERRAT, M., BERMÚDEZ, R. C., VILLA, T. G. "Production, purification and characterization of a polygalacturonase from a new strain of *Kluyveromyces marxianus* isolated from coffee wet-processing wastewater". *App Biochem. Biotech.* 2002, 97, 193-208.
11. SERRAT, M., BERMÚDEZ, R. C., VILLA, T. G. "Polygalacturonase and ethanol production in *Kluyveromyces marxianus*: Potential use of polygalacturonase in foodstuffs. *App.Biochem. Biotech.* 2004, 117, 49–64.
12. BARRERA, I. C. Modelación Metabólica de Compuestos de Reserva de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis Doctoral. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología–Instituto Politécnico Nacional, México, D. F. 2010.

13. PATARO C., GUERRA, J. B., GOMES, F. C. O., NEVES, M. J., PATRÍCIA, F., PIMENTEL, P. F., ROSA, C. A. "Trehalose accumulation, invertase activity and physiological characteristics of yeasts isolated from 24 h fermentative cycles during the production of artisanal brazilian cachaça". *Braz. J. Microbiol.* 2002, 33, 3, 202-208.
14. LOPES, M., DE SOUZA, C., RODRIGUES, M., COSTA, D., DOS SANTOS, A., DE OLIVEIRA, L., RAMOS, H., GUIMARAES, V., SILVEIRA, W., PASSOS, F., FIETTO, L. "Production and characterization of β -glucanase secreted by the yeast *Kluyveromyces marxianus*". *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 2014, 172, 5, 2412–2424.
15. SILVA, M., RIGO, D., MOSSI, V., GOLUNSKI, S., KUHN, G. D. E. O., DI LUCCIO, M., DALLAGO, R., DE OLIVEIRA, D., OLIVEIRA, J. Y., TREICHEL, H. "Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides by inulinases from *Aspergillus niger* and *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 in aqueous-organic medium". *Food Chemistry.* 2013. 138, 1, 148–153.
16. GARCÍA, R., ARRIOLA, D., DE ARRIOLA, C., DE PORRES, E. Y., ROLZ, C. "Characterization of coffee pectin". *Lebensm. –Wiss. u. – Technol.* 1991, 24, 125-129.
17. SERRAT, M. Potencialidades de las Levaduras en el Aprovechamiento de los Residuales del Café. Tesis de Maestría. Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba. 1998.
18. RODRIGUÉZ, O., SERRAT, M. "Poligalacturonasas de levaduras: un producto biotecnológico de grandes potencialidades". *Tecnología Química.* 2008, 28, 1, 80-90.
19. DEVIA, J. E. "Proceso para producir pectinas cítricas". *Revista Universidad EAFIT.* 2003, 129, 21-29.