

## Artículo original

# Optimización de un medio de cultivo para la producción de biomasa de *Nocardia* sp. a partir de residuos de naranja como sustrato

Judith Piñero-Bonilla<sup>a,\*</sup>, Isabel Díaz<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Bioprocesos, Ingeniería de Alimentos, Núcleo Canoabo. Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez, estado Carabobo, Venezuela. <sup>b</sup>Facultad de Ingeniería Núcleo Cagua. Universidad Central de Venezuela, estado Aragua, Venezuela.

Recibido 11 de julio de 2010; aceptado 16 de diciembre de 2010

**Resumen:** Se evaluó el rendimiento en la producción de biomasa de *Nocardia* sp. EP3-MC3 a partir de la fermentación sumergida de los residuos de naranja (RN), empleando la metodología de superficie de respuesta (MSR) para establecer las condiciones óptimas del proceso. Se utilizó un diseño compuesto central ortogonal con tres variables: concentración de sustrato, tiempo y temperatura de fermentación, para estimar un modelo polinomial de segundo orden a partir de 17 tratamientos; la región de exploración para ajustar el modelo fue 70-150 g/l de RN, 24-60 horas de fermentación y 30-50 °C de incubación de los medios de cultivo. Los RN poseen mayor cantidad de carbohidratos potencialmente fermentables (65,8%). Con la MSR se determinaron las siguientes condiciones óptimas del proceso fermentativo: pH 6,5, 100 rpm, 30,4 °C, 59,30 h y 71,6 g/l de RN, bajo las cuales se estimó 4,5 g/l de biomasa, superior al valor observado (2,83 g/l), lo que sugiere la presencia de factores inhibidores en el medio de crecimiento. El contenido proteico fue alto (31%) pero su digestibilidad baja (59%). Se concluyó que la producción de biomasa microbiana es factible bajo las condiciones obtenidas, sin embargo, debe ser pre-tratada para aumentar su digestibilidad.

**Palabras clave:** Biomasa, fermentación sumergida, *Nocardia*, optimización, residuos de naranja

## Optimization of a culture medium for *Nocardia* sp. biomass production with orange residues as a substrate

**Abstract:** The yield of *Nocardia* sp. EP3-MC3 biomass production, from submerged fermentation of orange residues (OR) using the answer surface method (ASM), was evaluated for establishing the optimal conditions of the process. A central orthogonal composed design, with three variables was used: substrate concentration, fermentation time, and temperature, to estimate a second order polynomial model starting from 17 treatments; the exploration region for adjusting the model was 70-150 g/l of OR, 24-60 fermentation hours, and 30-50°C for incubation of culture media. The OR contain a greater amount of potentially fermentable carbohydrates (65.8%). With ASM we determined the optimal conditions of the fermentation process: pH 6.5, 100 rpm, 30.4°C, 59.30 h and 71.6/l of OR, under which there was an estimate of 4.5 g/l of biomass, higher than the observed value (2.83 g/l), which suggests the presence of inhibiting factors in the growth medium. The protein content was high (31%), but its digestibility low (59%). It was concluded that microbial biomass production is possible under the conditions used; nevertheless, it should be treated to increase its digestibility.

**Keywords:** Biomass, submerged fermentation, *Nocardia*, optimization, orange residues

\* Correspondencia:  
E-mail: unescanoabo@gmail.com

### Introducción

El género *Nocardia* comprende bacterias filamentosas abundantes en la naturaleza, las cuales son muy importantes debido a su capacidad para producir compuestos bioactivos y enzimas hidrolíticas de importancia industrial [1,2]; intervienen en reacciones degradativas de compuestos orgánicos (naturales y xenobióticos) que las convierten

en microorganismos potencialmente útiles en los procesos de compostaje y biorrecuperación de suelos y aguas [3-7]. Sin embargo, no se han reportado estudios de producción de biomasa por *Nocardia* como fuente alimenticia para animales, pero sí para otros actinomicetos empleando residuos celulósicos [8-10].

