

# Hidrólisis enzimática de residuos agroindustriales del banano para la obtención de jarabe glucosado aplicando tres pretratamientos

RECIBIDO: 21/01/15 ACEPTADO: 02/02/15

HUGO ROMERO BONILLA\*  
 OSCAR TINOCO GÓMEZ\*\*  
 KERLY DÁVILA DÁVILA\*\*\*

## RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue comparar tres pretratamientos (molienda; molienda + hidróxido de sodio al 1%, y molienda + proceso hidrotérmico) aplicados a cáscara de banano maduro (sustrato) y su efecto en la obtención de jarabe glucosado mediante hidrólisis enzimática con el hongo *Trichoderma reesei*. Se prepararon 27 medios de cultivos en diferentes concentraciones de cáscara de banano maduro (40%, 50% y 60%), factor A; sometidas a los tres pretratamientos antes señalados, factor B. La biomasa obtenida fue inoculada con conidias del hongo *Trichoderma reesei* en una concentración de 0.2; 0.4 y 0.6 g/L, factor C, dando un experimento factorial 3x3x3. Adicionalmente, se evaluó la variación de estos factores en el tiempo (cuatro factores). Se realizó la incubación por 144 horas a temperatura ambiente y pH 4.2-5. Se midió la concentración de glucosa presente en el hidrolizado utilizando el método del DNS (ácido di nitrosalísilico) en un espectrofotómetro UV visible a 540 nm. El tratamiento que produjo mayor concentración de glucosa, fue T18 (molienda más hidróxido de sodio-60% de cáscara de banano maduro-0.6 g/L de hongo) al cabo de seis días de hidrólisis enzimática, con 5.91 g/L de glucosa, seguido de 4.15 g/L de T27 (molienda más calentamiento-60% de cáscara de banano maduro-0.6 g/L de hongo) y 3.95 g/L de T9 (molienda -60% de cáscara de banano maduro-0.6 g/L de hongo) obtenidos durante el mismo tiempo de experimentación.

**Palabras clave:** cáscara de banano maduro, hidrólisis enzimática, jarabe glucosado, pretratamientos

ENZYMATIC HYDROLYSIS OF BANANA AGRO-INDUSTRIAL WASTE TO OBTAIN A GLUCOSE SYRUP USING THREE PRETREATMENTS

## ABSTRACT

The aim of this study was to compare three pretreatments (grinding, grinding + sodium hydroxide + 1%, and grinding + hydrothermal process) applied to peel ripe bananas (substrate) and its effect on the production of dextrose syrup by enzymatic hydrolysis the fungus *Trichoderma reesei*. Twenty seven cultures were prepared in different concentrations peel ripe bananas (40%, 50% and 60%), factor A, subject to the three afore mentioned pretreatments, factor B. The biomass obtained was inoculated with conidia of the fungus *Trichoderma reesei* in a concentration of 0.2; 0.4 and 0.6 g/L, factor C, giving a 3x3x3 factorial experiment. Additionally, variation in these factors in time (four factors) was valued. Six days (144 hours) incubation at pH 4.2 - 5 was performed at room temperature. The glucose concentration in the hydrolyzate was measured using the DNS method (di nitrosalísilic acid) in a UV visible spectrophotometer at 540 nm. The treatment produced a higher concentration of glucose, was T18 (sodium hydroxide milling plus - 60% ripe banana peel - 0.6 g/L yeast) six days after enzymatic hydrolysis with 5.91 g/L glucose, followed by 4.15 g/L T27 (more heating - milling 60% of ripe banana peel - 0.6 g/L of yeast) and 3.95 g/L of T9 (60% shell grinding banana mature - 0.6 g/L of fungus) during the same time of experimentation.

**Keywords:** dextrose syrup, enzymatic hydrolysis pretreatment, ripe banana peel

## 1. INTRODUCCIÓN

Los desechos agroindustriales son materiales de gran importancia en la industria alimenticia, pues, con la aplicación apropiada de tecnologías alternativas, son capaces de generar subproductos como jarabes azucarados que se utilizan en la obtención de otros productos económicamente factibles como el bioetanol.

