



E.A.P. INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

**“OPTIMIZACIÓN DE LA OBTENCIÓN DE JARABE DE GLUCOSA POR ACCIÓN DE LA
GLUCOAMILASA**

SOBRE CÁSCARA DE BANANO (*Cavendish valery*)”

TESIS

PARA OBTENER EL TITULO PROFESIONAL DE

INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

AUTORES:

Bach. TAMARIZ ALVARADO SAIRA NATALY

Bach. VILLASECA ROJAS VIANKA MERLY

ASESOR:

Dr. CASTILLO CALDERÓN, AUGUSTO

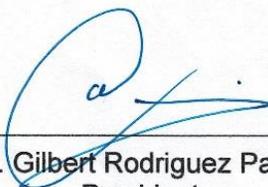
NUEVO CHIMBOTE – PERÚ

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE INGENIERIA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

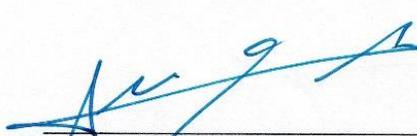


HOJA DE AVAL DEL JURADO EVALUADOR

El presente trabajo de tesis titulado "OPTIMIZACIÓN DE LA OBTENCIÓN DE JARABE DE GLUCOSA POR ACCIÓN DE LA GLUCOAMILASA SOBRE CÁSCARA DE BANANO (*Cavendish valery*)", para obtener el título profesional de Ingeniero Agroindustrial, presentado por Bach. SAIRA NATALY TAMARIZ ALVARADO y Bach. VIANKA MERLY VILLASECA ROJAS, que tienen como asesor al docente Dr. Augusto Castillo Calderón designado por Resolución Decanal N°191-2016-UNS-FI Ha sido revisado y aprobado el día 17 de Octubre del 2018 por el siguiente jurado evaluador, designado mediante Resolución N°121-2018-UNS-CFI



Dr. Gilbert Rodriguez Paucar
Presidente



Dr. Augusto Castillo Calderon
Secretario (Asesor)



Dr. Cesar Moreno Rojo
Integrante



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Siendo las 6 pm del **diecisiete de octubre del dos mil dieciocho** se instaló en el Auditorio de la Escuela Académica Profesional de Ingeniería Agroindustrial el Jurado Evaluador, designado mediante Resolución **N°121-2018-UNS-CFI**, integrado por los docentes:

- **Dr. Gilbert Rodríguez Paucar** (Presidente)
- **Dr. Augusto Castillo Calderón** (Secretario)
- **Dr. Cesar Moreno Rojo** (Integrante); para dar inicio a la Sustentación y Evaluación de Tesis, titulada:

“OPTIMIZACIÓN DE LA OBTENCIÓN DE JARABE DE GLUCOSA POR ACCIÓN DE LA GLUCOAMILASA SOBRE CÁSCARA DE BANANO (Cavendish Valery)”, elaborada por el (os) Bachilleres en Ingeniería Agroindustrial:

- **Bach. Tamariz Alvarado Saira Nataly**
- **Bach. Villaseca Rojas Vianka Merly**

Asimismo, tienen como Asesor al docente: **Dr. Augusto Castillo Calderón**

Finalizada la sustentación, el (os) tesisistas respondió (eron) las preguntas formuladas por los miembros del Jurado y el Público presente.

El Jurado después de deliberar sobre los aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo, y con las sugerencias pertinentes y en concordancia con el Artículo 39° y 40° del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Nacional del Santa, declaran:

BACHILLER	PROMEDIO VIGESIMAL	PONDERACIÓN
Villaseca Rojas Vianka Merly	18	BUENO

Siendo las **8: 00 pm** del mismo día, se dio por terminada dicha sustentación, firmando en señal de conformidad el presente jurado.

Nuevo Chimbote, 17 de Octubre del 2018


.....
Dr. Gilbert Rodríguez Paucar
Presidente


.....
Dr. Augusto Castillo Calderón
Secretario


.....
Dr. Cesar Moreno Rojo
Integrante



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE INGENIERÍA
E.A.P. INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Siendo las 6 pm del **diecisiete de octubre del dos mil dieciocho** se instaló en el Auditorio de la Escuela Académica Profesional de Ingeniería Agroindustrial el Jurado Evaluador, designado mediante Resolución **N°121-2018-UNS-CFI**, integrado por los docentes:

- **Dr. Gilbert Rodríguez Paucar** (Presidente)
- **Dr. Augusto Castillo Calderón** (Secretario)
- **Dr. Cesar Moreno Rojo** (Integrante); para dar inicio a la Sustentación y Evaluación de Tesis, titulada:

“OPTIMIZACIÓN DE LA OBTENCIÓN DE JARABE DE GLUCOSA POR ACCIÓN DE LA GLUCOAMILASA SOBRE CÁSCARA DE BANANO (Cavendish Valery)”, elaborada por el (os) Bachilleres en Ingeniería Agroindustrial:

- **Bach. Tamariz Alvarado Saira Nataly**
- **Bach. Villaseca Rojas Vianka Merly**

Asimismo, tienen como Asesor al docente: **Dr. Augusto Castillo Calderón**

Finalizada la sustentación, el (os) tesisistas respondió (eron) las preguntas formuladas por los miembros del Jurado y el Público presente.

El Jurado después de deliberar sobre los aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo, y con las sugerencias pertinentes y en concordancia con el Artículo 39° y 40° del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Nacional del Santa, declaran:

BACHILLER	PROMEDIO VIGESIMAL	PONDERACIÓN
Tamariz Alvarado Saira Nataly	18	BUENO

Siendo las **8: 00 pm** del mismo día, se dio por terminada dicha sustentación, firmando en señal de conformidad el presente jurado.

Nuevo Chimbote, 17 de Octubre del 2018


.....
Dr. Gilbert Rodríguez Paucar
Presidente


.....
Dr. Augusto Castillo Calderón
Secretario


.....
Dr. Cesar Moreno Rojo
Integrante

DEDICATORIA

A Dios, por ser el inspirador y darme fuerza para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados.

A mis padres Máximo y Paulina, por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años. Ha sido un privilegio ser su hija, son los mejores padres.

A mis hermanas Lucy y Fiorella por su cariño y apoyo incondicional durante proceso, por estar conmigo en todo momento, gracias.

A mi hija Alondra, quien ha sido mi mayor motivación para nunca rendirme y poder llegar a ser un ejemplo para ella.

Vianka Merly Villaseca Rojas

DEDICATORIA

A Dios, por estar presente en mi vida, acompañándome y guiando cada uno de mis pasos.

A mis Padres, Luz y Dimas; por su incansable e incondicional apoyo en todo momento, por su amor incomparable que fue, es y será el motor que me impulsa a ser mejor cada día.

A Elvis, mi hermano, compañero y amigo, por su cariño en todo momento, por permanecer unidos acompañándonos en el logro de nuestras metas.

Saira Nataly Tamariz Alvarado

AGRADECIMIENTOS

A Dios por iluminarnos y por la fortaleza durante el desarrollo del este trabajo, por darnos fuerza de voluntad en seguir adelante.

A nuestro asesor Dr. Augusto Castillo Calderón, por su comprensión, apoyo y consejos en mejoras del presente trabajo de investigación.

A la Ing. Berenice por su disponibilidad para apoyarnos durante nuestro trabajo de laboratorio.

Los Autores

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo optimizar los parámetros de las concentraciones de *glucoamilasa* y almidón de cáscara de banano (*Cavendish valery*), para la obtención de jarabe de glucosa. Se realizó el tratamiento hidrotérmico del sustrato-harina de cáscara de banano- a temperatura de 80°C por 1 hora, con el fin de liberar las partículas que contienen almidón.

El diseño experimental se planteó en dos etapas: en la primera, mediante la aplicación del diseño ortogonal-Taguchi, se determinaron los parámetros óptimos de pH (4.5 - 5.5) y temperatura (60 - 70); y la segunda mediante un diseño central compuesto rotatable, se determinó los parámetros de concentración de la enzima *glucoamilasa*, y concentración de sustrato- almidón de cáscara de banano (*Cavendish valery*).

Los experimentos para la primera etapa se realizaron en un minireactor con un tiempo de hidrólisis de 10 minutos, y los de la segunda etapa, se trabajó con tiempo de 30 minutos. Al finalizar la hidrólisis se cuantificó la glucosa por el método Glucosa-Monlabtest y mediante un análisis estadístico se determinó la significancia de cada factor y su efecto en la formación de producto.

Los parámetros óptimos fueron 5.5 pH y 70°C de temperatura. Los valores óptimos de enzima y sustrato fueron de 0.06% y 4.4% respectivamente obteniendo una concentración de 2.8 g/L de glucosa durante 26 horas de hidrólisis.

Finalmente, se realizó una fermentación de *Saccharomyces cerevisiae* sobre el jarabe de glucosa por 12 horas, donde se confirmaron los resultados de la investigación obteniendo bioetanol. Se obtuvo 0.9 g/L de etanol a partir de una concentración de 5g/L de glucosa.

.

INDICE GENERAL

II. REVISION BIBLIOGRAFICA.....	11
2.1. Generalidades del banano	11
2.1.1. Composición química de la cáscara de banano	12
2.1.2 Diferencia entre Banano y Plátano.....	13
2.1.3. Estado de madurez del banano.....	16
2.2 Carbohidratos.....	17
2.2.1. Clasificación	18
2.3. Enzimas	22
2.3.1. Estructura de las enzimas	23
2.3.2. Mecanismo de acción de las enzimas. Catálisis enzimática.	24
2.4. Las amilasas	31
2.4.1. Organismos productores de amilasas	32
2.4.2. Estructura y Función de las Amilasas	34
2.5. Fermentación	38
2.5.1. Microorganismo: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
2.6. Antecedentes:	41
2.7. Justificación e importancia del problema.....	43
2.8. Objetivos	45
2.9. Problema.....	46
2.10. Hipótesis	46
III. MÉTODOLOGÍA.....	47
3.1. Materiales, equipos e Instrumentos.....	47

3.2. Diseño Experimental	51
3.2.1. Diagrama General de la Experiencia.....	51
3.2.2. Descripción de las Etapas del Diagrama de Flujo Experimental	52
3.2.3. Esquema del Diseño Experimental	56
3.3. Métodos	59
3.3.1. Análisis físico-Químico	59
3.3.2. Análisis para la enzima glucoamilasa.....	63
3.3.3. Método Glucosa-Monlabtest.....	64
3.3.4. Determinación de actividad enzimática:	64
3.3.5. Determinación de parámetros cinéticos	65
3.3.6. Fermentación del hidrolizado de cáscara de banano.	68
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	70
4.1. Caracterización de la cáscara de banano	70
4.2. Determinación de la actividad enzimática	71
4.3. Determinación de parámetros cinéticos	73
4.4. Determinación de temperatura y pH óptimos	74
4.5. Determinación de las concentraciones óptimas de enzima y sustrato:	77
4.6. Fermentación del hidrolizado de cáscara de banano.....	84
4.7. Análisis cromatográfico de etanol	85
V. CONCLUSIONES:.....	87
VI. RECOMENDACIONES	88
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1: Composición química de la cáscara de banano</i>	13
<i>Tabla 2: Valores Nutritivos por 100 gramos de Porción Comestible</i>	15
<i>Tabla 3: Organismos productores de enzimas amilolíticos pertenecientes a la familia</i> 15	
<i>Tabla 4: Variables de la investigación</i>	46
<i>Tabla 5: Diseño Ortogonal – Taguchi para temperatura y pH.</i>	57
<i>Tabla 6: Delimitantes del DCCR</i>	58
<i>Tabla 7: Diseño Superficie Respuesta: DCCR para concentraciones de</i>	58
<i>Tabla 8: Composición de los medios de mantención, activación y cultivo para Saccharomyces cerevisiae ATCC 4126.</i>	68
<i>Tabla 9: Composición fisicoquímica de la harina de cáscara de banano</i>	70
<i>Tabla 10: Valores obtenidos para la determinación de actividad enzimática</i>	71
<i>Tabla 11: Valores de producto para la determinación de la</i>	72
<i>Tabla 12: Parámetros cinéticos de la enzima</i>	73
<i>Tabla 13: Diseño ortogonal Taguchi para determinación de</i>	74
<i>Tabla 14: Análisis de varianza para ph y temperatura</i>	75
<i>Tabla 15: Estadístico mostrando los 11 tratamientos con sus respuestas</i>	78
<i>Tabla 16: Análisis de varianza (anova) para contenido de glucosa</i>	79
<i>Tabla 17: Coeficiente de regresión del modelo matemático</i>	80
<i>Tabla 18: Valores críticos resultados de la optimización de las concentraciones de enzima y sustrato</i>	82
<i>Tabla 19: Cinética enzimática con los valores óptimos de enzima y sustrato</i>	83

<i>Tabla 20: Producción de etanol a partir de la cáscara de banano hidrolizada</i>	85
<i>Tabla A3: Composición de los medios de mantención, activación y cultivo para Saccharomyces cerevisiae ATCC 4126.</i>	111