Con el objetivo de buscar fuentes proteicas alternativas, se aisló una cepa celulolítica de *Nocardia* sp., empleando

sustratos de celulosa pura como fuente de carbono y energía para su nutrición [11]. Posteriormente, esta cepa se cultivó en residuos de naranjas bajo la modalidad de fermentación sumergida, para evaluar su rendimiento en la producción de biomasa, empleando la metodología de superficie de respuesta como técnica para la optimización de los procesos fermentativos. Se seleccionaron los residuos de la naranja por ser uno de los más abundantes en el occidente del estado Carabobo (Venezuela), destinados al consumo animal directo, lo que representa la oportunidad para estudiar alternativas que mejoren su calidad (digestibilidad y contenido proteico) y amplíen el espectro de animales alimentados además de los rumiantes, que se puedan alimentar con los subproductos derivados.

## Materiales y Métodos

**Microorganismos:** Se empleó un actinomiceto celulolítico, aislado a partir de estiércol de pollo e identificado como *Nocardia* sp. cepa EP3-MC3 [11], perteneciente a la colección de microorganismos del Laboratorio de Bioprocesos de Ingeniería de Alimentos de la Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez. La cepa tipo está depositada en el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM1314) del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela [12], fue conservada en cuñas de agar con polvo de celulosa CF1 como fuente de energía y carbono, suplementado con macro y micronutrientes, bajo refrigeración a 4°C.

**Medios de cultivo:** Se utilizó el medio de cultivo empleado por Mohagheghi *et al.* [13] con modificaciones, el cual contenía en g/L: 0,5 extracto de levadura; 1,0  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,2  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,6 urea; 0,1  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,2  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y como sustrato, extracto de los residuos de naranja (RN), cuya concentración varió según el tipo de tratamiento que se describe en los siguientes apartados. Los medios de conservación en cuñas tenían los mismos componentes y en la misma proporción, adicionándoles 25 g/L de agar y 10 g/L de polvo de celulosa CF1 como sustrato.

**Preparación del sustrato:** Los residuos de naranja consistentes en flavedo, albedo, semillas y membranas de las vesículas jugosas, se deshidrataron en una estufa a 60°C hasta obtener peso constante. Posteriormente, se molieron y se tamizaron para obtener una harina con tamaño de partícula entre 106 - 425  $\mu\text{m}$ . Los distintos tratamientos se realizaron usando extractos de los RN los cuales se prepararon mezclando la harina con agua destilada, mediante agitación magnética durante 30 min. La suspensión se filtró, recuperando el filtrado (extracto) y descartando el retenido. Estos extractos se suplementaron con los macro y micronutrientes ya descritos para constituir los medios de cultivo.

**Preparación del medio precultivo (MPC):** Este medio se utilizó en cada ensayo para propagar la cepa y como

inóculo en los diferentes tratamientos. Estos medios se prepararon en Erlenmeyers de 500 mL de capacidad en los cuales se añadió 100 mL de medio de cultivo con 30 g/L de RN suplementado con los macro y micronutrientes ya descritos. El pH de los medios se ajustó a  $6,20 \pm 0,05$ . Se esterilizaron en el autoclave a 120°C, 15 psi, durante 15 min., y posteriormente se dejaron enfriar antes de su inoculación. Los MPC se inocularon con 10 mL de fragmentos de la cepa conservada en cuñas, suspendidos en medio salino mediante agitación en el vortex y se incubaron sin agitación a 45°C, durante 72 h.

**Preparación de los medios de fermentación (MF):** Los medios de fermentación corresponden a aquellos en los cuales se llevó a cabo la evaluación de los diferentes tratamientos de crecimiento de la cepa. La fermentación de los RN cuya concentración según el tratamiento fue 30, 65 y 100 g/L, se realizó en Erlenmeyers de 250 ml de capacidad que contenían 50 mL de medio; el pH se ajustó también para cada tratamiento (5,0; 6,5 y 8,0) y se esterilizaron a 120°C, a 15 psi durante 15 min. Posteriormente, se dejaron enfriar antes de su inoculación. Cada uno de los medios de fermentación se inoculó con 5 mL del MPC.

**Optimización de las condiciones de cultivo empleando la Metodología de Superficie de Respuesta:** La optimización de los medios de cultivo se llevó a cabo utilizando la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) y el análisis estadístico se realizó con el programa SYSTAT 7.0. Las fases a seguir fueron las siguientes:

a) Definición de variables: Las variables independientes fueron pH, temperatura, concentración de sustrato, agitación de los medios y tiempo de fermentación. La región de exploración de estas variables se indica en la tabla 1, cuyo criterio de selección se basó en trabajos previos realizados con esta cepa, que mostraron mayor producción de biomasa a pH 5 y 40-45°C en fermentación sumergida, empleando fuentes de celulosa pura [11]; otros resultados no publicados de optimización de un medio de cultivo en fermentación sumergida por métodos tradicionales, dieron mayor cantidad de biomasa a 30 g/L de RN y 200 rpm a las 48 h de incubación.