La Provincia de El Oro, posee grandes extensiones de tierras agrícolas dedicadas al monocultivo de banano, donde las frutas "rechazadas" que no cumplen los indicadores de calidad (longitud, diámetro, índice de madurez, etc.) para su exportación son aprovechadas de diversas maneras. Uno de los destinos de esta materia prima es la empresa CONFOCO S.A. que tiene su Planta de Procesamiento ubicada en la Parroquia La Peaña en el cantón Pasaje de la Provincia de El Oro, donde se obtienen entre otros productos harina (flake) y puré de banano, que genera alrededor de 315 toneladas métricas por semana de cáscara de banano maduro

Actualmente es mínimo el aprovechamiento de los desechos orgánicos en la industria del banano, por lo que, el destino final de la cáscara, origina además de la contaminación del suelo, problemas tales como: plagas, malos olores y contaminación de las fuentes de agua. Existen procesos químico-biológicos para obtener glucosa a partir de residuos celulósicos, con relativa rentabilidad para su aplicación industrial. En Ecuador, como en otros países, existen residuos celulósicos abundantes, como la cáscara de banano y otros, ricos en celulosa.

Uno de estos procesos es la hidrólisis enzimática, la cual está causando importantes beneficios en la industria alimentaria por los efectos fisicoquímicos u organolépticos que produce, tales como la disminución de la viscosidad, mejora de la filtrabilidad, disminución de la tendencia a la cristalización, clarificación y estabilización de los líquidos con vistas a su conservación, insolubilización de macromoléculas por formación de coágulos, mejora en la fermentabilidad, mejora de la estabilidad bacteriológica entre otros.

\* Centro de Investigaciones Químicas y Tecnológicas, Universidad Técnica de Machala, Machala, Ecuador. E-mail: hromero@utmachala.edu.ec

\*\* Facultad de Ingeniería Industrial, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. E-mail: otinocog@gmail.com

\*\*\* Centro de Investigaciones Químicas y Tecnológicas, Universidad Técnica de Machala, Machala, Ecuador. E-mail: kdavilad@utmachala.edu.ec

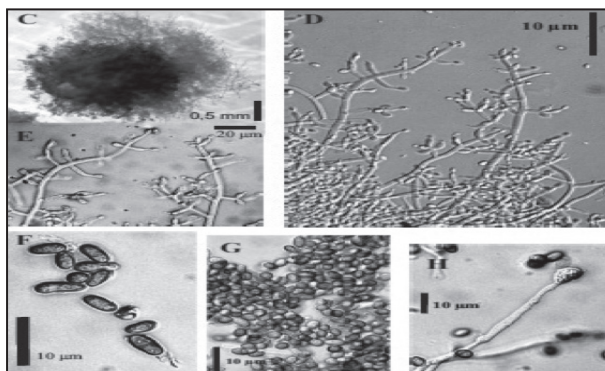
**Figura 1.** Cáscaras de banano maduro que se generan el proceso de deshidratación de la fruta.



Fuente: Elaboración propia.

El método consiste en hidrolizar mediante enzimas (celulasas y hemicelulasas) la celulosa y hemicelulosa presente en la cáscara de banano para transformarla en glucosa, mediante la utilización del hongo de género *Trichoderma* especie *ressei* (Figura 2) como agente productor de la enzima celulasas.

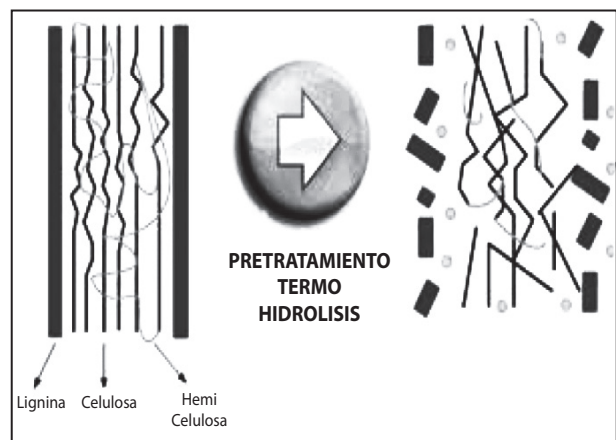
**Figura 2.** C: Pústulas. D-E: Conidióforos. F-G: Conidios H: Clamidosporas de *Trichoderma viride*.



Fuente: Elaine Valiño, 2004.

