



## Efecto de tres pre-tratamientos de cáscara de banano para la obtención de jarabe glucosado mediante hidrólisis enzimática

Hugo Romero Bonilla\*, Humberto Ayala Armijos, Byron Lapo Calderón

Centro de Investigaciones Químicas y Tecnológicas,  
Universidad Técnica de Machala, Machala, Ecuador.

(\*) [hromero@utmachala.edu.ec](mailto:hromero@utmachala.edu.ec)

Recibido: 14/10/2014

Revisado: 31/03/2015

Aceptado: 20/04/2015

### Resumen

El objetivo de la presente investigación fue comparar tres pre-tratamientos (molienda; molienda + proceso hidrotérmico; molienda + hidróxido de sodio al 1 %) aplicados a cáscara de banano maduro y su efecto en la obtención de jarabe glucosado mediante hidrólisis enzimática con el hongo *Trichoderma viride*. Se prepararon 9 medios de cultivos (cáscara de banano molida y agua purificada) en diferentes concentraciones de sustrato (40 %, 50 % y 60 %), factor A; sometidas a los tres pre-tratamientos, factor B. Posteriormente se inocularon con conidias del hongo *Trichoderma viride* en una concentración de 0,4 g/L. El tratamiento que presentó mayor concentración de glucosa fue el tratamiento F (60 % cáscara banano maduro, con el pre-tratamiento de molido + proceso hidrotérmico) con  $5,6 \pm 0,3$  g/L.

**Palabras claves:** pre-tratamientos; jarabe glucosado; hidrólisis enzimática; *Trichoderma viride*; cáscara de banano

### Abstract

The aim of this study was to compare three pretreatments (grinding, milling + hydrothermal process, grinding sodium hydroxide + 1 %) applied to peel ripe banana and its effect on the production of dextrose syrup by enzymatic hydrolysis with the fungus *Trichoderma viride*. 9/2 crops (bananas ground shell and purified water) were prepared at different substrate concentrations (40, 50 and 60 %), factor A; under the three pretreatments factor B. Subsequently conidia were inoculated with the fungus *Trichoderma viride* at a concentration of 0.4 g/L. Treatment showed higher glucose concentration treatment was F (60 % shell ripe banana with the ground + hydrothermal pretreatment process) with  $5.6 \pm 0.3$  g/L.

**Keywords:** pretreatment; glucose syrup; enzymatic hydrolysis; *Trichoderma viride*; banana peel

### Introducción

Los desechos agroindustriales son materiales de gran importancia en la industria alimenticia, pues, con tecnologías alternativas, son capaces de generar jarabes azucarados, subproducto que a su vez se puede utilizar para la obtención de bioetanol. La biomasa es la única fuente alternativa para la obtención sustentable de combustibles y material disponible para la humanidad<sup>1</sup>.

Ecuador dedica grandes extensiones de tierra al mono-cultivo de banano para la exportación. Aquellas frutas que no cumplen los indicadores de calidad para exportación (longitud, diámetro, índice de madurez, etc.) son aprovechadas de diversas maneras, es así que, industrias de procesamiento de banano generan como desecho cientos de 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 subterránea<sup>2</sup>.

Aunque existen métodos fisicoquímicos que permiten utilizar la biomasa en la producción de biocombustibles, una alternativa prometedora son los métodos biológicos que utilizan organismos celulolíticos para obtener azúcares fermentables. Uno de estos procesos es la hidrólisis enzimática, la cual genera importantes beneficios en la industria alimentaria, mejorando las propiedades físico-químicas y organolépticas de los productos, 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.