Se trabajó con un diseño factorial fraccionado  $2^{k-1}$  que permitió estimar un modelo de primer orden para verificar la significancia de las variables consideradas en la

Tabla 1. Codificación de los niveles de las variables

Variables	Niveles		
	-1	0	+1
$x_1$ = temperatura (°C)	35	45	55
$x_2$ = tiempo (h)	24	60	96
$x_3$ = concentración de sustrato (g/l)	30	65	100
$x_4$ = pH	5	6,5	8
$x_5$ = agitación de los medios	0	100	200

concentración de biomasa:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_5x_5$$

Y = variable dependiente que representa la concentración de biomasa microbiana

$b_0$  = valor promedio de Y en ausencia del efecto de las variables  $x_1, x_2, x_3, x_4, x_5$ .

$b_1, b_2, b_3, b_4, b_5$  = coeficientes que indican la razón de cambio de  $x_1, x_2, x_3, x_4, x_5$ , respectivamente, sobre Y.

Se contemplaron 19 tratamientos: 16 corresponden al factorial fraccionado  $2^{5-1}$  con niveles -1, +1, y tres réplicas del punto central (0).

b) Producción de biomasa: Se prepararon 12 Erlenmeyers de 250 mL de capacidad, conteniendo cada uno 50 mL del medio de cultivo. Los valores de la concentración de los residuos de naranja, ajuste de pH, temperatura de incubación, grado de agitación de los medios y tiempo de fermentación empleados, fueron aquellos que resultaron óptimos para la producción de biomasa microbiana, en la metodología de superficie de respuesta. Finalizada la fermentación, se centrifugaron los caldos de cultivo y se recuperó el sobrenadante para la determinación del pH y del contenido de glucosa residual. El sedimento se deshidrató en estufa para recuperar la biomasa destinada a la determinación de contenido y digestibilidad proteica.

c) Determinaciones analíticas: *Análisis de los residuos de naranja*. A la harina se le determinó la composición bromatológica (humedad, proteínas, grasa, carbohidratos, cenizas) [14], composición estructural (celulosa, hemicelulosa, lignina) [15] y taninos [16], empleando métodos estándares en el Laboratorio de Nutrición del INIA, en Maracay edo. Aragua. El fósforo se analizó mediante el método colorimétrico de Fiske y Subbarow [17] y para el resto de los minerales se empleó la absorción atómica [14]. Los análisis bromatológicos y de taninos se hicieron por duplicado, y los estructurales por triplicado, los cuales se presentaron como promedio en base seca. El análisis mineral se hizo por duplicado y los resultados se expresaron en base húmeda.

*Determinación de biomasa microbiana*. El contenido de cada Erlenmeyer fue centrifugado a 5.000 rpm durante 30 min. El sedimento, consistente en la biomasa microbiana, se lavó con agua destilada y se centrifugó nuevamente, descartando el sobrenadante y deshidratando la biomasa hasta peso seco, según el método de Isson y Mathew [18].

*Determinación de glucosa*. Al sobrenadante se le midió el pH y se le determinó el contenido de glucosa colorimétricamente utilizando el kit enzimático Glicemia, basado en el método de Trinder [19].

*Determinación del contenido y digestibilidad proteica*. A la biomasa deshidratada se le determinó la cantidad de proteína bruta empleando el método de Weende de la Asociación Oficial de Analistas Químicos (Association of Official Analytical Chemists, AOAC) [14] y la digestibilidad proteica utilizando el método pepsina-HCl de Tilley y Terry [20]. Ambos análisis se realizaron por duplicado, expresando los resultados como promedio con su respectiva desviación estándar, en base húmeda.

## Resultados y discusión

*Nocardia* sp. EP3-MC3 fue aislada de estiércol de pollos mediante métodos convencionales de enriquecimiento y aislamiento sobre sustratos de celulosa pura [11]. Esta cepa no ha sido estudiada sobre sustratos complejos de origen vegetal o animal; este es el primer estudio exploratorio para determinar el potencial metabólico de la cepa al crecer sobre residuos de naranja.