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Clasificación de la fruta de acuerdo a su grado de maduración.....	17
Figura 2: (a) Enrollamiento helicoidal de la amilosa. (b) estructura.....	21
Figura 3: Enzima	23
Figura 4: Enzimas que intervienen en la hidrolisis del almidón	24
Figura 5: Energía de activación.....	26
Figura 6: Esquemas de la reacción enzimática	27
Figura 7: Efecto de la concentración de enzima y sustrato.	28
Figura 8: Efecto de la temperatura en la velocidad de reacción enzimática.....	29
Figura 9: Efecto del pH en la velocidad de reacción enzimática	30
Figura 10: Hidrólisis del almidón con la amilasa	31
Figura 11: Desinfección de la materia prima a utilizar.....	52
Figura 12: Secado y molienda de la cáscara de banano.....	52
Figura 13: Tamizado de la harina de cáscara de banano.	53
Figura 14: Acondicionamiento de la harina de cáscara de banano.....	53
Figura 15: Hidrólisis enzimática y control de temperatura en el minireactor.	54
Figura 16: Centrifugación del hidrolizado	55
Figura 17: Cuantificación de glucosa mediante kit enzimático.	55
Figura 18: Gráfica de Lineweaver-Burke o del doble recíproco	66
Figura 19: Actividad enzimática de la glucoamilasa	72

Figura 20: Diagrama de Pareto para los efectos de pH y Temperatura	76
Figura 21: Efectos principales para azúcares totales	77
Figura 22: Superficie de respuesta tridimensional de los rendimientos de glucosa en función a la concentración de enzima y sustrato.....	81
Figura 23: Producción de biomasa vs Glucosa	84

INDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama 1: Etapas para la obtención de azúcares fermentables.	51
---	----

INTRODUCCION

Los desechos agroindustriales son materiales de gran importancia en la industria alimenticia, tienen una estructura compleja que consta de polímeros de carbohidratos como almidones, celulosa, hemicelulosa, y un polímero fenólico llamado lignina. A partir de los carbohidratos, con tecnologías alternativas, se pueden generar jarabes azucarados, es decir, se pueden obtener unidades monoméricas de glucosa que puede ser aprovechada en diversos usos industriales como la obtención de etanol (Romero *et. al.*, 2015; Tejada *et. al.*, 2010).

En el norte del Perú, se dedican grandes extensiones de tierra al 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 (LC Gonçalves, 2013).

Los procesos de hidrólisis enzimática, generan 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 (Romero *et. al.*, 2015).

Actualmente en el mercado se encuentra una variedad de enzimas comerciales producidas por microorganismos y que son usadas en la industria de alimentos y bebidas. En la industria de bebidas, las enzimas de mayor importancia son las amilasas ya que se ven implicadas desde el proceso de elaboración de mosto. El uso de α -amilasas, β -amilasas y glucoamilasas producidas por diferentes microorganismos ha beneficiado la industria por proveer alternativa y un método más eficiente para la producción de dextrinas, maltosa y glucosa (Beltrán y Maldonado, 2002).

Por lo citado, el presente trabajo de investigación plantea como objetivo la determinación de las concentraciones de la cáscara de banano (como sustrato) y la enzima comercial *Glucoamilasa*, para la obtención de jarabe de glucosa.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. Generalidades del banano

El banano pertenece al orden Zingiberales, familia Musaceae y género Musa. Bananas son frutas tropicales de plantas herbáceas de origen asiático. Bananas y plátanos tienen la característica general de las frutas, es decir, tienen un valor nutritivo que radica fundamentalmente en su contenido de carbohidratos (J. Ly. 2004).

Suelen cultivarse con fines comerciales o de autoconsumo humano en muchas partes del mundo. Las bananas en particular, que son las cultivadas en condiciones de plantación, suelen generar un volumen importante de residuos y sobrantes de frutas (J. Ly., 2004).

La producción mundial promedio de banano es de 29,9 millones de toneladas anuales, generada principalmente en África con un 73,2% de la producción, mientras que en América Central y Sur se produce el 27,8% con un promedio de 7,1 millones de toneladas anuales. Y en el caso de Perú, cuenta con aproximadamente 300 mil hectáreas sembradas de frutales, de las cuales el plátano y el banano ocupan el 50%. El banano orgánico se cultiva principalmente en la zona costera norte occidental, en las regiones de Tumbes, Piura y Lambayeque (INIA, 2013).

Los bananos verdes contienen del 20 – 22% de la materia seca, principalmente en forma de almidón. Cuando estas maduran el almidón se convierte en azúcares simples como: sacarosa, fructuosa y glucosa. Los azúcares presentes en la pulpa de banano maduro, son fácilmente asimilables. Los principales son sacarosa (66%), glucosa (20%) y fructuosa (14%) (Braverman, Bioquímica de los alimentos, 1980).

2.1.1. Composición química de la cáscara de banano

La cáscara de banano contiene principalmente celulosa, hemicelulosa y lignina, su composición varía dependiendo del origen del material donde se estudian las condiciones de sustrato, enzima y tiempo para obtener altas conversiones (Monsalve *et. al.*, 2006).

Análisis bromatológicos de la cáscara banano revelaron que el contenido de almidón es el predominante en este material lignocelulósico (*Tabla 1*) seguido de la hemicelulosa, celulosa y lignina (Monsalve *et. al.* 2006).

Tabla 1: Composición química de la cáscara de banano

Componente	Cáscara de Banano (% base seca)
Almidón	39.89
Humedad	89.10
Hemicelulosa	14.8
Celulosa	13.2
Magnesio	0.16
Calcio	0.29
Cenizas	11.37

Fuente: Monsalve *et al.*, (2006).

En otras investigaciones, valores similares fueron reportados por Romero *et. al.* (2015), quienes señalan para la cáscara de banano una composición de 39% de almidón, 14% de celulosa, 14% de lignina, 10% de hemicelulosa, 11% de cenizas; estos porcentajes varían según el estado de madurez de la fruta.

2.1.2 Diferencia entre Banano y Plátano

El banano es una fruta ampliamente cultivada y consumida en el mundo debido a su aroma característico y agradable sabor. (Martínez *et.* 2016).

Los bananos y plátanos fueron clasificados originalmente por Carl Nilsson Linnaeus, en 1753, como *Musa paradisiaca*, que hace referencia a híbridos

y cultivares de las especies silvestres *Musa acuminata* y *Musa balbisiana*, acorde con las reglas del Código Internacional de Nomenclatura Botánica. (Romero, 2014)

El nombre genérico dado por Linnaeus (*Musa Paradisiaca*) se ha respetado y sigue siendo usado cuando se trata del banano y el plátano, en el entendido que se trata de un híbrido. Sin embargo, existe cierta diferencia cuando se observa una mayor presencia genética de *Musa balbisiana*, se le conoce como plátano, que por su mayor contenido de fécula debe ser consumida cocida, asada o frita; mientras que las bananas con un mayor contenido genético de *Musa acuminata*, son consumidas como frutas de postre. Pero una importante diferencia entre banano y plátano, es su contenido de humedad, el plátano contiene un promedio de 65% de humedad y el banano, 74%. Ya que la hidrólisis, el proceso por el cual los almidones se convierten en azúcares, actúa con mayor rapidez en las frutas con un mayor contenido de humedad, los almidones se convierten en azúcares más rápido en los bananos que en los plátanos. Muchos bananos de cocción tienen contenidos de humedad que se encuentran entre los plátanos y bananos de postre. Estas variedades pueden ser cocinadas cuando no están completamente maduras, pero también se maduran suficientemente como para poder comerla cruda. (Romero, 2014)

Según Martínez et. 2016, La principal diferencia entre un plátano y un banano es el contenido de humedad, el plátano tiene en promedio 65% de humedad y el banano alrededor del 83% .Los bananos utilizados como fruta

presentan dominancia acuminata (AAA), tienen un bajo contenido de almidón y mayor cantidad de azúcares, mientras que los plátanos de cocción son de dominancia balbisiana (ABB), tienen alto contenido de almidón y baja cantidad de azúcare.

Tabla 2: Valores Nutritivos por 100 gramos de Porción Comestible

	Banano	Plátano
Agua	74.2 g	65.28 g
Energia	92 kcal	122 kcal
Grasa	0.48 g	0.37 g
Proteína	1.03g	1.3 g
Hidratos de Carbono	23.43 g	31.89 g
Potasio	396 mg	499 g
Hierro	0.31 mg	0.6 g
Sodio	1 mg	4 mg
Calcio	6 mg	3 mg
Vitamina C	9.2 mg	18.4 mg

Fuente: Consultoria estudio de la Cadena del Plátano-
Cárdenas Frida Liliana7DGCA

Fuente: DGPA-DEEIA7MINAGRI

2.1.3. Estado de madurez del banano

El proceso de maduración del banano se caracteriza por una secuencia de cambios físicos, químicos, bioquímica y metabólicos que permiten al fruto alcanzar sus atributos sensoriales (forma, color, sabor, aroma, textura) característica de la especie.

El banano, durante la maduración, el contenido de almidón decrece desde el 20-30 % (dependiendo de la variedad) al 1 %-2% en el fruto maduro, mientras que el contenido de azúcares solubles aumenta del 1% al 20-21%.

Durante la maduración de bananos aumenta el contenido de hidratos de carbono sencillos por lo que el dulzor típico de las frutas maduras aumenta, a su vez los ácidos van disminuyendo con la maduración desapareciendo el sabor agrio y la astringencia, para dar lugar al sabor suave y al equilibrio dulzor- acidez de los frutos maduros. (Ordoñez, A., 2005)

La transformación casi total del almidón en azúcares tiene doble efecto al alterar tanto el gusto como la textura del producto. La degradación de los hidratos de carbono poliméricos, especialmente la de las sustancias pépticas y hemicelulosas, debilita las paredes celulares y las fuerzas cohesivas que mantienen unas células unidad a las otras.

La maduración del banano va ligada a una variación del color de verde a amarillo, la primera señal del inicio de la maduración es la desaparición del color verde, producido por la degradación de las clorofilas. (Ordoñez, A., 2005)

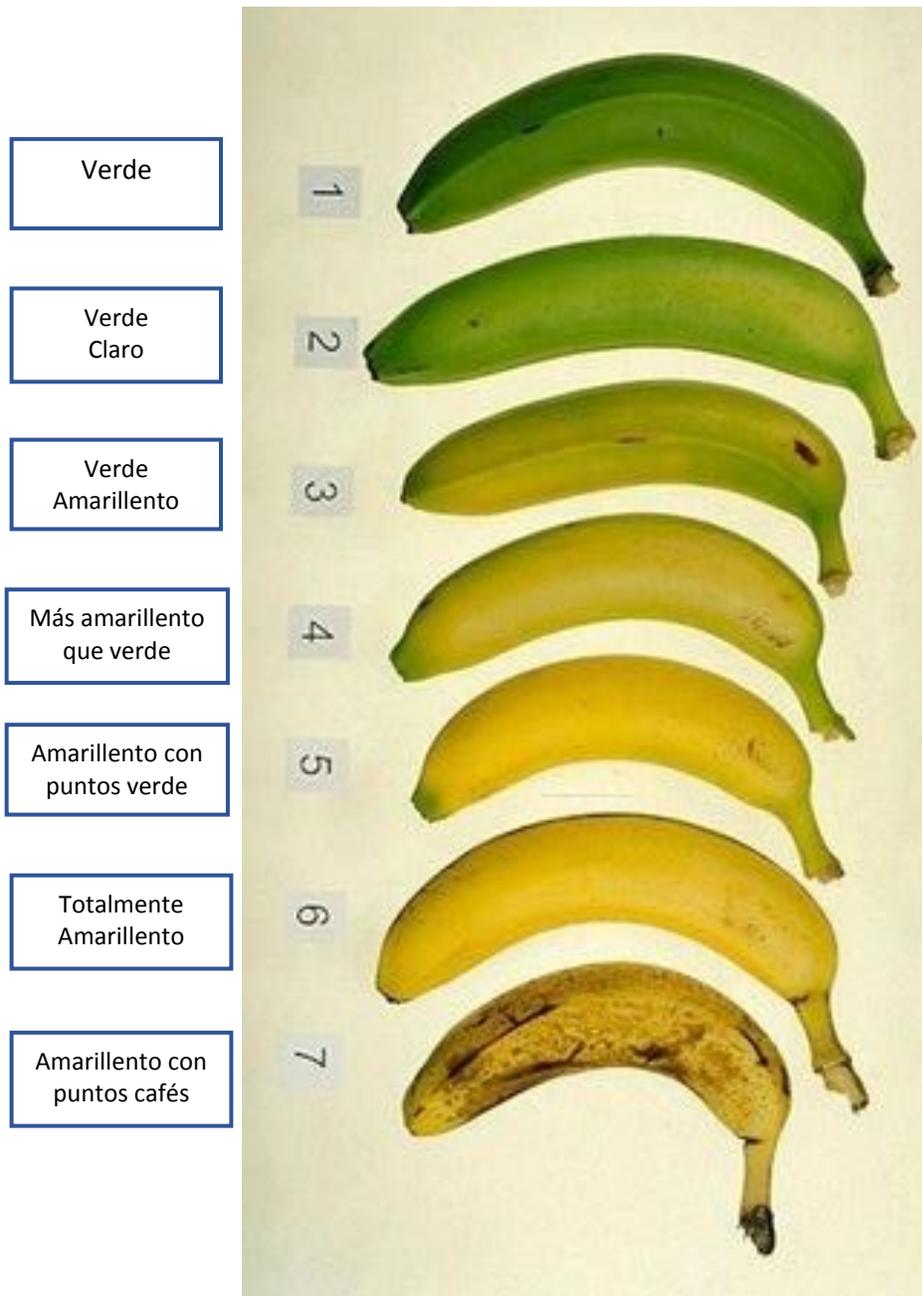


Figura 1: Clasificación de la fruta de acuerdo a su grado de maduración

A. Fuente: Proceso fisiológicos y sistemas de postcosecha. Carlos Demerutis P. Costa Rica. 1996

2.2 Carbohidratos

Los carbohidratos son compuestos orgánicos constituidos por carbón, hidrógeno y oxígeno. En su forma más sencilla la fórmula general es $C_nH_{2n}O_n$. Varían desde azúcares simples que contienen de tres a siete átomos de carbono hasta polímeros muy complejos. Sólo las *hexosas* (azúcares de seis carbonos) y las *pentosas* (azúcares de cinco carbonos) y sus polímeros tienen importancia en la nutrición (Badui *et. al.*, 2006).