La lignocelulosa (celulosa, hemicelulosa y lignina) es el componente más abundante de la biomasa producida por la fotosíntesis. En la naturaleza se forman anualmente alrededor de 200.000 millones de toneladas de este componente en el planeta<sup>3</sup>. La celulosa está ubicada en la pared primaria de las frutas, mientras que la hemicelulosa está ubicada en la pared secundaria junto con la lignina y en menor proporción en la pared primaria. Es necesario tener en cuenta que la pared

primaria es flexible y asociada a células vivas con disposición desordenada de fibrillas, mientras que la pared secundaria es gruesa y asociada a células muertas, con disposición de fibrillas en capas ordenadas y superpuestas. La celulosa es un polisacárido lineal y la hemicelulosa es un compuesto no glucídico ramificado<sup>4</sup>.

En la mayoría de los casos, las fibras de celulosa están dentro de una matriz de otra estructura de biopolímeros, compuesta principalmente por un 20 a 35 % de hemicelulosa y entre un 5 a 30 % de lignina de la planta (en base seca). Aunque estas interacciones de matrices varían con el tipo de célula y su madurez, hay una característica estructural dominante como la longitud de cadena de lignina la cual es el principal soporte de la biomasa y limita la tasa de hidrólisis cuando el material no ha sido sometido a un pre-tratamiento.

El método consiste en hidrolizar mediante enzimas (celulasas) la celulosa presente en la cáscara de banano para transformarla en glucosa, mediante la utilización del hongo de género *Trichoderma* especie *viride* como agente productor de estas enzimas<sup>4</sup>.

Para poder procesar adecuadamente los materiales lignocelulósicos es necesario someterlos a pre-tratamientos los cuales favorecen la hidrólisis enzimática de la celulosa, generando azúcares reductores. 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<sup>5</sup>.

El objetivo de someter a pre-tratamientos 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 pre-tratamientos promueven la generación de regiones amorfas en la celulosa las cuales son más susceptibles a la hidrólisis<sup>6</sup>.

Existen diversos procesos para llegar al mismo fin, uno de los cuales consiste en un tratamiento mecánico, para la reducción de tamaño de partícula y aumentar así el área de superficie de hidrólisis<sup>7</sup>. Otro de los tratamientos utilizados es el térmico, debido a que, las altas temperaturas (120–180 °C) degradan y solubilizan la hemicelulosa y lignina, dejando a la celulosa más expuesta para ser hidrolizada.

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

## Materiales y métodos

### Población y muestra

El universo de la presente investigación estuvo constituido por cáscaras de banano maduro de la variedad Cavendish 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.

### Diseño del experimento

El modelo estadístico fue un experimento factorial 3x3 completamente al azar en condiciones de temperatura constante, en donde por cada factor se multiplicó los tres niveles a evaluar, dando así un total de 9 tratamientos. Todos los tratamientos tuvieron una concentración de inóculo de 0,4 g/L de conidias del hongo *Trichoderma viride*. Cada tratamiento tuvo tres repeticiones por un total de 27 hidrolizados de cáscara de banano, como se detalla a continuación:

- A = 40 % cáscara banano maduro, molienda.
- B = 50 % cáscara banano maduro, molienda.
- C = 60 % cáscara banano maduro, molienda.
- D = 40 % cáscara banano maduro, molienda + proceso hidrotérmico.
- E = 50 % cáscara banano maduro, molienda + proceso hidrotérmico.
- F = 60 % cáscara banano maduro, molienda + proceso hidrotérmico.
- G = 40 % cáscara banano maduro, molienda + NaOH al 1 %.
- H = 50 % cáscara banano maduro, molienda + NaOH al 1 %.
- I = 60 % cáscara banano maduro, molienda + NaOH al 1 %.

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, pre-tratamientos (molienda, proceso hidrotérmico y alcalino), hidrólisis y recuperación (filtración por decantación a 200 mallas). Se utilizó conidias del hongo *Trichoderma viride* liofilizado de la marca comercial Trichoeb® 5 WP. La adaptación se realizó en un Erlenmeyer de 250 mL que contenía 100 mL de sustrato (cáscara de banano maduro molida y agua destilada). La preparación consistió en mediante un homogenizador mecánico a 60 rpm, ir mezclando proporcionalmente la cáscara de banano con el agua purificada.