*Análisis de la composición química de los residuos de la naranja*: Como se observa en la tabla 2, estos residuos fueron principalmente lignocelulósicos, con presencia de celulosa en mayor cantidad y con bajo contenido de grasas y proteínas. El bajo contenido de lignina favorece la conversión microbiana, ya que este componente es el más resistente a la degradación enzimática.

Tabla 2. Composición química de los residuos de naranja.

Análisis bromatológico (%)	
Humedad	11,92 ± 0,01
Ceniza	2,71 ± 0,26
Fibra	12,68 ± 0,01
Grasa	1,42 ± 0,04
Proteína	5,95 ± 0,0
Nitrógeno	0,95 ± 0,0
ELN	65,83 ± 0,93
Análisis estructural (%)	
Fibra detergente neutro (FDN)	23,7 ± 0,08
Fibra detergente ácido (FDA)	19,11 ± 0,56
Lignina	3,57 ± 0,36
Celulosa	15,55 ± 0,46
Hemicelulosa	4,59 ± 0,59
Análisis mineral	
Ca (%)	0,53 ± 0,01
P (%)	0,09 ± 0,01
Mg (%)	0,06 ± 0,00
Na (%)	0,72 ± 0,04
K (%)	0,06 ± 0,01
Fe (ppm)	110,00 ± 20,36
Cu (ppm)	2,60 ± 0,00
Mn (ppm)	3,90 ± 0,00
Zn (ppm)	92,15 ± 0,21
Análisis de taninos (%)	
Taninos condensados expresados como leucocianidina equivalente	0,048 ± 0,0

El extracto libre de nitrógeno (ELN), con valores superiores al 60%, contiene gran variedad de compuestos tales como azúcares simples (glucosa, manosa, xilosa, ramnosa, galactosa, arabinosa) y pectinas que constituyen fuentes de carbono y energía potencialmente fermentables [21]. Las pruebas bioquímicas y fisiológicas realizadas a otras especies de *Nocardia*, indican que todas utilizan la glucosa, algunas la ramnosa, muy pocas la sacarosa y galactosa, y ninguna la arabinosa [22]. Debido a la importancia de la glucosa como azúcar fermentable, se analizó su contenido en los diferentes ensayos de fermentación realizados.

Dada la naturaleza del sustrato y por determinaciones previas que mostraron el alto contenido de componentes fermentables solubles, como es el caso de la glucosa, que son potencialmente aprovechados prioritariamente por la cepa de *Nocardia* EP3-MC3, se decidió evaluar el crecimiento de la misma, utilizando el extracto rico en azúcares solubles obtenido de la harina de los residuos de naranja, suplementados con sales minerales y extracto de levadura.

*Optimización de las condiciones de cultivo empleando la Metodología de Superficie de Respuesta:* Se aplicó la MSR para obtener las condiciones óptimas del proceso, mediante la estimación y estudio de un modelo polinomial de segundo orden que se desarrolló en dos fases:

*Búsqueda I.* El análisis de resultados indicó que el pH y la agitación de los medios no afectaron significativamente la concentración de biomasa microbiana, a diferencia de la concentración de sustrato, la temperatura y el tiempo de fermentación. El coeficiente de regresión arrojó un valor muy bajo ( $R^2 = 0,632$ ), indicando que el 63% de la producción de biomasa obtenida se debió a la combinación de las variables seleccionadas, lo que puede ser indicativo de la existencia de factores que no se consideraron o de los valores elegidos en el rango de exploración. El modelo de primer orden obtenido fue el siguiente:

$$Y = 1,335 - 1,181X_1 + 0,488X_2 + 0,931X_3 - 0,105X_4 + 0,217X_5$$

El valor absoluto de los coeficientes de cada variable reflejó la importancia que tiene la misma en cuanto a su efecto en la producción de biomasa, y sugirió además la magnitud del cambio que se debe hacer en la búsqueda de la optimización en la variable respectiva. En este caso, la temperatura tiene un efecto muy marcado en el crecimiento microbiano ( $p = 0,004$ ), seguida por la concentración de sustrato ( $p = 0,016$ ), y el tiempo de fermentación ( $p = 0,173$ ). Sin embargo, el signo de cada coeficiente indica la forma como la variable influye en el proceso fermentativo y orienta los ajustes a realizar en los próximos experimentos, es decir, si la temperatura tiene un signo negativo, debe disminuirse en las siguientes evaluaciones, mientras que la concentración de sustrato y el tiempo de incubación con signo positivo deben aumentarse.