2.2.1. Clasificación

La clasificación de los carbohidratos refleja el hecho de que todas las formas, desde la glucosa hasta los de complejidad creciente, se relacionan con los azúcares simples o “sacáridos”. Los monosacáridos se hidrolizan para proporcionar dos moléculas de monosacárido. Los oligosacáridos producen de tres a 10 unidades de monosacárido y los polisacáridos proporcionan de 10 a 10 000 unidades o más.

- **Monosacáridos:** los principales que se encuentran en los alimentos naturales son la glucosa (dextrosa) y la fructosa (*levulosa*, azúcar de frutas).

Pueden tener una estructura de cadena abierta o anular. Cuando se unen entre sí, como disacáridos o polisacáridos, se conservan en forma cíclica.

- **Disacáridos:** los tres disacáridos comunes consisten en dos moléculas de monosacárido, una de ellas cuando menos es la glucosa. Así

tenemos: Sacarosa = glucosa y fructosa; Maltosa = glucosa y glucosa;
Lactosa = glucosa y galactosa

- **Polisacáridos:** la mayor parte de los polisacáridos de interés en la nutrición (almidón, dextrina, glucógeno y celulosa) son uniones de unidades de glucosa, que sólo difieren en el tipo de enlace. Otros polisacáridos pueden contener monosacáridos aparte de la glucosa, solos o combinados. Como grupo, los polisacáridos son menos soluble y más estable que los azúcares más simples (Badui *et. al.*, 2006).

El **almidón** se encuentra solo en plantas. Se presenta en forma de **amilosa** (cadenas rectas largas de unidades de glucosa) y en forma de **amilopectina** (cadenas ramificadas de unidades de glucosa). La proporción de cada forma determina la naturaleza del almidón, que es típica para cada especie vegetal. Los gránulos de almidón de diferentes tamaños y formas se encuentran en las células de plantas recubiertos por paredes de celulosa. Son insolubles en agua fría (Badui *et. al.*, 2006).

El almidón de los alimentos modificados es un agente popular para espesamiento que se utiliza en alimentos comerciales preparados. Y aunque difiere estructuralmente, el valor energético es igual al del almidón natural. El proceso de modificación permite conservar las propiedades de espesamiento deseables después del enfriamiento y almacenamiento, que suelen perderse en el almidón usual (Badui *et. al.*, 2006).

Las *dextrinas* son productos intermedios que ocurren en la hidrólisis del almidón. Se forman durante el proceso de la digestión y también como resultado de diversos procesos comerciales en los que se utilizan ácido, enzimas o calor seco. A medida que disminuyen de tamaño, aumentan la solubilidad y la dulzura de las moléculas de sacáridos. Estas propiedades tienen aplicaciones comerciales en productos como el jarabe de maíz, que tienen un contenido alto en dextrinas (Badui *et. al.*, 2006).

Desde el punto de vista químico, el almidón es una mezcla de dos polisacáridos muy similares, la amilosa y la amilopectina; el primero es producto de la condensación de D-glucopiranosas por medio de enlaces glucosídicos α (1,4), que establece largas cadenas lineales con 200-2 500 unidades y pesos moleculares hasta de un millón; es decir, la amilosa es una α -D- (1,4)-glucana, cuya unidad repetitiva es la α -maltosa. Tiene la facilidad de adquirir una conformación tridimensional helicoidal (figura 02), en la que cada vuelta de la hélice consta de seis moléculas de glucosa (Badui *et. al.*, 2006).

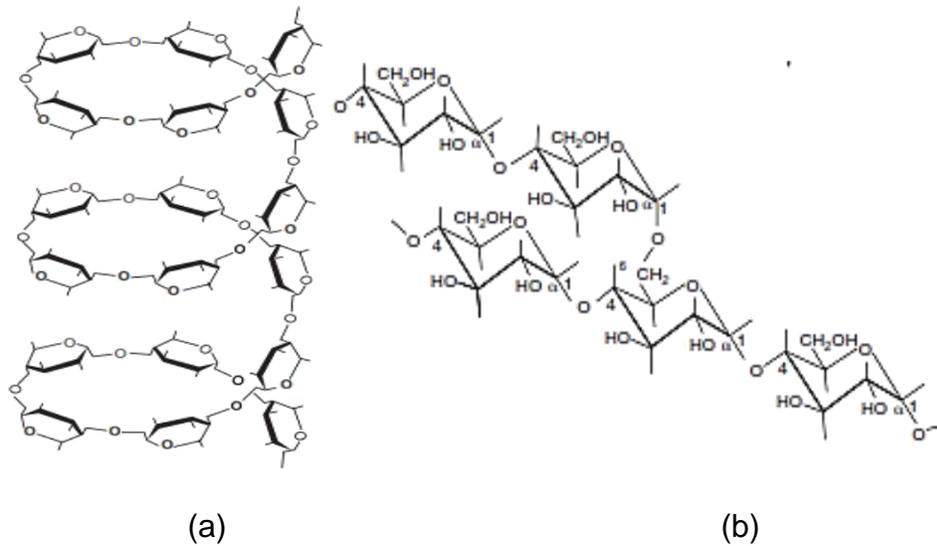


Figura 2: (a) Enrollamiento helicoidal de la amilosa. (b) estructura

Fuente: Badui et. al., (2006)

Existen diferentes métodos de extracción de almidón aplicables a diferentes materiales vegetales, sin embargo, por las diferencias en la composición, no todos son aplicables al plátano. Los métodos de extracción del almidón a partir de los residuos de fruto de plátano incluyen: extracción en seco y extracción húmeda (Mazzeo et al., 2008; Flores Gorosquera et al., 2004). El método de extracción en seco permite extraer el 49.62% del almidón del plátano, mientras que el húmedo permite extraer el 56.76%. Aunque el método húmedo presenta mayores rendimientos, su costo es más elevado ya que consume grandes cantidades de agua, genera un efluente líquido con elevada carga orgánica y requiere mayor tiempo y espacio. Por otro lado el método seco es más económico ya que requiere una menor inversión en área y equipamiento, y no consume agua, generando así menores impactos ambientales

2.3. Enzimas

Las enzimas son biomoléculas de naturaleza proteica que aceleran la velocidad de reacción hasta alcanzar un equilibrio. Constituyen el tipo de proteínas más numeroso y especializado y, actúan como catalizadores (sustancias que aumentan la velocidad o proporción de las reacciones químicas sin que ellas cambien en el proceso) de reacciones químicas específicas en los seres vivos o sistemas biológicos (Cremosi, P. *et al.*, 2002). Muchas de las enzimas no trabajan solas, se organizan en secuencias, también llamadas rutas metabólicas, y muchas de ellas tienen la capacidad de regular su actividad enzimática (Lehninger, A. *et al.*, 2006).

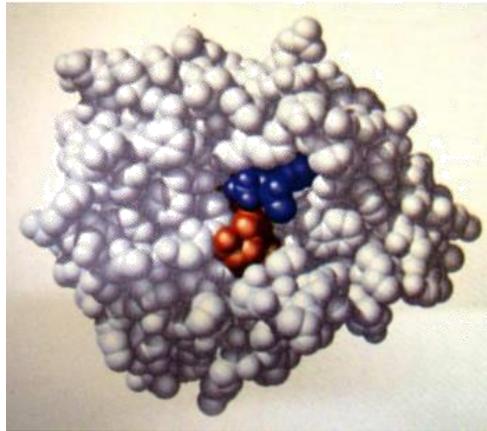


Figura 3: Enzima

Fuente: Lehninger, A. et. al., (2006).

2.3.1. Estructura de las enzimas

Las enzimas son proteínas globulares formadas por una o más cadenas polipeptídicas plegadas, creando una “hondonada” donde encaja el sustrato y tiene lugar la reacción. Esta zona de la enzima se denomina centro activo y sólo unos pocos aminoácidos están implicados en él. La proximidad de los aminoácidos en el centro activo está determinada por la estructura terciaria, aunque también pueden ocupar posiciones adyacentes en la estructura primaria. En una enzima con estructura cuaternaria, los aminoácidos del centro activo pueden encontrarse incluso en diferentes cadenas. La configuración tridimensional del centro activo es complementaria a la del sustrato y posee una distribución complementaria de sus cargas sobre la superficie de unión. Es decir, si una región del sustrato tiene una carga negativa, la zona correspondiente del centro activo

tendrá una carga positiva y viceversa (Lehninger, A., 2006). En 1894, Emil Fischer, un químico alemán, comparó la especificidad de la enzima con una llave y su cerradura (Aldabe J. *et. al.*, 1998).

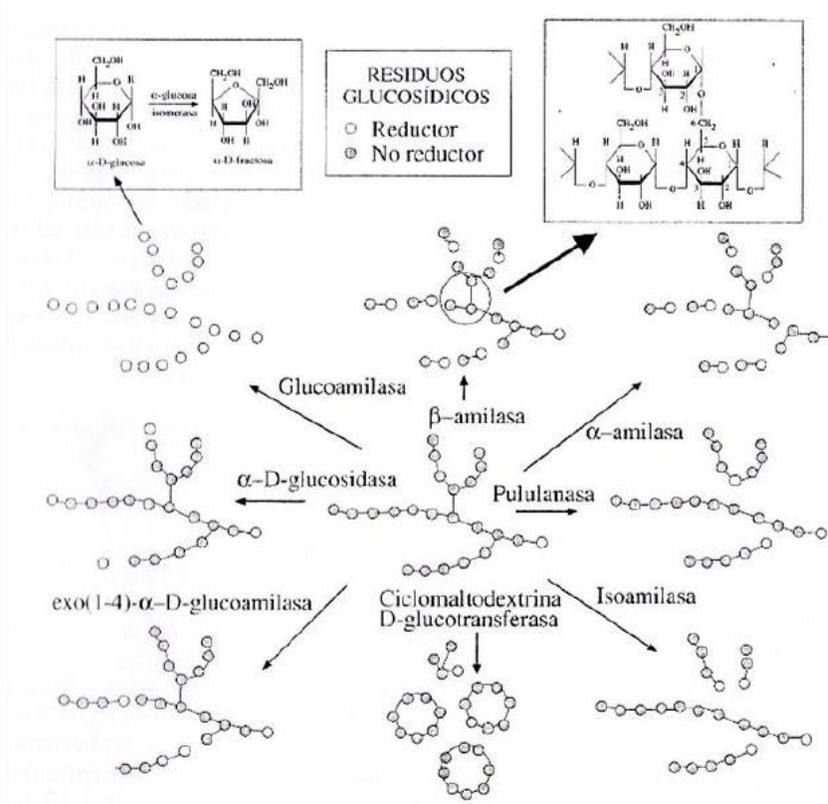


Figura 4: Enzimas que intervienen en la hidrólisis del almidón

2.3.2. Mecanismo de acción de las enzimas. Catálisis enzimática.

a) Energía de activación

En toda reacción química se produce la transformación de unas moléculas iniciales denominadas sustratos (S) en las reacciones bioquímicas, en unas sustancias finales o productos (P). Esta transformación necesita, en la mayoría de las reacciones, un aporte inicial de energía que aumenta la

energía cinética de las moléculas y éstas, reaccionan permitiendo que un mayor número de ellas, choquen con suficiente fuerza para superar su repulsión mutua y debilitar los enlaces químicos que poseen. La energía que deben poseer las moléculas para iniciar la reacción se conoce con el nombre de energía de activación (Lehninger, A. *et al*, 2006).

b) El catalizador

Un catalizador disminuye la energía de activación necesaria para una reacción, porque forma una asociación pasajera con las moléculas que reaccionan. Esta asociación aproxima a las moléculas que reaccionan y, favorece tanto la ruptura de enlaces existentes, como la formación de otros nuevos. Cuando existe un catalizador en la energía de activación, esta reacción puede suceder rápidamente sin o con poca adición de energía. El catalizador no sufre ninguna alteración permanente en el proceso y puede volver a utilizarse. Gracias a las enzimas, las células son capaces de desarrollar reacciones químicas a gran velocidad y a temperaturas relativamente bajas (Aldabe J. *et. al.*, 1998; Cremosi, P. *et al*, 2002).

c) Reacciones enzimáticas

En estas reacciones, la enzima (E) se une al sustrato (S) para formar el complejo enzima-sustrato (ES). Después tiene lugar la transformación del sustrato (S) en producto (P), liberándose el producto (P) y quedando libre la

enzima (E) para una nueva unión con el sustrato (Lehninger, A. *et. al.*, 2006).