Una vez homogénea la mezcla, se inoculó 0,4 g/L de conidias del hongo crecidas en una solución de CMC (carboxi-metil celulosa) al 2 %, por ser el sustrato de la enzima celulasa.

### Proceso de obtención de jarabe glucosado

**Trituración mecánica:** la trituración de los materiales lignocelulósicos (cáscara de banano maduro) se realizó mediante molienda con un molino casero, 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).

El banano triturado, fue colocado en biorreactores aerobios, que consistieron en recipientes plásticos de 4 litros de capacidad, donde el material fue mezclado con agua destilada. La suspensión obtenida fue dejada en reposo para su sedimentación durante el proceso de experimentación (3 días).

**Condiciones de hidrólisis:** los bioreactores así inoculados con 0,4 g/L de conidias del hongo *Trichoderma viride*, se incubaron a temperatura ambiente (28 °C) por 3 días (72 horas), determinándose el contenido de glucosa diariamente, para lo cual se tuvo que filtrar previamente 10 mL de muestra.

**Determinación de pH:** la determinación de pH se la realizó directamente en los biodigestores introduciendo el electrodo del equipo multiparámetro (pH) TIPO ORION STAR A329 digital.

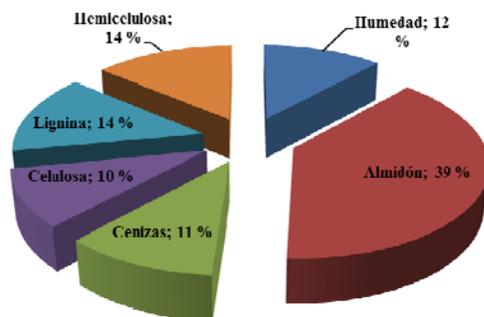
**Determinación de glucosa:** la determinación de azúcares reductores totales (glucosa) fue llevada a cabo mediante el método de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) por espectrofotometría UV visible con glucosa como estándar, tal como lo describe Miller<sup>8</sup>, el cual se basa en la reducción del ácido 3,5-dinitro-salicílico a ácido 2-amino-5-nitro salicílico por la acción de azúcares reductores (ácido galacturónico), el cual forma un color naranja de una intensidad proporcional a la concentración de grupos reductores que reacciona y que presenta una máxima absorción a una longitud de onda de 540 nm.

#### Análisis estadístico

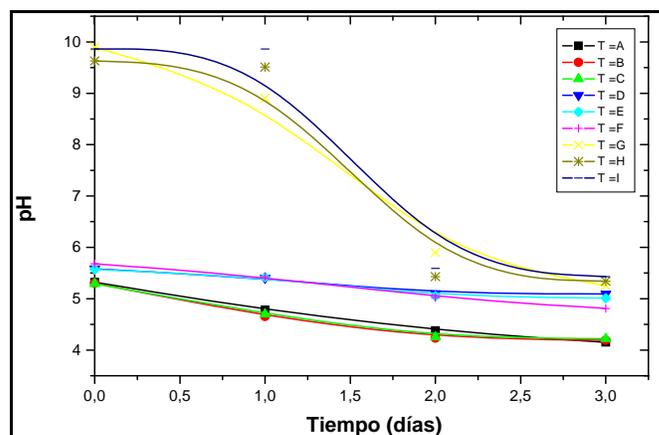
Se utilizó una estadística descriptiva mediante análisis de bloques al azar. La varianza de los datos experimentales se obtuvo mediante la utilización del software Origin 5.0. Se utilizó una estadística inferencial para estimar la significancia entre los tratamientos estudiados. Se realizó un análisis multifactorial con prueba de Duncan. Para ello se utilizó el programa estadístico Statgraphics Plus.