Como no se obtuvieron diferencias significativas en las variables pH y agitación de los medios, se seleccionaron, para la siguiente fase de experimentación, los valores 6,5

y 100 rpm, respectivamente, con nuevos valores en el rango de exploración para la concentración de sustrato, la temperatura y tiempo de fermentación.

*Búsqueda II.* Para obtener un modelo polinomial más satisfactorio, que describiera la respuesta de interés (contenido de biomasa), se utilizó posteriormente un diseño compuesto central ortogonal con tres variables: concentración de sustrato, tiempo y temperatura de fermentación, para estimar un modelo polinomial de segundo orden, a partir de 17 tratamientos, distribuidos de la siguiente forma: 8 tratamientos que corresponden a un factorial  $2^3$  con niveles -1,1; 6 puntos estrellas con niveles de  $\alpha \pm 1,3531$  y 3 réplicas del punto central (Tabla 3).

Tabla 3. Codificación de los niveles de las variables para el diseño de optimización

Variables	Niveles				
	-1,3531	-1	0	+1	+1,3531
$x_1$ = temperatura (°C)	30	32,61	40	47,34	50
$x_2$ = tiempo (h)	24	28,7	42	55,3	60
$x_3$ = concentración de sustrato (g/l)	70	80,44	110	139,56	150

Los coeficientes de este modelo se estimaron mediante regresión lineal:

$$Y = 0,341 - 0,267X_1 + 0,485X_2 - 0,551X_3 - 0,276X_1X_2 + 0,437X_1X_3 - 0,355X_2X_3 - 0,315X_1^2 + 0,302X_2^2 + 0,390X_3^2$$

La exploración dentro de este nuevo rango de valores, indicó que el 80% ( $R^2 = 0,80$ ) de la producción de biomasa microbiana se debió a la combinación de las variables seleccionadas. Aún cuando se obtiene un aumento en comparación con el modelo de primer orden, existen condiciones que no se han considerado para lograr un mayor incremento en el valor de la respuesta.

El tiempo ( $p = 0,042$ ) y la concentración de sustrato ( $p = 0,026$ ) tienen mayor influencia en la producción de biomasa microbiana, así como la interacción de los factores concentración de sustrato-temperatura ( $p = 0,106$ ) y concentración de sustrato-tiempo ( $p = 0,175$ ); la interacción temperatura-tiempo influye poco ( $p = 0,279$ ). Sin embargo, aquellas variables o combinación de ellas con signo negativo, indican valores altos que ejercen una influencia desfavorable en el aumento de la biomasa microbiana por lo que es recomendable su reducción, especialmente en la concentración de los RN y la temperatura de incubación.

Independientemente de su significancia, la producción de biomasa fue máxima a 32,6°C, aumentando con el tiempo y mostrando un mayor incremento a partir de las 55 h; a mayor concentración de sustrato, menor es la respuesta, siendo máxima a 70 g/L, disminuyendo rápidamente hasta los 80,44 g/L, lo que puede estar relacionado con un aumento en los componentes tóxicos o inhibitorios del crecimiento microbiano.