Para poder procesar adecuadamente los materiales lignocelulósicos es necesario someterlos a pretratamientos (Figura 3) para poder favorecer la hidrólisis de la celulosa para generar azúcares mediante el uso de celulasas. La lignocelulosa es altamente resistente a la hidrólisis, ya que el conjunto de celulosa, hemicelulosa y lignina, están unidos entre sí por enlaces covalentes, diversos puentes intermoleculares y fuerzas de van der Waals (KUMAR, 2008).

**Figura 3.** Efecto del pretratamiento en el material lignocelulósico.



Fuente: YUE Z., 2004.

El fin de someter a pretratamientos al material vegetal es facilitar la hidrólisis principalmente de la celulosa ya que la conformación natural, llamada cristalina, es muy resistente a la hidrólisis. Los pretratamientos promueven la generación de regiones amorfas en la celulosa, las cuales son más susceptibles a la hidrólisis (SONG, 2009).

Existen diversos procesos para llegar al mismo fin, donde el proceso va desde un tratamiento mecánico, como la reducción de tamaño de partícula para aumentar el área de superficie de hidrólisis y disminuir el grado de polimerización de los compuestos (LARA-FERNÁNDEZ, 2007). También se usan tratamientos térmicos donde el efecto es que a altas temperaturas (120 °C – 180 °C) la hemicelulosa y lignina comienzan a solubilizarse dejando a la celulosa más expuesta para ser hidrolizada.

En este sentido la presente investigación tuvo como objetivo comparar tres pretratamientos (molienda; molienda + hidróxido de sodio al 1%; molienda + proceso hidrotérmico) aplicados a cáscara de banano maduro (sustrato) y su efecto en la obtención de jarabe glucosado mediante hidrólisis enzimática con el hongo *Trichoderma reesei*.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

El proceso de producción de glucosa a partir de biomasa lignocelulósica (cáscara de banano maduro) basado en la hidrólisis enzimática consta básicamente de varias etapas; selección,

pretratamientos (molienda, proceso alcalino e hidrotérmico), hidrólisis y recuperación (filtración por decantación a 200 mallas). Se utilizó conidias del hongo *Trichoderma reesei* liofilizado de la marca comercial **TRICHOEB®5WP**. La adaptación se realizó en un Erlenmeyer de 250 ml que contenía 100 ml de sustrato (cáscara de banana maduro molida y agua purificada), en éste se inocularon dos cajas de Petri con colonias del hongo crecidas en una solución de CMC al 2% por ser el sustrato de la enzima celulasa. Luego se incubó a una temperatura de 28 °C por 24 horas con la finalidad de adaptar el hongo a las condiciones del proceso.

#### Proceso de obtención de jarabe glucosado:

##### Trituración mecánica

La trituración de los materiales lignocelulósicos (cáscara de banana maduro) se realizó mediante molienda con un molino casero (Figura 4), para reducir la cristalinidad de la celulosa y aumentar el área superficial. Este proceso facilita la hidrólisis posterior. Luego se implementaron los biodigestores a una concentración de sustrato de 40, 50 y 60 % (p/v).

**Figura 4.** Proceso de molienda de cáscaras de banana maduro, utilizadas en esta investigación.



Fuente: Elaboración propia.

El banana triturado, fue colocado en biodigestores aerobios, que consistieron en recipientes plásticos de 4L de capacidad (Figura 5), donde el material fue mezclado con agua potable. La suspensión obtenida, fue dejada en sedimentación durante el proceso de experimentación (6 días).

**Figura 5.** Biodigestores aerobios utilizados para la hidrólisis enzimática de cáscara de banana maduro.



Fuente: Elaboración propia.