## Resultados

Los resultados obtenidos en la caracterización química de la cáscara de banano maduro utilizada como sustrato para la hidrólisis enzimática celulosa-glucosa se muestra en la figura 1.



**Fig. 1:** Composición química obtenida para las cáscaras de banano usadas.

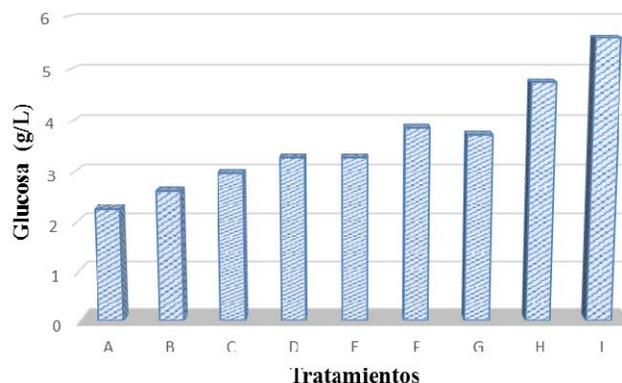


**Fig. 2:** Variación de pH de los 9 tratamientos en función del tiempo de experimentación.

En lo referente a la variación del pH durante el proceso de hidrólisis enzimática, podemos ver en la figura 2, que el descenso del pH durante el tiempo de hidrólisis de la cáscara de banano maduro se presenta en los 9 tratamientos después del tercer día de experimentación.

Es importante mencionar que, los tratamientos A, B, C (molienda) y D, E F (molienda + proceso hidrotérmico), sufrieron pequeñas variaciones de alrededor de 1 unidad de pH aproximadamente. Por su parte los tratamientos G, H, I (molienda + hidróxido de sodio al 1 %), que partieron de un pH alcalino (entre 9 y 9,9), luego del proceso de hidrólisis presentaron una disminución de más de 4 unidades de pH, lo cual indica que el hongo modifica el pH del medio de cultivo para su crecimiento y producción de glucosa. Datos similares de pH obtuvieron Granda y Hernández<sup>9</sup>, en la degradación fúngica de cáscara de banano (Cavendish valery).

Por su parte, la figura 3 presenta los resultados obtenidos para la producción de glucosa durante los 3 días para los 9 tratamientos. Los tratamientos con mayor concentración de glucosa fueron los tratamientos F, H y I, con 3,85 g/L; 4,74 g/L y 5,60 g/L respectivamente, al tercer día de experimentación. Monsalve y colaboradores<sup>10</sup>, en el 2006, obtuvieron concentraciones de 20 g/L de glucosa a partir de cáscara de banano, pero mediante hidrólisis ácida, la cual es menos



**Fig. 3:** Producción de glucosa (g/L) para los 9 tratamientos durante 3 días de hidrólisis enzimática

amigable con el medio ambiente debido a los desechos ácidos que genera, y además, estos azúcares reductores obtenidos son menos fermentables para posteriores procesos biotecnológicos. Por otro lado, se han obtenido mediante hidrólisis enzimática concentraciones de glucosa de 1,35 g/L a los 5 días de fermentación, utilizando pre-tratamiento hidrotérmico y un preparado enzimático a base de lacasa y lignina peroxidasa<sup>10</sup>.

En lo referente al análisis estadístico, la tabla 1 muestra los resultados del análisis de varianza de los contenidos de glucosa del hidrolizado producido por el hongo *Trichoderma viride*. Se puede observar que si existe diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre los 9 tratamientos estudiados, el tratamiento que alcanza la mayor media en la producción de glucosa es el tratamiento I, evidenciándose la interacción entre concentración de cáscara (Factor A) y el tipo de pre-tratamiento (Factor B) después del tercer día de hidrólisis enzimática.