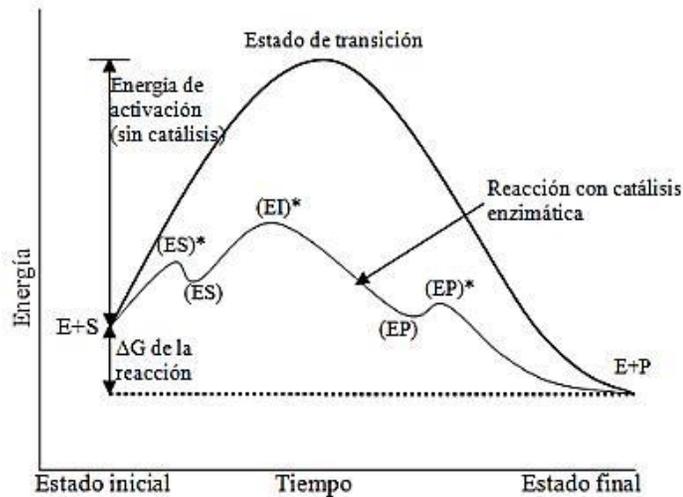


Figura 5: Energía de activación

Fuente: Lehninger, A. *et. al.*, (2006).

La figura 04 describe la diferencia de energía que necesita una reacción no catalizada (línea más gruesa) y la misma reacción con catálisis enzimática (línea fina). (ES) significa la unión de la enzima y el sustrato, (EI) la enzima con el compuesto intermedio y, (EP) la enzima con el producto. Los asteriscos significan los estados de transición correspondientes a cada complejo ES, EI y EP.



Las enzimas, como los demás catalizadores, aceleran la reacción sin alterar la posición de equilibrio (Lehninger, A. *et. al.*, 1995). En una reacción química tenemos:

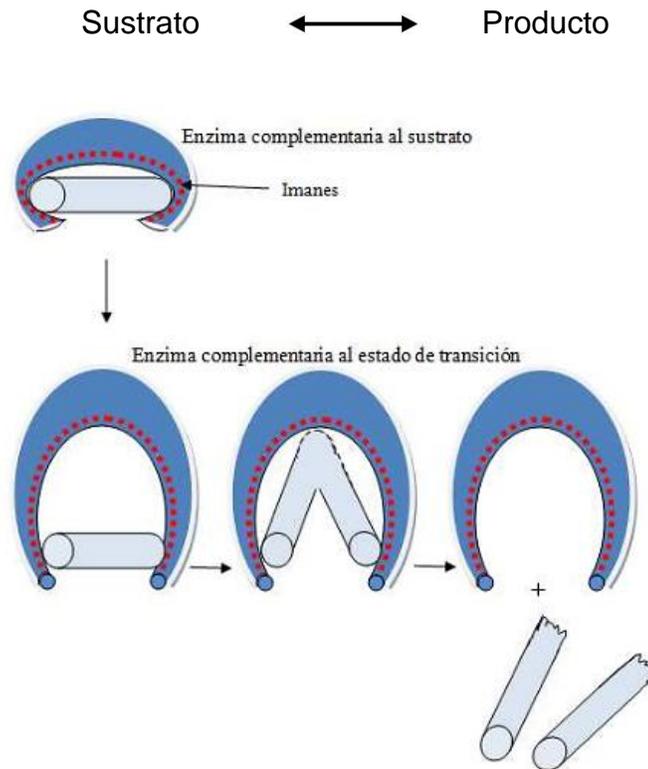


Figura 6: Esquemas de la reacción enzimática

Fuente: Lehninger, A. *et. al.*, (1995).

- **Efecto de las concentraciones de enzima y de sustrato**

La actividad enzimática viene limitada por diferentes factores como puede ser la concentración de enzimas, de sustrato y la disponibilidad de cofactores. La velocidad de la reacción está relacionada directamente con la concentración de la enzima y esta velocidad es diferente para cada enzima. Cuando la concentración de la enzima es constante, la velocidad aumenta hasta alcanzar un máximo ($V_{m\acute{a}x}$, velocidad máxima) (Aldabe, J. *et. al.*, 1998) aunque la concentración del sustrato siga aumentando. Todas

las moléculas de enzima están ocupadas por moléculas de sustrato y la velocidad no puede aumentar (Figura 05). Existe un periodo inicial denominado estado pre-estacionario que es cuando la enzima se mezcla con el gran exceso de sustrato y durante el cual, aumenta la concentración ES. Seguidamente aparece el estado estacionario donde ES permanece constante en el tiempo. Las células regulan la velocidad de las reacciones enzimáticas mediante la regulación de las concentraciones de la enzima. Muchas enzimas son degradadas rápidamente y se sintetizan sólo cuando se necesitan. Otras, se segregan en forma inactiva y se activan cuando se necesitan (Aldabe, J. *et. al.*, 1998).

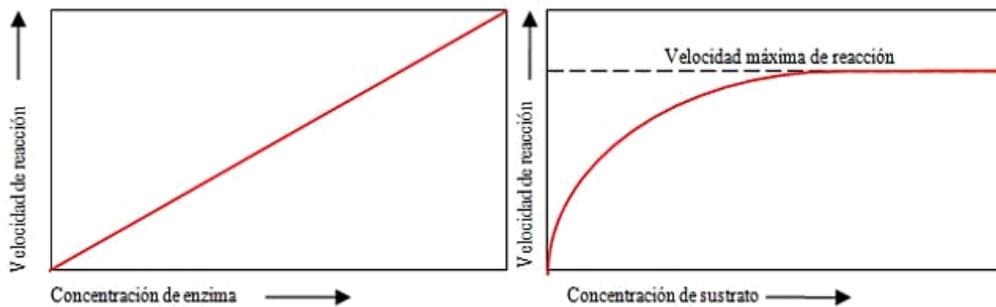


Figura 7: Efecto de la concentración de enzima y sustrato.

Fuente: Aldabe, J. *et. al.*, (1998).

- **Efectos de la temperatura y del pH**

La temperatura

Cada enzima tiene una temperatura óptima de actuación. Por debajo y por encima de esta temperatura, la enzima ralentiza la velocidad de la reacción

enzimática. Se observa que muchas de las enzimas, duplican la velocidad de una reacción enzimática cuando se aumenta la temperatura de unos 10° C aproximadamente y luego cae muy rápidamente por encima de los 40° C (Figura 06). El aumento en la velocidad de reacción se produce porque con temperaturas más altas, existen más moléculas de sustrato con suficiente energía para reaccionar; la disminución de la velocidad de la reacción es debida a la desnaturalización de la enzima (la mayoría de las proteínas globulares se desnaturalizan por encima de 60 - 70°C) (Aldabe, J. *et. al.*, 1998)

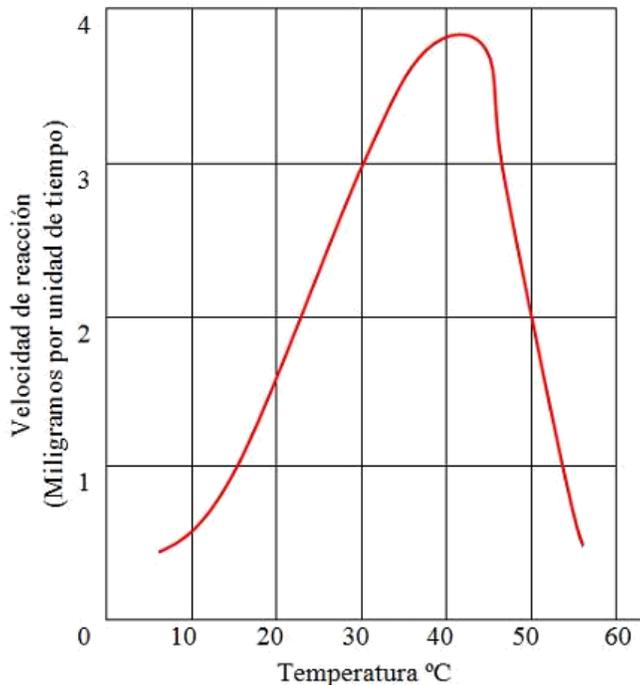


Figura 8: Efecto de la temperatura en la velocidad de reacción enzimática

Fuente: Aldabe, J. *et. al.*, (1998).

El pH

La actividad enzimática también viene regulada por el pH de la solución enzimática. El pH óptimo o intervalo de pH de cada enzima es diferente y cuando varía, la conformación de la enzima se altera, produciéndose un cambio en el estado de ionización de grupos del sitio activo y llegando a no ser funcional. Esto es debido a que la conformación de una proteína depende también, de las atracciones y repulsiones entre los aminoácidos cargados negativamente y los cargados positivamente. Además algunas cadenas laterales de aminoácidos pueden actuar como ácidos o bases débiles que desarrollan funciones críticas en el sitio activo del enzima (Lehninger, A. *et. al.*, 2006).

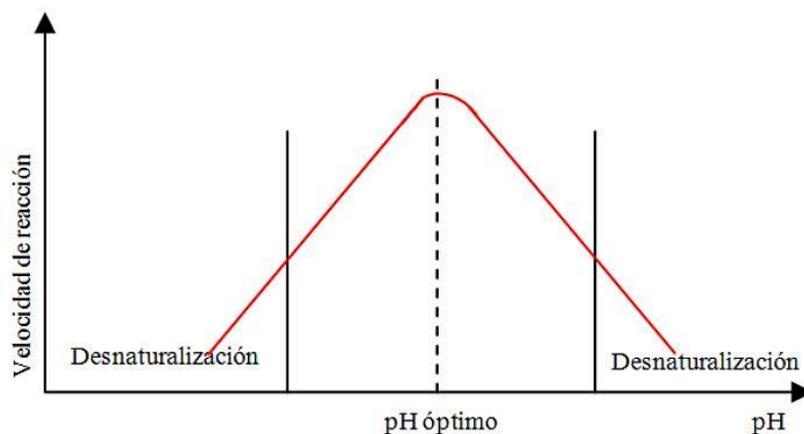


Figura 9: Efecto del pH en la velocidad de reacción enzimática

Fuente: Lehninger, A. *et. al.*, (2006)

Las enzimas pueden tener dos tipos de curvas: - La primera curva posible de la actividad enzimática es en pico. Esto significa que la enzima necesita

un control riguroso del pH del medio en el que se encuentra. El 100% de su actividad se encuentra en un pequeño intervalo entorno a un pH determinado. -La segunda posibilidad es que la enzima mantenga una actividad superior al 75% alrededor del pH óptimo. Estas curvas experimentales suelen ser facilitadas por el fabricante o vienen en documentos técnicos (Lehninger, A. *et. al.*, 2006).

2.4. Las amilasas

Las amilasas, enzimas glucolíticas, hidrolizan los enlaces éter (glucosídicos) de las cadenas de los polisacáridos de las sustancias amiláceas, degradándolas a oligosacáridos, disacáridos y monosacáridos, que son más solubles en medios acuosos (Figura 08) (Cremosi, P. *et. al.*, 2002).

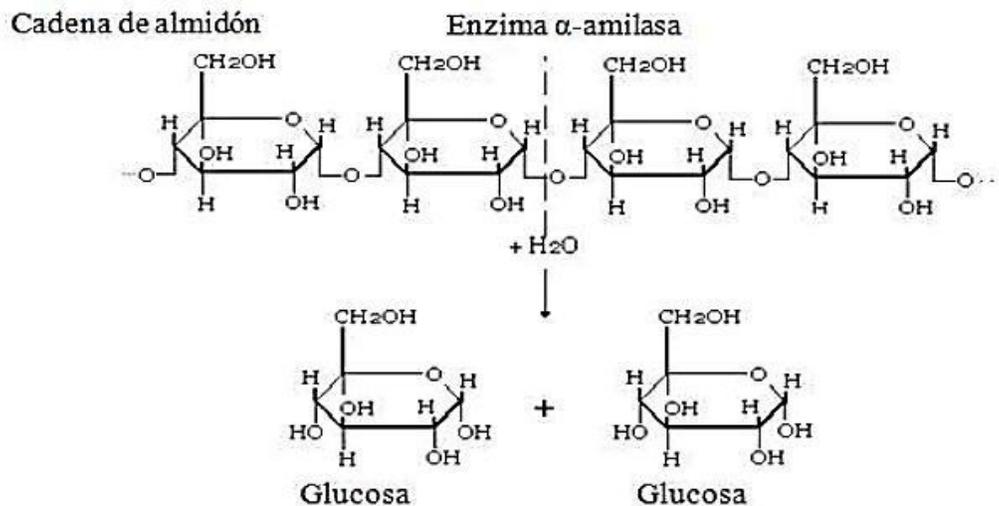


Figura 10: Hidrólisis del almidón con la amilasa

Fuente: Cremosi, P. *et. al.*, (2002).