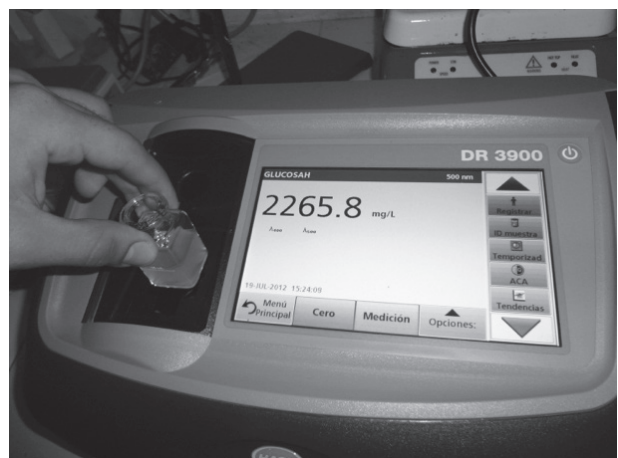
##### Condiciones de Hidrólisis

Los biorreactores así inoculados se incubaron a temperatura ambiente (28-30 °C) por 6 días (144 horas), determinándose el contenido de glucosa diariamente, para lo cual se tuvo que filtrar previamente 10 ml de muestra.

##### Determinación de Glucosa

La determinación de azúcares reductores totales (glucosa) fue llevada a cabo mediante el método de ácido 3,5- dinitrosalicílico por espectrofotometría UV visible con glucosa como estándar (Miller 1980), el cual se basa en la reducción del ácido 3-5 dinitrosalicílico a 2 amino 5 nitro salicílico por la acción de azúcares reductores (ácido galacturónico), el cual forma un color naranja de una intensidad proporcional a los grupos reductores que reacciona y que presenta una máxima absorción a una longitud de onda de 540 nm (Figura 6).

**Figura 6.** Determinación de glucosa durante la hidrólisis enzimática de cáscara de banana maduro.



Fuente: Elaboración propia.

### Diseño del experimento

Se aplicó un diseño experimental multifactorial con 4 factores (pretratamiento, concentración de cáscara de banano maduro, concentración de hongo y tiempo de hidrólisis enzimática) en condiciones de temperatura ambiente, en donde los tres primeros factores tuvieron tres niveles a evaluar y el cuarto factor (tiempo) siete niveles, tal como se puede observar en el siguiente modelo:

### Modelo lineal general: Glucosa vs. pretratamiento, cáscara, hongo, días

Factor	Tipo	Niveles	Valores
Pretrat.	fijo	3	1, 2, 3
cáscara	fijo	3	40, 50, 60
hongo	fijo	3	0.2; 0.4; 0.6
días	fijo	7	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6

Cada tratamiento tuvo tres repeticiones por un total de 81 hidrolizados de cáscara de banano.

A continuación se definen las variables utilizadas en este estudio:

X1: Pre-tratamiento de cáscara de banano maduro mediante hidrólisis enzimática con tres niveles:

1=molienda;

2=molienda + hidróxido de sodio al 1%;

3= molienda + calentamiento

X2: Concentración de cáscara de banano maduro con tres niveles:

40% cáscara banano maduro; 50% cáscara banano maduro; 60% cáscara banano maduro

X3: Concentración de hongo *Trichoderma reesei* con tres niveles:

0,2 g/L; 0,4 g/L; 0,6 g/L

**Variable dependiente Y:** Concentración de glucosa en el jarabe obtenido durante el proceso de hidrólisis enzimática, en g/L.

De esta manera se obtuvieron 27 tratamientos T:

Tratamiento	Pre tratamiento	Cáscara banano maduro	Trichoderma
T1	1	40%	0,2 g/L
T2	1	40%	0,4 g/L
T3	1	40%	0,6 g/L
T4	1	50%	0,2 g/L
T5	1	50%	0,4 g/L
T6	1	50%	0,6 g/L
T7	1	60%	0,2 g/L
T8	1	60%	0,4 g/L
T9	1	60%	0,6 g/L
T10	2	40%	0,2 g/L
T11	2	40%	0,4 g/L
T12	2	40%	0,6 g/L
T13	2	50%	0,2 g/L
T14	2	50%	0,4 g/L
T15	2	50%	0,6 g/L
T16	2	60%	0,2 g/L
T17	2	60%	0,4 g/L
T18	2	60%	0,6 g/L
T19	3	40%	0,2 g/L
T20	3	40%	0,4 g/L
T21	3	40%	0,6 g/L
T22	3	50%	0,2 g/L
T23	3	50%	0,4 g/L
T24	3	50%	0,6 g/L
T25	3	60%	0,2 g/L
T26	3	60%	0,4 g/L
T27	3	60%	0,6 g/L

Fuente: Elaboración propia.