En la figura 1 se observan los tipos de superficie que

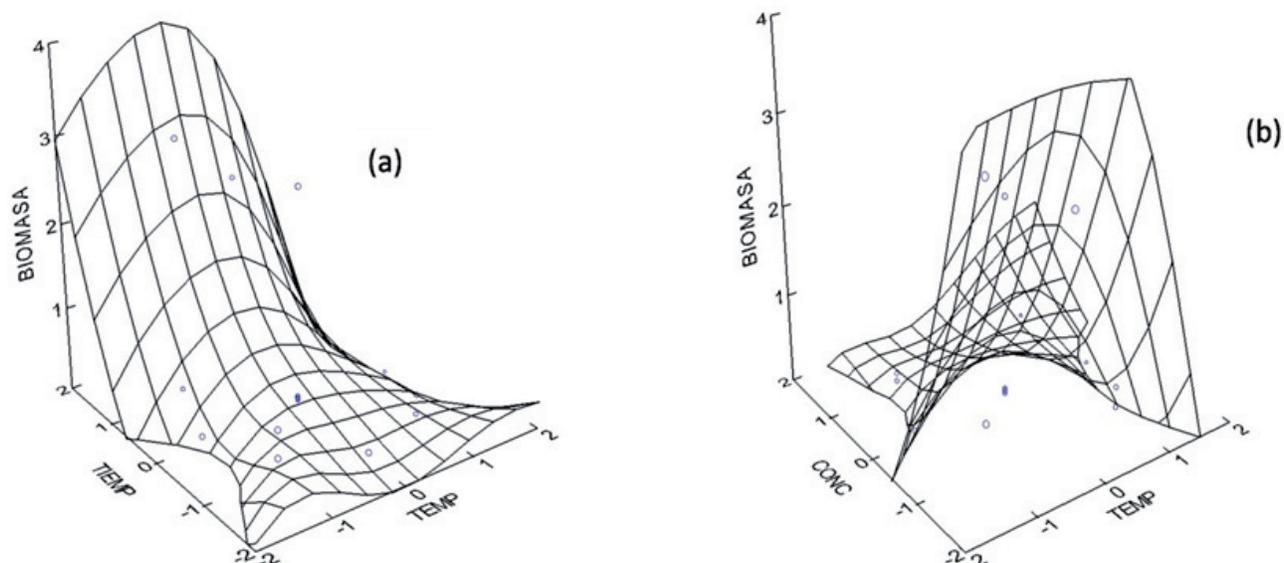


Figura 1. Tipos de superficie de respuesta para la producción de biomasa microbiana de *Nocardia* sp EP3-MC3 (g/l), en el medio de cultivo según el diseño compuesto central ortogonal, obtenidos de la interacción de los factores (a) temperatura (°C) – tiempo (h) (punto de loma) y (b) concentración de sustrato (g/l) – temperatura (°C) (punto de silla). Rango de exploración ( $\alpha \pm 1,3531$ ): 30-50 °C, 24-60 horas y 70-150 g/l de RN.

resultaron de la interacción de los factores temperatura-tiempo y concentración de sustrato-temperatura, los cuales se corresponden a un punto de loma y punto de silla, respectivamente.

La última fase consistió en explorar la superficie descrita por el modelo ajustado para encontrar la combinación de niveles en los factores que dan por resultado una mayor producción de biomasa microbiana. Para esto se utilizó como técnica de optimización el análisis Ridge. Este análisis optimiza el proceso cuando se obtiene un punto de silla, explorando alrededor del punto central y evaluando la existencia de valores de concentración de sustrato, temperatura y tiempo de fermentación que aumenten el valor de la biomasa a varias distancias de dicho punto.

El punto crítico se encontró a 40,7°C, 35,2 horas y 122,44 g/L de RN, con una producción de biomasa de 0,0882 g/L, en el cual se evidenció un punto de silla. En dicho punto el crecimiento microbiano es bastante bajo, por lo que se aplicó un análisis apropiado para lograr una mejor respuesta, iniciando nuevamente el estudio a partir del punto central. La mayor concentración de biomasa estimada fue de 4,48 g/l y se obtuvo a valores de 30,4°C, 59,30 h de fermentación y 71,57 g/L de residuos de naranja.

**Contenido y digestibilidad proteica:** Bajo las condiciones óptimas determinadas con el MSR, la producción de biomasa microbiana obtenida fue inferior a la estimada ( $2,82 \pm 0,28$  g/L); aún cuando su contenido proteico fue alto ( $31,02 \pm 0,59\%$ ), la digestibilidad fue baja ( $59,12 \pm 3,58\%$ ). Es posible que existan factores inhibidores del crecimiento microbiano a altas concentraciones de los RN. Se sabe que los terpenos procedentes de los cítricos reducen la actividad de los microorganismos aun en pequeñas concentraciones

[23].

La información disponible sobre enriquecimiento de residuos agroindustriales con proteína de actinomicetos u otros microorganismos, no permite establecer una comparación adecuada ya que los sustratos y las condiciones de fermentación utilizados son diferentes en cada investigación. Sin embargo, independientemente de estos factores, bajo las condiciones de crecimiento de *Nocardia*, se alcanzaron valores de proteína parecidos a los obtenidos para el actinomiceto *Thermomonospora fusca* (30-35%), en 96 h de fermentación de residuos sulfatados de la industria papelera [8]; para la levadura *Debaryomyces hansenii* se obtuvo 33% de proteína en 24 h de fermentación de cáscaras de mandarina, maceradas enzimáticamente para aumentar la cantidad de azúcares fermentables [24]. Por otro lado, el enriquecimiento proteico de la levadura *Candida* sp., a partir de la fermentación de residuos de la naranja suplementados con nitrato de amonio y glucosa, fue de 8,7 % [25].