Al igual que las proteasas, las amilasas pueden hidrolizar las uniones glucosídicas internas de los polisacáridos (endo-amilasas) y las que se encuentran en las extremidades de las cadenas (exo-amilasas). Siendo las terminales más fáciles de degradar para las amilasas que las interiores. También, se encuentran unas enzimas muy específicas llamadas glucoamilasas. Estas proteínas pueden degradar las uniones glucosídicas de las cadenas lineares que poseen uniones 1,4 glucosídicas y las uniones de las ramificaciones laterales con uniones 1,6 glucosídica (Cremoni, P. *et. al.*, 2002).

Estas enzimas que hidrolizan enlaces glucosídicos son de la clase 3.2.1 y podemos encontrar diferentes tipos de amilasas:

- Las α -amilasa (EC 3.2.1.1)
- Las β -amilasa (EC 3.2.1.2)
- Las glucoamilasa (**EC 3.2.1.3**)
- Las 1,6-glucosidasas (EC 3.2.1.9, EC3.2.1.10, EC 3.2.1.b) (Cremoni, P. *et. al.*, 2002).

2.4.1. Organismos productores de amilasas

Las amilasas son producidas por un gran número de microorganismos, plantas y animales aunque su comercialización resulta complicada ya que la mayoría las producen en baja proporción (Pandey et al., 2000).

Las α -amilasas son producidas por varias bacterias, levaduras y hongos. Las bacterias del género *Bacillus* se consideran la fuente más importante de α -amilasas. Entre los hongos, los microorganismos del género *Aspergillus* son los principales productores de α -amilasas con aplicación industrial (Pandey et al., 2000).

Las β -amilasas se obtienen generalmente de plantas. Los estudios basados en la producción microbiana de β -amilasa no son muy abundantes ya que únicamente un número reducido de microorganismos es capaz de producir este enzima. Destacan como productores de β -amilasa las bacterias del género *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Clostridium* sp. (Pandey et al., 2000).

Las glucoamilasas son producidas por numerosos tipos de hongos y algunas bacterias. La principal fuente de glucoamilasas son los hongos filamentosos donde destaca el género *Aspergillus*, y en concreto, *A. niger* y *A. awamory* (Ford, 1999). Algunos cultivos de bacterias y levaduras también se han utilizado como fuente de glucoamilasas, destacando las bacterias *Bacillus coagulans* y *Lactobacillus brevis* y las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomycopsis fibuligera* (Pretorius y Lambrechts, 1991; Pandey et al., 2000).

Los enzimas desramificantes (isoamilasas y pululanastas) son producidas por una amplia variedad de especies. Las isoamilasas se encuentran en bacterias, levaduras y plantas mientras que las pululanastas, generalmente,

son producidas por plantas superiores y por microorganismos mesófilos tales como *Klebsiella*, *Escherichia*, *Streptococcus*, *Bacillus* y *Streptomyces* (Doman-Pytka y Bardowski, 2004).

En general, los microorganismos son los principales productores de enzimas amilolíticos con aplicación industrial. En concreto las bacterias del género *Bacillus* producen las α -amilasas de interés comercial mientras que el hongo *Aspergillus niger* es el productor de las glucoamilasas que se utilizan en la degradación del almidón. En la actualidad, la demanda de amilasas termoestables está aumentando debido a que la realización de los procesos de hidrólisis a elevadas temperaturas minimiza el riesgo de contaminación microbiológica y reduce el tiempo de reacción (Pandey et al., 2000; Bertoldo y Antranikian, 2002).

2.4.2. Estructura y Función de las Amilasas

➤ Clasificación estructural de las glucoamilasas.

Existen diversos sistemas de clasificación para los enzimas.

El criterio utilizado por la IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) se basa fundamentalmente en la especificidad de sustrato. A cada enzima se le asigna un código que comienza por las letras EC (Enzyme Commission) seguido de una numeración de cuatro

dígitos que especifica su actividad enzimática. Así por ejemplo, todas las glicósido hidrolasas (carbohidrasas) se clasifican con el código EC 3.2.1.X, donde X especifica la actividad concreta del enzima. Dentro de los enzimas amilolíticos, las α -amilasas tienen el código EC 3.2.1.1, las β -amilasas el EC 3.2.1.2 y las glucoamilasas el EC 3.2.1.3. Esta clasificación no refleja las características estructurales de los enzimas.

Los tres tipos fundamentales de amilasas, α -amilasas, β -amilasas y glucoamilasas, constituyen tres familias bien diferenciadas (familias 13, 14 y 15, respectivamente), dentro de las casi 100 familias de glicósido hidrolasas que aparecen definidas en el servidor CAZy (Carbohydrate Active Enzymes) (Machovic y Janecek, 2007).

Las glucoamilasas con relevancia biotecnológica son, en general, enzimas de origen fúngico, aunque bacterias y arqueas también producen este enzima. Junto con otros enzimas relacionados (glucodextransas) se clasifican en la familia 15 de glicósido hidrolasas (familia 15GH). La familia 15 engloba a todas los enzimas con actividad glucoamilasa y actividad glucodextranasas (Machovic y Janecek, 2007).

Tabla 3: Organismos productores de enzimas amilolíticas pertenecientes a la familia 15

FAMILIA 15	ACTIVIDAD	GLUCAMILASA GLUCODEXTRANASA	
ORGANISMOS PRODUCTORES	ARQUEAS Methanococcus jannaschii Sulfolobus solfataricus	BACTERIAS Arthrobacter globiformis (1UG9) Clostridium thermoamylolyticum Streptomyces hygroscopicus Thermoactinomyces vulgaris (Crist) Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum (1LF6) Xantomonas oryzae vulgaris (Crist) Thermoactinomyces Thermoanaerobacter thermosaccharolyticum (1LF6) Xantomonas oryzae	EUCARIOTAS Arxula adenivorans Aspergillus awamori (1AGM) Aspergillus niger Aspergillus oryzae Athelia roffsii Fusarium venenatum Hormoconis resinae Neurospora crassa Rhizopus oryzae Saccharomyces cerevisiae Saccharomyces fibuligera (1AYX) Schizosaccharomyces pombe Talaromyces emersonii Thermomyces lanuginosus Yarrowia lipolytica Hormoconis resinae Fusarium venenatum Neurospora crassa Rhizopus oryzae Saccharomyces Cerevisiae Saccharomyces fibuligera Schizosaccharomyces Talaromyces emersonii Hermomyces Yarrowia lipolytica anuginosus

Fuente: Henrissat, (1991)

Entre las arqueas, se han caracterizado glucoamilasas pertenecientes a organismos termorresistentes como *Sulfolobus solfataricus* (Kim et al., 2004) y *Methanococcus jannaschii* (Uotsu-Tomita et al., 2001). Entre las glucomilasas de bacterias destacan las de *Clostridium thermosaccharolyticum* (Specka et al., 1991), *Thermoactinomyces vulgaris* (Uotsu-Tomita et al., 2001) y *Thermoanaerobacterium*

thermosaccharolyticum cuya estructura tridimensional ha sido resuelta (Ducki et al., 1998). Dentro de eucariotas el grupo de glucoamilasas fúngicas es uno de los más numerosos destacan especialmente las glucoamilasas del género *Aspergillus* por su interés industrial (Bhella y Altosaar, 1987; Wallis et al., 1999; Paldi et al., 2003; Nakamura et al., 2006) y la GA de la levadura *Saccharomycopsis fibuligera* que se ha expresado en bacteria (Solovicova et al., 1996) y está resuelta tridimensionalmente (Sevcik et al., 1998).

La hidrólisis del enlace glicosídico llevada a cabo por carbohidrasas de distinto tipo, tiene lugar mediante una catálisis ácida que requiere de la actuación de dos residuos aminoacídicos localizados en el centro activo de la enzima, en la mayor parte de los casos aspártico o glutámico. Uno de ellos actúa como donador de un protón y el otro como nucleófilo/base. Esta hidrólisis puede ocurrir a través de dos mecanismos diferentes que dan como resultado la retención o la inversión de la configuración del carbono anomérico (Zechel y Withers, 2000). La disposición espacial y distancia entre los residuos catalíticos es diferente según sea el mecanismo de hidrólisis del enlace. Los enzimas de la familia 15GH actúan mediante el mecanismo de inversión de configuración del carbono anomérico y presentan dos ácidos glutámicos como residuos catalíticos. Existe, en eucariotas, un tipo distinto de glucoamilasas que se agrupan en la familia 31GH que pertenece al clan GH-D. Esta familia incluye la glucoamilasa intestinal humana. Las glucoamilasas de la familia 31GH se caracterizan

porque actúan con un mecanismo de retención de configuración del carbono anomérico (Naim et al., 1991; Nichols et al., 2003).

2.5. Fermentación

Una fermentación es una reacción de oxidación reducción interna equilibrada en la que algunos átomos se reducen mientras otros se oxidan, y la energía se produce por fosforilación a nivel de sustrato. Una ruta bioquímica muy usada para la fermentación de la glucosa es la glucólisis, también denominada vía de Embden-Meyerhof (Madigan et al., 2003). La fermentación anaeróbica constituye el tipo más sencillo y primitivo de mecanismo biológico que permite la obtención de energía de las moléculas nutritivas, mediante reacciones de oxidación y reducción. En este proceso, el etanol es una molécula relativamente reducida que se produce junto con el CO₂ que es una molécula relativamente oxidada (Madigan et al., 2003).

La fermentación alcohólica es el proceso por el que los azúcares contenidos en el mosto se convierten en alcohol etílico. Para llevar a cabo este proceso es necesaria la presencia de levaduras, las cuales extraen energía química de las moléculas de glucosa y de otros combustibles en ausencia de oxígeno molecular para producir etanol. En la primera parte, el átomo de carbono del piruvato es atacado por el pirofosfato de tiamina y experimenta una descarboxilación; la coenzima queda en la forma de 2-hidroxi-etil, derivado que puede considerarse una forma del acetaldehído activado o ligado a la coenzima. En la etapa final al acetaldehído se reduce

a etanol y el potencial de reducción es proporcionado por el NADH^+ , en una reacción catalizada por la alcohol-deshidrogenasa. Las reacciones de la fermentación alcohólica se consideran completas cuando hay formación de ATP a partir de fosfatos. En realidad, este proceso no puede ocurrir sin la simultánea fosforilación oxidativa del ADP (Madigan et al., 2003).

Durante la etapa de crecimiento de los cultivos, los mismos son sometidos a una oxigenación fuerte, mediante la aireación del medio, lo que permite la utilización de la glucosa por oxidación completa. Este proceso genera una gran cantidad de energía que en parte es fijada mediante el sistema ADP-ATP y posibilita el desarrollo de reacciones de síntesis celular que consumen gran cantidad de energía. Una vez que el cultivo en el fermentador ha alcanzado el número de células necesario para la degradación óptima de la materia prima se elimina la aireación y las condiciones anaeróbicas se establecen en el medio por el consumo de oxígeno remanente y el desprendimiento de CO_2 . En las condiciones anaerobias, el aporte de energía a las células es muy pequeño comparado con el de la respiración y con las necesidades energéticas de la síntesis lo que implica que en estas condiciones no se produzca el crecimiento celular. La experiencia indica, no obstante, que aun en condiciones anaerobias existe una mínima reproducción celular a expensas y acorde con el pequeño aporte energético recibido por la célula. Este fenómeno es conocido como “Efecto Pasteur” (Madigan et al., 2003).

2.5.1. Microorganismo: *Saccharomyces cerevisiae*

En la industria se utiliza la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, al ser considerada como la mayor productor de etanol a nivel mundial. Este hecho se evidencia en un sin número de atributos que para tal fin presenta esta levadura, como por ejemplo su capacidad de respiración tanto aerobia como anaeróbica, y la utilización de sustratos como glucosa, fructuosa, galactosa, maltosa, entre otros (Tuite y Oliver, 1991). *Saccharomyces cerevisiae* es uno de los microorganismos más atractivos para trabajar, se ha comprobado a través de la historia que no es patógeno, ya que se ha utilizado en las industrias alimentarias y ha sido calificado como un organismo GRAS (Generally Recognized as Safe) (Ostergaard et al., 2000). Así mismo, posee un gran potencial para la producción de etanol fermentando la glucosa, soportando altas concentraciones de la misma, logrando altos niveles de producción y rendimiento (Chandrakant y Bisaria, 2000).

2.6. Antecedentes:

- “Efecto de tres pre-tratamientos de cáscara de banano para la obtención de jarabe glucosado mediante hidrólisis enzimática” cuyo objetivo 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, obteniendo que 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.
- “Cuantificación de azúcares reductores en las cáscaras de naranja y banano” en este trabajo se evaluó la hidrólisis ácida de la cáscara de banano y de naranja para la extracción de azúcares presentes en la biomasa de dicho material, para ello se cuantificó la cantidad de azúcares reductores presentes en las muestras de cáscara de naranja y cáscara de banano.
- Estudio experimental de obtención de bioetanol a partir de residuos agrícolas de banano orgánico en Piura”, para lo cual se realizó pretratamiento, deslignificación, hidrólisis enzimática, fermentación y destilación. La hidrólisis enzimática se realizó con enzimas celulolíticas Cellic Ctec 2 (Novozymes), alcanzando un rendimiento del 29%.