El tratamiento estadístico de los datos se procesó aplicando los principios del diseño experimental, teniendo como soporte el software Minitab, versión 16.0.

### Población y muestra

El universo de la presente investigación estuvo constituido por cáscaras de banano maduro que se generan en la empresa deshidratadora de frutas CONFOCO S.A., que tiene su Planta de procesamiento ubicada en la Parroquia La Peaña en el cantón Pasaje de la Provincia de El Oro. El tipo de muestreo realizado fue aleatorio simple. Para la experimentación se tomaron 50 kilogramos de cáscara de banano maduro del turno de la mañana.

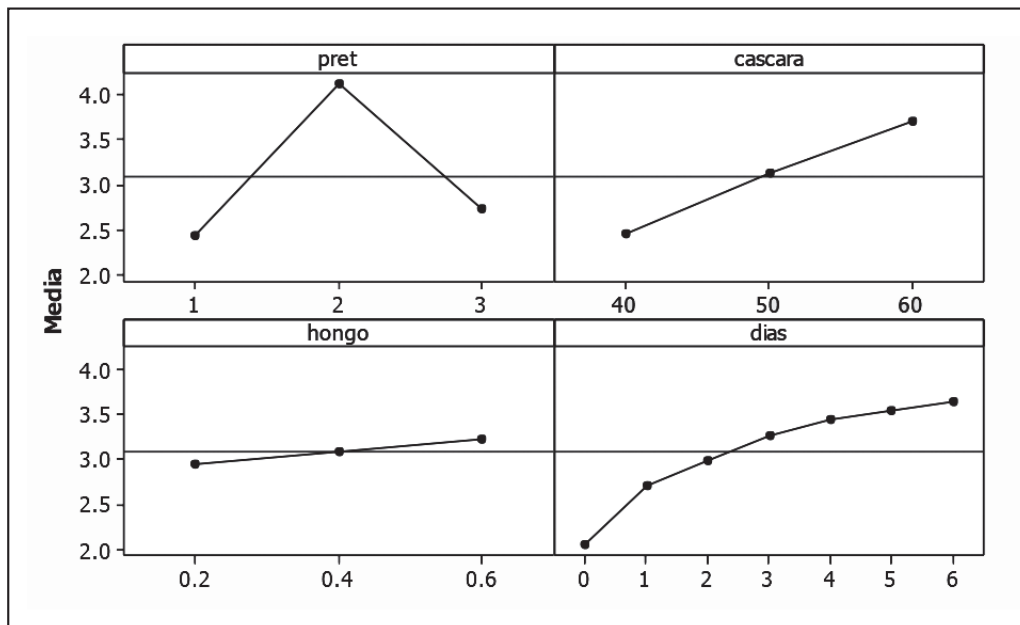
### 3. RESULTADOS

Las Figuras 7 y 8 muestran las medias de la concentración de glucosa en el jarabe glucosado y la interacción de la concentración de glucosa en el jarabe glucosado con los 4 factores estudiados (pretratamiento, concentración de cáscara de banano maduro, concentración de hongo y tiempo de hidrólisis enzimática). Se puede observar que el pretratamiento que presenta mayor concentración de glucosa en el jarabe obtenido es el Pretratamiento 2 (molienda + hidróxido de sodio al 1%). En lo