El rendimiento en biomasa para *Nocardia* fue de  $0,64 \pm 0,07$  g de células/g de glucosa consumida, el cual es más cercano a aquellos obtenidos para *D. hansenii* (0,69 g de células/g de azúcares reductores) y *Rhodotorula glutinis* (0,70 g de células/g de azúcares reductores) crecidas en cáscaras de mandarina predigeridas enzimáticamente [24].

No se han reportado resultados directos de la digestibilidad proteica en el caso de *T. fusca*, sin embargo, los valores de ganancia en peso de pollos alimentados con la proteína de este microorganismo, sugieren buena digestibilidad [8]. Ginnivan *et al.* presentaron resultados de digestibilidad proteica cuyos valores fueron más altos a menor concentración de las heces porcinas (10%) expresados en peso seco para los actinomicetos *T. fusca*, *T. curvata* y *Pseudonocardia*

*thermophila* (19,5, 18,6 y 17,8 %, respectivamente) [9]. El porcentaje de digestibilidad de *Nocardia* es superior al obtenido para estas tres especies, pero entra en el rango de los valores obtenidos en el producto final enriquecido con *Aspergillus niger* (50-70%) mediante fermentación en estado sólido de residuos cítricos [26].

Desde el punto de vista de la alimentación animal, la baja digestibilidad hace poco aprovechable la proteína microbiana. La digestibilidad depende del grosor y composición de la pared celular. Todos los microorganismos poseen paredes celulares que le dan rigidez y resistencia a la célula, esto significa también que son resistentes a la degradación enzimática (hidrólisis por proteasas digestivas). Una alternativa que podría mejorar la digestibilidad proteica de esta cepa microbiana sería su molienda, para romper la pared celular y hacer su contenido proteico más accesible a la hidrólisis enzimática.

### Conclusiones

Los residuos de naranja son sustratos potencialmente fermentables debido a su alta composición en azúcares y bajo contenido de componentes muy recalcitrantes (lignina y hemicelulosa); por lo tanto, es factible enriquecer los residuos de la naranja con biomasa de *Nocardia* sp. cepa EP3-MC3, mediante la utilización de los azúcares fermentables presentes en los mismos. El máximo enriquecimiento con proteína microbiana estimado por el MSR se obtuvo a pH 6,5, 100 rpm, 30,4 °C, 59,30 h y 71,6 g/l de RN. Sin embargo, ésta debe ser pre-tratada para aumentar su digestibilidad, la cual es muy baja (59%). Los valores de biomasa microbiana alcanzados pueden convertir este residuo en un alimento potencial para animales, pero deben realizarse estudios para evaluar la toxicidad y la cinética de producción proteica empleando la fracción sólida de dicho residuo. Los resultados también sugieren una aplicación potencial de los inóculos en el mejoramiento de la eficiencia de las plantas de tratamiento de efluentes de las industrias procesadoras de cítricos.

### Agradecimientos

Esta investigación formó parte de tres proyectos (S1-99-007, S1-03-007 y S4 de Fortalecimiento de Grupo) financiados por el Centro de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez (UNESR) y de la Oficina de Planificación del Sector Universitario (OPSU). Agradecemos al personal técnico y docente del Laboratorio de Microbiología, Planta Piloto y muy especialmente a los docentes del Laboratorio de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de Ingeniería de Alimentos de la UNESR por su gran colaboración.