Asimismo, se desarrolló el proceso de fermentación, sin haberse podido determinar la cantidad de glucosa presente. Se consiguió un destilado de 92% de pureza en peso y un rendimiento etílico de 0,078 g de etanol/g de biomasa.

- “Producción de etanol a partir de la cáscara de banano y de almidón de yuca” En este trabajo se evaluó la hidrólisis ácida del almidón presente en yuca y de la celulosa presente en cáscara de banano y su posterior fermentación a etanol, se ajustaron los medios de fermentación para los microorganismos *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-2034 y *Zymomonas mobilis* CP4. La hidrólisis ácida de cascara de banano produce 20 g/l de azúcares reductores. Para la fermentación realizada con *Sacharomyces cerevisiae* se logra una concentración de etanol de $7.92 \pm 0.31\%$ y no se aprecia una producción considerable de etanol (menor de 0.1 g/l) para ninguno de los medios fermentados con *Zymomonas mobilis*.
- “Obtención de azúcares fermentables por degradación fúngica de cáscara de banano (Cavendish valery)” en el cual se estudió la obtención de glucosa mediante usando cáscara de banano como sustrato en tres concentraciones a las cuales se le aplicó tres tipos de pretratamientos: molido, troceado e hidrotérmico con la finalidad de debilitar las fibras y tener acceso a las moléculas de celulosa y almidón para obtener azúcares fermentables.

2.7. Justificación e importancia del problema

Debido a la creciente necesidad y al cambio global que se está presentando, se busca cualquier oportunidad de reutilización de los residuos para fortalecer su capacidad de mejoramiento continuo, y como se sabe las nuevas tendencias que se buscan en el sector energético no es la excepción. Por esto, se ha tornado una necesidad crear nuevas oportunidades que sean más amigables con el medio ambiente.

El desarrollo y búsqueda de nuevos mecanismos biotecnológicos que permitan mitigar los daños ocasionados por la degradación de productos naturales es de mucha importancia, especialmente para aquellos producidos a gran escala por su uso en la alimentación. Esta degradación da lugar a la producción de gases tóxicos y de efecto invernadero, atracción de vectores y producción de lixíviaños (Morales y Uribe. 1985; Fuentes y Bayona, 1994), que tienen consecuencias a corto, mediano y largo plazo. Una de las alternativas a este problema es aprovechar estos desechos y transformarlos en productos de interés, por esta razón nuestra atención se centra en el sector bananero, ya que luego de realizar el consumo del fruto se acumula una gran cantidad de materia vegetal que se podría utilizar como biomasa para la producción de jarabe de glucosa y su posterior fermentación a Bioetanol.

Es por ello, que el presente trabajo propone el uso de este material lignocelulósico, que posee un importante contenido de almidón, para la obtención de azúcares fermentables mediante un proceso de hidrólisis usando enzimas con actividad glucoamilolítica. Cabe destacar que el empleo de enzimas tiene muchas ventajas por su origen natural y por lo tanto no son tóxicas; son muy específicas, por lo que no propician reacciones secundarias indeseables; funcionan en condiciones moderadas de temperatura y pH y no requieren de condiciones de procesamiento drásticas que puedan alterar la naturaleza del alimento, ni del equipo, actúan a bajas concentraciones y son fácilmente inactivadas una vez alcanzado el grado de transformación deseado (Hough, 1990).

2.8. Objetivos

a) Objetivo general:

- Optimizar los parámetros de las concentraciones de glucoamilasa y almidón de cáscara de banano (*Cavendish valery*), para la obtención de jarabe de glucosa.

b) Objetivos específicos:

- Determinar la composición físico-química de la cáscara de banano (*Cavendish valery*).
- Determinar las condiciones óptimas de la glucoamilasa de temperatura y pH para la glucoamilasa.
- Determinar la actividad enzimática y parámetros cinéticos para la enzima glucoamilasa.
- Determinar las concentraciones de almidón de cáscara de banano (*Cavendish valery*) y glucoamilasa según diseño experimental para la obtención de jarabe de glucosa.
- Cuantificar la presencia de glucosa en el hidrolizado mediante el kit enzimático monlabtest
- Realizar una fermentación alcohólica del hidrolizado con la cepa *Saccharomyces cerevisiae* para confirmar el producto obtenido.

2.9. Problema

¿Cuáles serán las concentraciones de enzima y almidón de cáscara de banano para la obtención de jarabe de glucosa a partir de cáscara de banano?

2.10. Hipótesis

Utilizando las concentraciones óptimas de 4 % de almidón de cáscara de banano y de 0.06% de glucoamilasa se obtendrá glucosa (g/L) .

Por tanto las variables de estudio son:

Tabla 4: Variables de la investigación

Variables Independientes	X₁: [Enzima Glucoamilasa] : 0.06% X₂: [Sustrato] : 4%
Variable Dependiente	Glucosa: 4.4 g/L.

III. METODOLOGÍA

3.1. Materiales, equipos e Instrumentos

3.1.1. Materiales

3.1.1.1. Materia Prima

A) Cáscara de Banano

La materia prima fue adquirida del Centro Comercial “Mercado La Perla”, ubicado en la ciudad de Chimbote. La fruta es de la variedad Cavendish valery, proveniente de la ciudad de Piura.

B) Enzima:

La enzima utilizada, Glucoamilasa; pertenece a la empresa Novozyme.:

Especificaciones:

Actividad Enzimática : 750 AGU/g

AGU = AmyloGlucosidasa Unit

Temperatura : 60 – 70 °C

pH : 4.5 – 5.5

Origen de alfa-amilasa: Fúngico (*Aspergillus niger*)

C) Microorganismo:

Saccharomyces cerevisiae ATCC 4126

3.1.1.2. Reactivos

- Ácido acético glacial 10%
- NaOH 17.5%
- Peróxido de hidrogeno
- H₂SO₄ a 72% (50ml)
- Agua destilada
- Reactivo Bradford
- Buffer acetato (pH 4.5; 5;
5.5) Ácido acético
Acetato de sodio
- Kit enzimático MonlabTest
- Reactivo DNS

3.1.1.3. Materiales

- Tubos de ensayo
- Varilla de vidrio
- Pipetas
- Probeta
- Vasos de precipitación
- Matraz Erlenmeyer
- micro pipeta

- Tubos de centrifugación
- Tubos para espectrofotómetro
- Viales
- Gradilla
- Trípode
- Pera de succión
- Balón de gas
- Olla a presión

3.1.2. Equipos e Instrumentos

- **Minireactor** de 250 ml
- **Shaker:** SARTORIUS STEDIUM BIOTECH CERTOMAT
- **Centrifuga:** SIGMA (2 – 16 pk) SARTORIUS
- **Refrigerador**
- **pH metro:** marca Inolab, pH (-2,000 + 16.000), temperatura (-5 100 °C)
- **Agitador magnético:** marca NuVOVA
- **Brix I157** AUTOMATIC REFRACTOMET
- **Baño maría:** marca Biotron BTR-65, temperatura de trabajo (25-80°C)
- **Espectrofotómetro:** Marca UNICO 2800 UV/VIS
- **Balanza analítica:** Marca Climatec S. A.
- **Horno:** Marca P-selecta temperatura de trabajo (0-220°C)
- **Agitador de tubos:** Marca Maxi Mix II, vortex Mixer series 871, modelo M37615.

- **Cromatógrafo de Gas Shimadzu modelo 2010:** Con detector de ionización de flama (GC-FID), equipado con columna capilar de Silice fundida PAG Restek, de carácter multipolar, con las siguientes dimensiones: (30 m de comprimido x 0.25 mm de diámetro interno). Se usara el Helio como gas de arrastre, gas de hidrogeno y aire, todos con alto grado de pureza (99.99 %).

3.2. Diseño Experimental

3.2.1. Diagrama General de la Experiencia

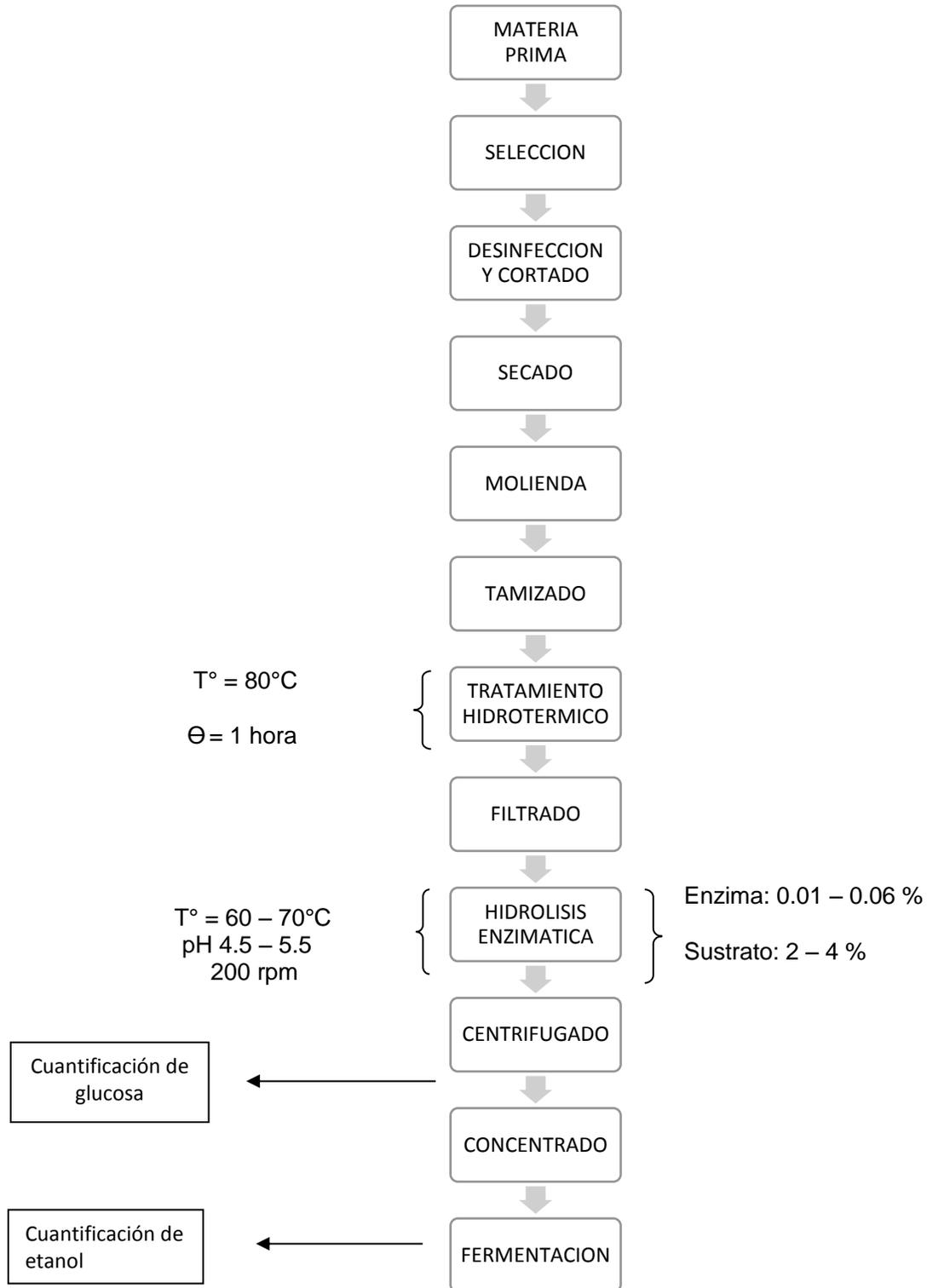


Diagrama 1: Etapas para la obtención de azúcares fermentables.

3.2.2. Descripción de las Etapas del Diagrama de Flujo Experimental

- **Selección y Clasificación**

Se utilizó cáscaras de banano (Canvendish valery), provenientes del Centro Comercial “Mercado La Perla”, la cual fue seleccionada y desinfectada para evitar la presencia de hongos o algunas impurezas, que puedan interferir con los resultados.



Figura 11: Desinfección de la materia prima a utilizar.

- **Molienda**

El material fue cortado en trozos y secado, luego se llevó a un molino de martillo para la obtención de partículas finas.



Figura 12: Secado y molienda de la cáscara de banano

- **Tamizado**

El material molido fue tamizado hasta obtener un tamaño de partícula de luz de malla N°60, el cual se diluye en el agua y facilita la hidrólisis por ampliación del área de contacto (Mejía, 2007).



Figura 13: Tamizado de la harina de cáscara de banano.

- **Tratamiento Hridrotérmico**

El material tamizado se sometió a un proceso de tratamiento hidrotérmico, con la finalidad de liberar el almidón contenido en la muestra. Se tomó como referencia la T° de solubilización de éste. Las condiciones fueron: 80°C, 1 hora, en buffer acetato. Posteriormente fue filtrado para obtener el sobrenadante con presencia de almidón.