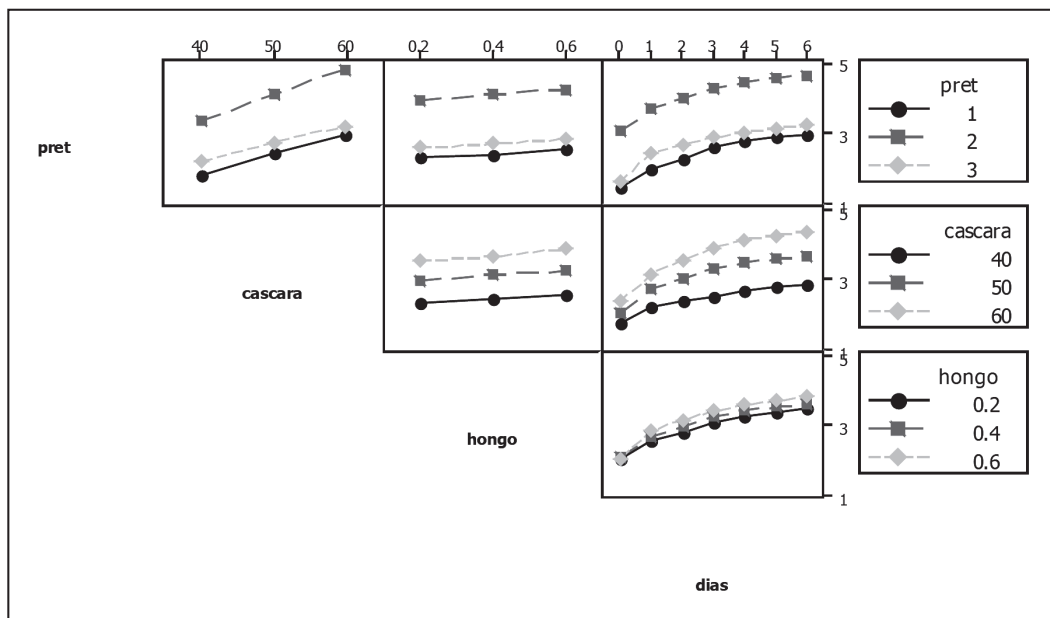
referente a la concentración de cáscara, el 60 % fue el proporcionó la mayor concentración de glucosa. Es importante mencionar que la menor variabilidad de la concentración de glucosa se pudo observar en función de la concentración del hongo, a pesar de que la concentración de 0,6 g/L es la superó a

las otras dos menores concentraciones de inóculo. Por último, en lo referente al tiempo de hidrólisis enzimática, al sexto día de experimentación se pudo obtener la mayor concentración de glucosa en el jarabe.

**Figura 7.** Medias de la concentración de glucosa en el jarabe glucosado en función de los 4 factores estudiados (pretratamiento, concentración de cáscara de banano maduro, concentración de hongo y tiempo de hidrólisis enzimática).



**Figura 8.** Interacción de la concentración de glucosa en el jarabe glucosado con los 4 factores estudiados (pretratamiento, concentración de cáscara de banano maduro, concentración de hongo y tiempo de hidrólisis enzimática).



Según la prueba de hipótesis realizada mediante análisis de varianza (ANOVA) a partir de un diseño multifactorial presentado en la Tabla 1, todos los pretratamientos, influyen en la producción de glucosa ( $p < 0,05$ ). Esta influencia es similar para el caso de los otros 3 factores estudiados: % de cáscara, % de inóculo (hongo *Trichoderma reesei*) y tiempo en días.

Por otro lado, en lo referente a las variaciones del pre tratamiento en función de los otros 3 factores, éstos si tienen influencia, de acuerdo a los valores de  $p < 0.05$ , mostrados en la Tabla 2.

Es importante mencionar que el efecto de la concentración del hongo sobre la producción de glucosa en función de la concentración de cáscara de banano maduro y el tiempo, no tuvo una influencia significativa de acuerdo a los valores de  $p > 0.05$ , tal como se observa en la Tabla 3.

### Análisis, interpretación y discusión de resultados

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede observar que las concentraciones de glucosa obtenidas en el presente estudio alcanzaron como

media 5 g/L aproximadamente durante el sexto día de experimentación, los cuales son menores a los 20 g/L reportados para hidrólisis ácida de cáscara de banano al cuarto día (Monsalve G. et al. 2006). Cabe señalar que, estos investigadores utilizaron hidrólisis ácida, que por su naturaleza química genera subproductos contaminantes para el medio ambiente.

Al mismo tiempo, la Figura 3 permite comparar la glucosa obtenida a partir de los tres pretratamientos. Con el pretratamiento 2 de molienda más hidróxido de sodio al 1%, se obtuvo la mayor concentración de glucosa en el jarabe glucosado, media mayor a 4 g/L; mientras el pretratamiento 3 de molienda más calentamiento tuvo una media superior a 2.6 g/L. Por su parte la menor concentración de glucosa fue para el pretratamiento 1, sólo molienda con media menor a 2.5 g/L.