**Tabla 1:** Análisis de Varianza para los 9 tratamientos comparados

Fuente	Media	Varianza	N	DS ( $\pm$ )
A	2,25	0,01	3	0,015
B	2,61	0,01	3	0,015
C	2,96	0,01	3	0,015
D	3,27	0,01	3	0,015
E	3,27	0,01	3	0,015
F	3,85	0,06	3	0,015
G	3,72	0,01	3	0,015
H	4,74	0,08	3	0,015
I	5,60	0,09	3	0,015
F = 19,14				
<b>p = 3,87-13</b>				

## Conclusiones

El descenso del pH durante el tiempo de hidrólisis enzimática de la cáscara de banano maduro se estabiliza en los 9 tratamientos después del tercer día de experimentación. En los tratamientos G, H e I se pudo observar un pH inicial mayor a 9,5, debido a que la cáscara de banano maduro fue pre-tratada con una solución de hidróxido de sodio al 1 %, lo cual influyó favorablemente en la producción de glucosa, ya que estos tratamientos presentaron las mayores concentraciones de glucosa.

De acuerdo al análisis de varianza podemos observar que existe diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) en la producción de glucosa entre los 9 tratamientos estudiados después del tercer día de experimentación. Los tratamientos que produjeron mayor concentración de glucosa fueron los tratamientos F, H e I, con 3,85 g/L; 4,74 g/L y 5,6 g/L, respectivamente.

Se recomienda utilizar la glucosa obtenida en esta investigación para realizar un proceso fermentativo para producir bioetanol.

## Referencias

1. A Dolezal, AM Majano, A Ochs, R Palencia. La Ruta hacia el Futuro para la Energía Renovable en Centroamérica. Pág. 13 (2013).  
Disponible en: [http://www.worldwatch.org/system/files/CA\\_report\\_highres\\_spanish\\_2013\\_0.pdf](http://www.worldwatch.org/system/files/CA_report_highres_spanish_2013_0.pdf)
2. LC Gonçalves Ferreira. Evaluación de la biodegradabilidad anaerobia de residuos orgánicos pre-tratados térmicamente. Tesis Doctoral de la Escuela de Ingenierías Industriales - Universidad de Valladolid. España, Pág. 7 (2013).
3. AJ Ragauskas, CK Williams, BH Davison, G Britovsek, J Cairney, CA Eckert, WJ Frederick, JP Hallett, DJ Leak, CL Liotta, JR Mielenz, R Murphy, R Templer, T Tschaplinski. The path forward for biofuels and biomaterials. **Science**, **311**, 484-489 (2006).
4. GM Torres Vargas. Química y análisis de alimentos. Escuela de Ciencias Básicas Tecnología e Ingeniería. UNAD, Colombia. Pág. 17 (2012).
5. RS Kumar. Bioconversion of lignocellulose biomass. Biochemical molecular perspectives. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, **35**, 377-391 (2008).
6. BW Yue. Mechanism of cellobiose inhibition in cellulose hydrolysis by cellobiohydrolase. **Science in China**, **C47**, 18-24 (2004).
7. J Lara, L Fernandez. Hidrólisis enzimática de piñas de sotol para incrementar la concentración de azúcar aplicando diferentes tratamientos. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, México. Pág. 61 (2007).
8. D Miller. Determinación de Azúcares reductores. Química de los Alimentos, Pág. 67. Editorial Acribia, Zaragoza - España. ISBN: 968-18-5845-X (1980).
9. F Granda Sivisapa. Obtención de azúcares fermentables por degradación fúngica de cáscara de banano (Cavendish valery). Tesis previa a la obtención del título de Bioquímico-Farmacéutico. Universidad Técnica Particular Loja - Escuela de Bioquímica y Farmacia, Ecuador. Pág.13 (2009).
10. G Monsalve, J Medina de Pérez, V Ruiz, A Colorado. Producción de Etanol a partir de la Cáscara de Banano y de Almidón de Yuca. **Dyna**, **73 (150)**, 21-27 (2006).