Figura 14: Acondicionamiento de la harina de cáscara de banano.

- **Hidrólisis enzimática**

En esta etapa se realiza el foco de estudio. Las condiciones de temperatura, agitación, pH y tiempo de hidrólisis para la enzima *Glucoamilasa*, se definieron en pruebas preliminares. Luego, se determinaron las concentraciones de enzima y sustrato para la obtención de azúcares fermentables. El rango de las variables se encuentra en el Diagrama 01.

Se utilizó un vaso de precipitación de 250ml de capacidad como reactor con una agitación de 200 rpm (Coronel y Mendoza, 2000). Al finalizar la hidrólisis se desactiva la enzima sometiéndolas a ebullición por 3 minutos y luego a una temperatura de 4 °C por 30 minutos.



Figura 15: Hidrólisis enzimática y control de temperatura en el minireactor.

- **Centrifugado**

Los sobrenadantes filtrados de los tratamientos fueron llevados a centrifugación durante 15 minutos a velocidad de 4800 rpm.



Figura 16: Centrifugación del hidrolizado

- **Cuantificación de glucosa – kit enzimático Monlabtest**

Se realizó para determinar la cantidad de glucosa obtenida en el hidrolizado de cáscara de banano.



Figura 17: Cuantificación de glucosa mediante kit enzimático.

- **Fermentación**

Se realizó para validar los resultados en la obtención de azúcares fermentables. La fermentación se llevó a cabo en matraces con la cepa *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126.

3.2.3. Esquema del Diseño Experimental

Este estudio se fundamentó en determinar los parámetros óptimos de las variables que son significativas para el proceso de obtención de glucosa a partir de cáscara de banano, para ello, el estudio se realiza en dos etapas: **la primera mediante un Screening** para evaluar las condiciones de temperatura y pH usando para ello el diseño ortogonal-taguchi; y **la segunda parte mediante la optimización** de las concentraciones de sustrato y enzima usando un diseño de superficie de respuesta.

3.2.3.1. Diseño Ortogonal – Taguchi

Se emplearon 2 variables, con un total de 9 experimentos. Como la respuesta buscada según la metodología Taguchi corresponde a "mayor es mejor", se utilizó el diseño matricial ortogonal L_93^2 . Las variables independientes fueron temperatura y pH; y la variable dependiente la concentración de azúcares totales.

Tabla 5: Diseño Ortogonal – Taguchi para temperatura y pH.

Tratamiento	Temperatura		Temperatura		Glucosa g/l
	°C	pH	°C	pH	
1	2	1	65	4.5	
2	3	2	70	5	
3	1	2	60	5	
4	3	3	70	5.5	
5	1	1	60	4.5	
6	1	3	60	5.5	
7	3	1	70	4.5	
8	2	2	65	5	
9	2	3	65	5.5	

3.2.3.2. Diseño Superficie respuesta: Concentraciones de enzima y sustrato

Se utilizó un Diseño Compuesto Central Rotable – DCCR, con dos variables independientes (concentración de enzima y concentración de sustrato) y como variable dependiente la concentración de glucosa en el hidrolizado. Este diseño contempló 11 tratamientos, de los cuales 4 corresponden a un factorial 2^2 , 3 tratamientos a los puntos centrales y 4 tratamientos a los puntos axiales con $\alpha = 1.414$. El diseño ha sido aleatorizado.

Tabla 6: Delimitantes del DCCR

	- α	-1	0	+1	+ α
X1: Sustrato	1.6	2.0	3.0	4.0	4.4
X2: Enzima	0.01	0.02	0.04	0.06	0.07

Tabla 7: Diseño Superficie Respuesta: DCCR para concentraciones de enzima y sustrato

Tratamiento	Sustrato	Enzima	Glucosa
	%	%	g/l
1	3.0	0.04	
2	3.0	0.04	
3	3.0	0.01	
4	2.0	0.02	
5	4.0	0.02	
6	4.0	0.06	
7	1,6	0.04	
8	3.0	0.04	
9	2.0	0.06	
10	4.4	0.04	
11	3.0	0.07	

3.3. Métodos

3.3.1. Análisis físico-Químico

En el análisis físico-químico se determinaron los porcentajes de almidón, lignina, holocelulosa, celulosa, cenizas y agua.

3.3.1.1.Determinación de Humedad (Método AOAC 14.003)

3.3.1.2.Determinación del contenido de Cenizas (Método AOAC14.006)

3.3.1.3.Determinación de almidón (Lotti y Galoppiini, 1986):

Método de hidrolisis por acción ácida y sucesiva medida química.

Procedimiento

Se pesa 5g de la muestra y se coloca en un matraz de 500 ml, se adiciona 100 ml de solución de ácido clorhídrico al 1% y se deja en ebullición durante 3 horas, manteniendo el volumen constante. Se enfría, filtra, se neutraliza la disolución con hidróxido de sodio al 20% y se afora a 150 ml con agua destilada, se toma 1 ml de muestra y se determinan azúcares reductores por el método de DNS. Luego se multiplica el contenido de Azúcares reductores por 0.9 y se obtiene la cantidad de almidón presente.

3.3.1.4. Determinación de Lignina (Método Klason, Schwanninger et al.,2002)

Procedimiento

Se pesa un gramo con precisión de 0.0001gr, se mezcla bien con 15ml de H₂SO₄ 72% y se deja reposar 24 horas.

Se trasvasa el contenido del vaso a un matraz de 1000 ml y se añaden 560 ml de agua destilada para pasar de H₂SO₄ 72% a H₂SO₄ 3% se mantiene en ebullición durante 4 horas, al cabo de las cuales se deja sedimentar el sólido y se filtra en una placa filtrante.

El sólido filtrado se lava con agua destilada caliente hasta que el pH del agua de lavado no sea ácido, se seca en estufa a 105°C durante 12 horas y se pesa. Se toma unos 100 mg de sólido y se calcina en mufla a 430°C durante 24 horas, obteniéndose así un porcentaje en materia orgánica (MOling)

Humedad operativa: $100/(100 - \text{Humedad de muestra})$

$$\text{lignina}(\%) = \frac{P_3 - P_2 * (\%MOling)}{p_1 * (100 - \%H)} * 100$$

P₁ : Peso inicial de la muestra

P₂ : Peso papel filtro

P₃ : Peso sólido después de las 12 horas

%MOling : Materia Orgánica

% H : Humedad Operativa

3.3.1.5. Determinación de Holocelulosa (Técnica descrita por Browning 1967)

Procedimiento

Se pesan 4 gr de muestra con precisión de 0.0001 gr en un erlenmeyer de 250 ml de capacidad y se añaden 63 ml de agua destilada.

A la suspensión se le añaden 0.2 ml de ácido acético glacial y 0.6 ml de peróxido de hidrogeno.

Se cubre y se introduce a baño maría (70-80°C), agitando de vez en cuando. Este proceso se repite dos veces más. Al finalizar la tercera hora, se coloca en baño de agua –hielo hasta que la temperatura baje a los 10°C.

Se filtra en placa filtrante, y se lava con agua destilada hasta la eliminación de la coloración amarilla.

Después se deja secar a 60°C y se pesa. Al sólido obtenido se le determina porcentajes de humedad (% Holo) y de materia orgánica (%MOholo)

$$\text{Holocelulosa}(\%) = \frac{(P_3 - P_2) \times (100\% - \%H_{\text{holo}}) \times (\%M_{\text{oling}})}{P_1 \times (100 - \%H)}$$

P₁ : Peso inicial de la muestra

P₂ : Peso papel filtro

P₃ : Peso sólido después de secar

%Hholo : % de humedad del sólido obtenido

%MOholo : % de materia orgánica obtenida

% H : Humedad Operativa

3.3.1.6. Determinación de Celulosa (Norma ANSI/ASTM, 1977b)

Procedimiento

Se pesa 1gr de holocelulosa, con precisión de 0.0001 gr, en un Erlenmeyer de 100 ml. Se añaden 5ml de NaOH 17.5% hasta consumir un total de 12.5 ml y se mantiene 30 minutos a temperatura ambiente.

Se añaden 16.5 ml de agua destilada a 20°C para pasar de NaOH 17.5% a 8.3%, se mezclan bien y se mantiene durante 1 hora a temperatura ambiente.

A continuación se filtra en placa filtrante y se lava con 50 ml de NaOH 8.3% y posteriormente con agua destilada. Se repite el lavado con NaOH 8.3% y agua destilada dos veces. Se corta la succión y se añaden 7.5 ml de ácido acético 10% y se deja en contacto 3 minutos. Se vuelve a conectar el vacío y se lava con agua destilada hasta la neutralidad del filtrado. Se seca a 105°C en estufa durante 12 horas se pesa.

Se calcula el contenido en materia orgánica del sólido obtenido (%MOcel), y el contenido en celulosa se calcula de acuerdo con la expresión:

$$Celulosa(\%) = \frac{(P_3 - P_2) \times (\%MOcel) \times (\%Holocelulosa)}{P_1 \times (\%MOholo) \times (100 - \%Hholo)} \times 100$$

P₁ : Peso inicial de la muestra

P₂ : Peso papel filtro

P₃ : Peso sólido después de secar 12 horas

%MOcel: de humedad del sólido obtenido

%Holocelulosa : Holocelulosa en porcentaje

%Hholo: % de humedad del sólido obtenido de la Holocelulosa

%MOholo : % de materia orgánica obtenida de la Holocelulosa

3.3.2. Análisis para la enzima glucoamilasa

1. Determinación con Proteínas de Bradford (método Bradford,1976)

A. Fundamento:

El método se basa en la Unión directa del colorante azul brillante de Coomassie G-250, con la estructura terciaria de las proteínas y aminoácidos específicos (enzima), lo que produce un incremento en la absorbancia en relación directa con la concentración.

B. Procedimiento:

Se prepara una solución matriz de la enzima a realizar el análisis con el buffer acetato, pH: 5.0 a una concentración de 0.1 (mg/ml). En un tubo de ensayo se agregan 0.5 ml de la disolución matriz y se añade 5ml del reactivo de Bradford, se lleva a un agitador de tubos. Se deja reposar por 5 minutos. Después se realiza la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595nm.

3.3.3. Método Glucosa-Monlabtest

A. Principio del Método

La glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenol, 4-aminofenazona (4-AF), en presencia de la peroxidasa (POD):



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra ensayada.

B. Procedimiento:

Se realiza una dilución (1:8) del hidrolizado. Luego se toma 30 μ l de la muestra diluida. Se añade 3 ml del reactivo, se mezcla y se deja incubar por un periodo de 10 minutos a 37°C. Se realiza la lectura al espectrofotómetro a una longitud de onda de 505nm.

3.3.4. Determinación de actividad enzimática:

Una unidad de actividad enzimática (símbolo U) es la cantidad de enzima que cataliza la conversión de almidón por liberación de 1 μ mol de glucosa por minuto a T y pH. Se utiliza también en combinación con otras unidades (U/mg o U/ml) para señalar respectivamente la actividad enzimática.

Procedimiento

Se realiza con la concentración de enzima que presente mayor formación de producto en un menor tiempo, se procede a calcular su actividad enzimática, tomándose como datos la cantidad de producto formado y el tiempo, en el punto donde la gráfica deja de ser lineal reportándose los datos en ($\mu\text{mol}/\text{min}$)

3.3.5. Determinación de parámetros cinéticos

Para determinar los parámetros cinéticos de Michaelis – Menten, se aplicará el método de las velocidades iniciales.

A. Principio

La velocidad de transformación de los sustratos de una reacción en los correspondientes productos en una reacción enzimática que transcurra en condiciones de estado estacionario es dependiente tanto de las concentraciones de la enzima como de los sustratos.

Normalmente, esa dependencia puede expresarse matemáticamente por la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v = V_{\text{max}} [S] / (K_m + [S])$$

La forma usual es a través de mediciones de velocidad inicial de reacción a diferentes concentraciones de aquellas sustancias que la afectan. La manera más adecuada de obtenerlos es por linealización de las ecuaciones cinéticas.



A través de la medición de intercepto o pendiente de la recta resultante es posible evaluar los parámetros V_{max} y K_m , como indica la Figura 18. En el método Lineweaver- Burke.

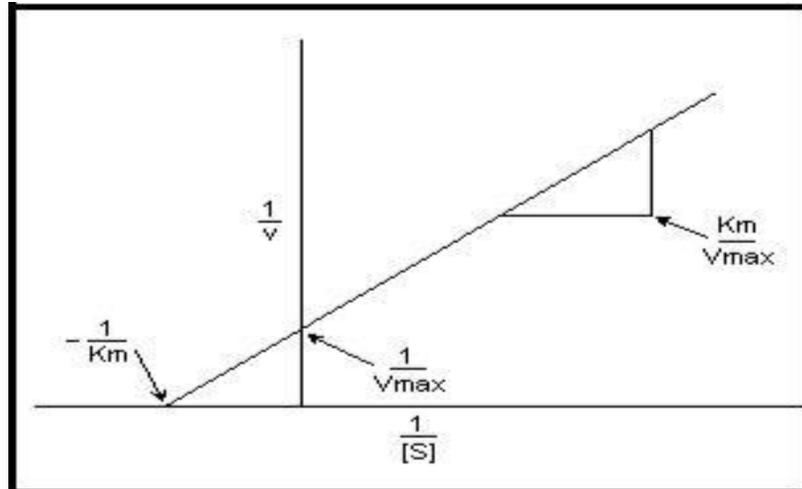


Figura 18: Gráfica de Lineweaver-Burke o del doble recíproco

La gráfica de Lineweaver-Burk o representación de doble recíproco es la forma más común de mostrar los datos cinéticos. El resultado de este tipo de representación es una línea recta cuya ecuación es $y = mx + c$, siendo el punto de corte entre la recta y el eje de ordenadas equivalente a $1/V_{max}$, y el punto de corte entre la recta y el eje de abscisas equivalente a $-1/K_m$.