Estos resultados son concordantes con los obtenidos por López-Miranda *et al.* (2009), los cuales probaron los métodos de pre-tratamiento alcalino y explosión con vapor, para efectuarla hidrólisis enzimática de aserrín de pinoy recuperar los azúcares contenidos en él. Encontraron que el

**Tabla 2.** Análisis de varianza para Glucosa en función de los 4 factores estudiados

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
pret	2	103.7907	103.7907	51.8954	13521.36	0.000
cáscara	2	48.2331	48.2331	24.1166	6283.58	0.000
hongo	2	2.5027	2.5027	1.2513	326.04	0.000
días	6	50.9688	50.9688	8.4948	2213.32	0.000

**Tabla 3.** Análisis estadístico de la variación del pretratamiento en función de las otras 3 variables

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
pret*cascara	4	1.1237	1.1237	0.2809	73.19	0.000
pret*hongo	4	0.0705	0.0705	0.0176	4.59	0.003
pret*días	12	0.3140	0.3140	0.0262	6.82	0.000

**Tabla 4.** Análisis estadístico del efecto de la concentración del hongo en la producción de glucosa en función del pretratamiento, el tiempo y el % de cáscara de banano maduro

Fuente	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM Ajust.	F	P
pret*hongo*días	24	0.1312	0.1312	0.0055	1.42	0.147
cascara*hongo*días	24	0.1306	0.1306	0.0054	1.42	0.150

pre-tratamiento con NaOH a 120 °C proporcionó mejores resultados que los realizados con explosión con vapor a 121 °C.

Al respecto, una posible explicación de la mayor obtención de glucosa a partir del pretratamiento con hidróxido de sodio radica en que, el hidróxido de sodio degrada la lignina, lo que facilita la degradación de la celulosa de la cáscara de banano maduro por acción de la enzima celulasa producida por el hongo *Trichoderma reesei*.

#### 4. CONCLUSIONES

1. En base a los resultados obtenidos podemos concluir que, en lo referente al efecto que produjo la interacción de los 3 factores estudiados (27 tratamientos ) y el cuarto factor tiempo sobre el jarabe glucosado obtenido, el tratamiento que produjo mayor concentración de glucosa, fue T18 (molienda más hidróxido de sodio-60% de cáscara de banano maduro-0.6 g/L de hongo) al cabo de seis días de hidrólisis enzimática, con 5,91 g/L, seguido de 4,15 g/L de T27 (molienda más calentamiento-60% de cáscara de banano maduro-0.6 g/L de hongo) y 3,95 g/L de T9 (molienda -60% de cáscara de banano maduro-0.6 g/L de hongo) obtenidos durante el mismo tiempo de experimentación.
2. Se recomienda utilizar la glucosa obtenida en esta investigación para realizar un proceso fermentativo para producir bioetanol.

#### 5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ELAINE Valiño R. GARCÍA y NEREIDA Albelo (2004) Efecto de la Inoculación de la cepa de trichoderma viride 137 MCXI en mezclas de Vigna unguiculata y Bagazo de Caña de Azucar para Disminuir Factores Antinutricionales [Willakuykuna] // Revista Cubana de Ciencias Agricola. - 2004. - p. 65.
- [2] KUMAR R., SING, S, SINGH, O.V. (2008) Bioconversion of lignocellulose biomass. Biochemical molecular perspectives. [Qillqa maytu kikllu] // Journal of Ind Microbiol Biotechnol.
- [3] LARA-FERNÁNDEZ L. (2007) Hidrólisis enzimática de piñas de sotol para incrementar la concentración de azúcar aplicando diferentes tratamientos. [Qillqa maytu kikllu] / Ed. Narro Universidad Autonoma Agraria Antonio.
- [4] SONG H., MORGAN, J. A., RAMKRISHNA, D. (2009) Systematic development of hybrid cybernetic models: Application to recombinant yeast co-consuming glucose and xylose. [Qillqa maytu kikllu] // Biotechnology & Bioengineering.
- [5] SUN Y., y CHENG, J. (2002) Hydrolysis of lignocellulose materials for etanol production. [Willakuykuna]. - [s.l.] : Bioresource Technology. 83(1), 2002. - Pp. Pag. 1-11.
- [6] YUE Z. BIN W., BAIXU Y., PEIJI, G. (2004) Mechanism of cellobiose inhibition in cellulose hydrolysis by cellobiohydrolase. [Qillqa maytu kikllu] // Science in China seriesC. Life Science47.