### Referencias

1. Wilson DB. Biochemistry and genetics of actinomycete cellulases. Crit Rev Biotechnol. 1992; 12:45-63.
2. Theilleux J. Los actinomicetos. En: Leveau JY, Bouix M, Editores. Microbiología Industrial. Zaragoza: Acribia, S.A. 2000. pp. 416-78.
3. Roy S, Hens D, Biswas D, Kumar R. Survey of petroleum-degrading bacteria in coastal waters of Sunderban Biosphere Reserve. World J Microbiol Biotechnol. 2002; 18:575-81.
4. Baek KH, Kim HS, Moon SH, Lee IS, Oh HM, Yoon BD. Effects of soil types on the biodegradation of crude oil by *Nocardia* sp. H17-1. J Microbiol Biotechnol. 2004; 14:901-5.
5. Ruan RC, Ju DJ. Bio-degradation of pristane in mixed alkanes by a mixed culture containing *Nocardia corynebacteroides*. J Chin Inst Chem Eng. 2004; 35:651-8.
6. Zhang P, Sheng GY, Wolf DC, Feng YC. Reduced biodegradation of benzonitrile in soil containing wheat-residue-derived ash. J Environ Qual. 2004; 33:868-72.
7. Pirog TP, Shevchuk TA, Voloshina IN, Gregirchak NN. Use of claydite-immobilized oil-oxidizing microbial cells for purification of water from oil. Appl Biochem Microbiol. 2005; 41:51-5.
8. Crawford DL, McCoy E, Harbin JM, Jones P. Production of microbial protein from waste cellulose by *Thermomonospora fusca*, a thermophilic actinomycete. Biotechnol Bioeng 1973; 15:833-43.
9. Ginnivan MJ, Woods JL, O'Callaghan JR. Thermophilic fermentation of pig faeces and straw by actinomycetes. J Appl Bacteriol. 1977; 43:231-8.
10. Humphrey AE, Moreira A, Armiger W, Zabriskie D. Production of single cell protein from cellulose wastes. Biotechnol Bioeng Symp. 1977; 7:45-67.
11. Piñero J, Rivas N. Aislamiento y caracterización de una cepa de actinomiceto celulolítico, termófilo moderado y acidófilo. Revista Científica FCV-LUZ. 2004; 14:412-8.
12. Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCVM). Catálogo 2006. 6° ed. Caracas: Ediciones del CVCVM; 2006.
13. Mohagheghi A, Groshmann K, Himmel M, Leighton L, Updegraff DM. Isolation and characterization of *Acidothermus cellulolyticus* gen. nov., sp., a new genus of thermophilic, acidophilic, cellulolytic bacteria. Int J Syst Bacteriol. 1986; 36:435-43.
14. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official Methods of Analysis. 17° ed. Washington, D.C., USA. 2000.
15. Van Soest PJ, Wine RH. Uses of detergent in the analysis of fibrous feeds. J Off Agric Chem. 1967; 50:50-5.
16. Porter LJ, Hrstich I.N, Chan B. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyaniding and delphinidin. Phytochem. 1986; 25: 223-7.
17. Fiske H, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorous. J Biol Chem. 1925; 66:375-400.
18. Isson AP, Mathew GB. Measurement of biomass. En: Rhodes PM, Stanbury PF, Editores. Applied Microbiology and Physiology. The Practical Approach Series England: IRL Press. Oxford University Press. 1997. pp 103-29.
19. Trinder P. Standard methods for clinical chemistry. Determination of glucosa blood using glucosa oxidase with an alternative oxygen acceptor. Ann Clin Biochem. 1969; 6:24-7.
20. Tilley JM, Ferry RA. A two-stage technique for the "in vitro" digestion of forage crops. J Br Grassland Soc. 1963; 18:104-11.

21. Cohn R, Cohn AL. Subproductos del procesado de frutas. En: Arthey D, Ashurst PR, Editores. Procesado de frutas. Zaragoza: Acribia, S.A. 1997. pp. 213-39.
22. Serrano JA, Sandoval AH. Identificación y diagnóstico de actinomicetales patógenos. Mérida. Publicaciones del Vicerrectorado Académico ULA. Colección Ciencias de la Salud; 2005.
23. Sampaio RM, Kawai S, Chacón D. 2007. Estudio de la biotransformación del D-limoneno por fermentación en fase líquida. Disponible en: [http://dpi.eq.ufrj.br/ciaiq\\_22/CD/formCrCongreso/papers/13<sup>a</sup>/13<sup>a</sup>\\_50/pdf](http://dpi.eq.ufrj.br/ciaiq_22/CD/formCrCongreso/papers/13<sup>a</sup>/13<sup>a</sup>_50/pdf). Acceso: 19 de abril 2008.
24. Nishio N, Nagai S. Single cell protein production from mandarin orange peel. Appl Microbiol Biotechnol. 1981; 11:156-60.
25. Adoki A. Factors affecting yeast growth and protein yield production from orange, plantain and banana wastes processing residues using *Candida* sp. African J Biotechnol. 2008; 7:290-5.
26. Oficina Cubana de la Propiedad Industrial. Procedimiento para la fermentación en estado sólido de residuo cítrico. CU 21639 A1. Cuba. 1991.