B. Procedimiento

Se realizarán una serie de ensayos de hidrólisis variando la concentración inicial de almidón entre 1 y 0.5 g/L a concentración de enzima, pH y temperatura constantes.

A partir de 10 mL de disolución de almidón a concentraciones de: 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, y 1g/L (completando el volumen con buffer acetato 50mM, pH 5,5). La reacción de hidrólisis comienza con el agregado de la enzima (20 μ L de dilución 1:10) a tiempo cero, con un tiempo de reacción de 30 segundos (tomando muestras cada 10 segundos).

Mientras se incuba la mezcla de reacción (a 65°C), de la misma se toman 500 μ L en tiempos establecidos y se transfieren a un tubo de ensayo que contiene 1mL de HCl 0.5 N para frenar la reacción. Luego se lleva a agua en ebullición durante 2 min y en seguida se enfría en baño de hielo. Finalmente, cuantificamos el contenido de glucosa.

Para la determinación de la actividad enzimática, se tomará el promedio general de los ensayos.

3.3.6. Fermentación del hidrolizado de cáscara de banano.

Se realizó una fermentación con la cepa *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126 con el hidrolizado de cáscara de banano durante 12 horas a fin de validar mediante la producción de Bioetanol, la obtención de azúcares fermentables en el hidrolizado.

- **Referencias de composición de medios de mantención, activación y cultivo para *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126.**

*Tabla 8: Composición de los medios de mantención, activación y cultivo para *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126.*

Medio	Nutriente	Concentración (g/l)
Sólido de mantención (YM sólido)	Extracto de levadura	3
	Peptona	5
	Extracto de malta	3
	Agar	20
	Glucosa	10
Activación	Glucosa	15
	Extracto de levadura	3
	Extracto de malta	5
	Solución de sales	5 ml/L
Fermentación	Hidrolizado	28 %v/v
	Extracto de levadura	10 g/L
	(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g/L
	KH ₂ PO ₄	1 g/L
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.43 g/L
	Solución de sales	10 ml/L
	Tampón citrato pH 4,2	100 ml/L

Fuente: Manual de bioprocesos, Universidad nacional del santa. Castillo, A.(2015)

Umáx = 0,37 h⁻¹ en glucosa a 35°C (Lane, M. y Morrissey, J. 2010)

Composición de la solución de sales 100 veces concentrado, utilizadas en los medios de cultivo en g/L: 1,12 CaCl₂·2H₂O; 0,11 ZnSO₄·7H₂O; 0,06 FeSO₄·7H₂O; 0,05 CuSO₄·5H₂O; 0,01 CoCl₂·6H₂O; 0,0005 MoO₃; 0,027 MnCl₂·6H₂O y 0,28 NaCl

Condiciones de cultivo: Temperatura 35° y velocidad de agitación de 180 rpm en el agitador orbital (Shaker).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Caracterización de la cáscara de banano

Con la composición fisicoquímica de la materia prima, se pueden determinar parámetros que informen del material y la orientación para su uso o aprovechamiento, por ello se realizaron diferentes métodos para obtener datos iniciales a fin de caracterizar la cáscara del banano.

En la tabla 09 se muestra la composición fisicoquímica de la harina de cáscara de banano, donde el contenido de almidón es del 29%, seguido de la hemicelulosa con 15% y celulosa con el 12.9%. Estos valores son similares a los reportados por romero et al (2015), quienes señalan el almidón como componente principal en 39%, seguido de celulosa en 14% y hemicelulosa en 10%. Cabe destacar, que el contenido de estos componentes dependerá del origen de la materia prima (monsalve et. al., 2006), y el estado de madurez fisiológica del banano.

Tabla 9: Composición fisicoquímica de la harina de cáscara de banano

Componente	Porcentaje
Humedad	86.6
Cenizas	8.5 ± 0.02
Almidón	29 ± 0.4
Lignina	14.1 ± 0.6
Hemicelulosa	15.0 ± 0.1
Celulosa	12.9 ± 0.2

4.2. Determinación de la actividad enzimática

Para la determinación de la actividad enzimática se tomaron los valores en un tiempo de 60 minutos. Según Bergmeyer (1974), en este periodo puede expresarse la actividad enzimática en función de la velocidad máxima. La velocidad de reacción puede disminuir por agotamiento del sustrato o por saturación de producto.

Los parámetros seleccionados para realizar esta determinación se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10: Valores obtenidos para la determinación de actividad enzimática

Actividad Enzimática	
Concentración de Sustrato (Almidón)	3%
Concentración de Enzima (Glucoamilasa)	0.04%
pH	5
volumen de reacción	100ml
Ecu.(Curva de calibrado gluc.2g/L)	0.3264
Actividad Enzimática (U/ml)	4074.92963

Tabla 11: Valores de producto para la determinación de la actividad enzimática de la glucoamilasa sobre almidón

Tiempo (min)	Producto (g/L)
0	0.0000
5	0.0180
10	0.0767
15	0.1028
20	0.1567
30	0.2432
40	0.2921
50	0.3966
60	0.4651

REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

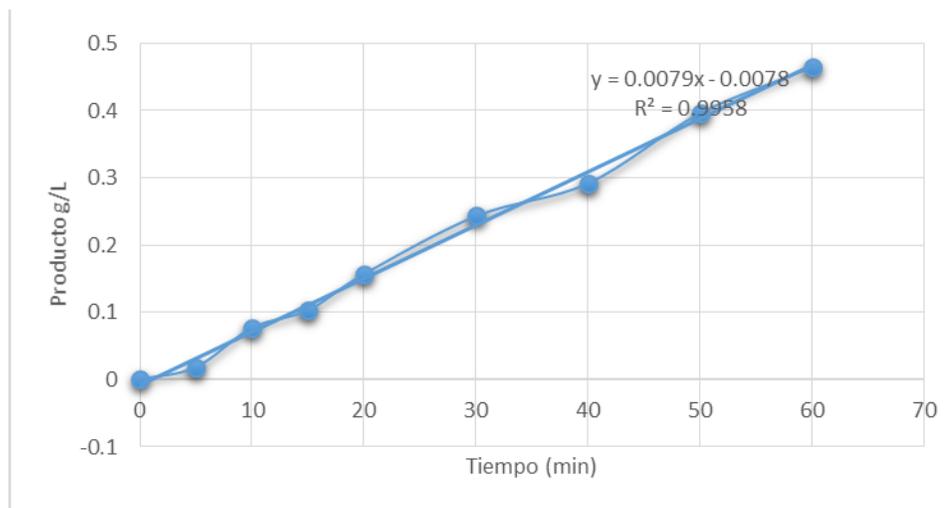


Figura 19: Actividad enzimática de la glucoamilasa

4.3. Determinación de parámetros cinéticos

Según Cacesa (1990), otro factor importante para predecir el comportamiento de un sistema enzimático es determinar $V_{m\acute{a}x}$ y K_m para la enzima particularmente empleada; esto puede realizarse midiendo la velocidad inicial de reacción en un rango de concentración reactante.

La tabla 12, muestra los valores de los parámetros cinéticos calculados para la enzima glucoamilasa a las condiciones descritas en la Tabla 16.

Tabla 12: Parámetros cinéticos de la enzima

Parámetros cinéticos	
$V_{m\acute{a}x}$	0.01342 g/L*min
K_m	40.8479 mg/ml

Los valores descritos en la Tabla 12, señalan los valores de la K_m , constante de Michaelis-Menten, la que describe la afinidad de la enzima glucoamilasa por el sustrato (almidón); asimismo el valor de la $V_{m\acute{a}x}$, como la velocidad máxima alcanzable con la concentración dada de enzima.

Para obtener un buen rango de concentración de sustrato, este valor debe caer en el rango de $0.25 - 5K_m$ (Bas y Boyaci 2007).

4.4. Determinación de temperatura y pH óptimos

Las condiciones de pH y temperatura se obtuvieron mediante el diseño ortogonal - Taguchi, tomando los rangos establecidos en la ficha técnica del proveedor. En cuanto a la concentración de sustrato (con respecto al medio de reacción), se tomó como referencia, Mejía y Martínez (2007) que señalan que “la mejor dilución de la muestra para la hidrólisis es una solución de 2.5% p/v. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 13: Diseño ortogonal Taguchi para determinación de ph y temperatura óptimos.

Tratamiento	Temperatura		Glucosa (g/L)	
	°C	pH		
1	65	4.5	0.06528	±0.003
2	70	5	0.05549	±0.002
3	60	5	0.05679	±0.0004
4	70	5.5	0.05255	±0.004
5	60	4.5	0.07083	±0.001
6	60	5.5	0.05353	±0.0002
7	70	4.5	0.07572	±0.0003
8	65	5	0.05908	±0.009
9	65	5.5	0.0532	±0.0004

Se realizaron 9 tratamientos, de los que se reporta la concentración de azúcares totales en g/L. Se realizó un análisis de varianza (Tabla 14) donde se observa que la temperatura no representa ningún efecto estadísticamente significativo, mientras el pH tiene un efecto altamente significativo ($P < 0,05$) en la producción de azúcares totales.

Tabla 14: Análisis de varianza para ph y temperatura

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>GL</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:temperatura	0.00000113535	1	0.00000113535	0.06	0.8077
B:pH	0.00046025	1	0.00046025	26.22	0.0022
Error total	0.000105316	6	0.0000175527		
Total (corr.)	0.000566702	8			

Tal como se muestra en el diagrama de Pareto (Figura 19) este tipo de análisis permite estudiar la influencia de las variables sobre la respuesta, y las interacciones entre ellas. El signo que presentan los coeficientes determina la forma como la variable influye en el sistema y da una idea de la dirección a seguir en los experimentos para ubicar el óptimo. Un signo positivo para una variable determinada, indica que el incremento de la temperatura podría aumentar la producción de azúcares, y del mismo modo el signo negativo indica su disminución.

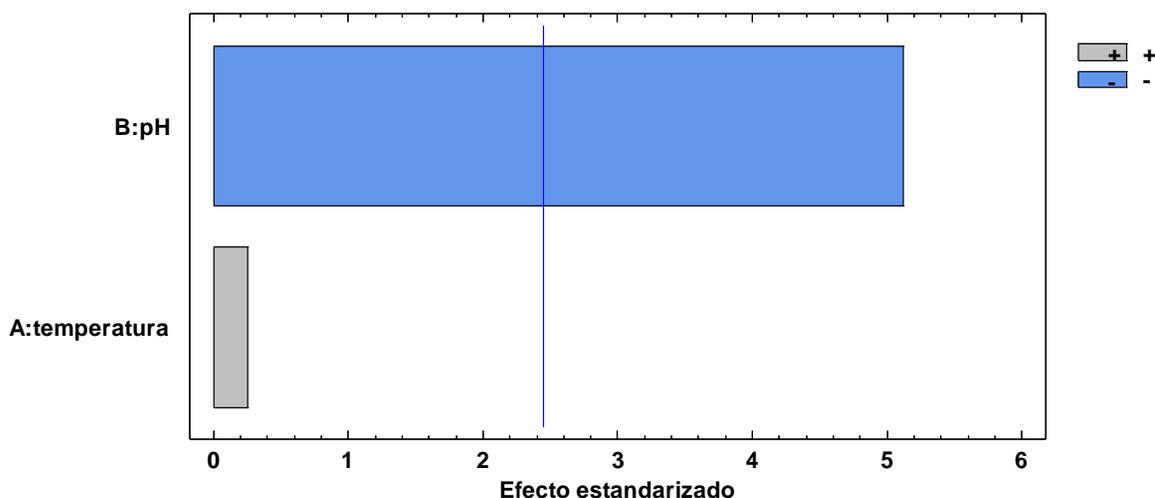


Figura 20: Diagrama de Pareto para los efectos de pH y Temperatura

En la Figura 21, el primer factor correspondiente a temperatura, en sus niveles (60 – 70°C), se observa la forma en que influye en la producción de azúcares, en mayor y menor productividad; siendo 70°C el nivel de mayor significancia para la producción de azúcares, lo cual coincide con lo reportado por Aquino *et al* (s.f.) para enzima alfa amilasa donde la temperatura óptima fue 70°C. Así también se puede observar que en el factor correspondiente a pH la mayor productividad va estar dada en el primer nivel correspondiente a los 4.5; teniendo en cuenta las mejores condiciones en cada uno de sus factores es que para un mayor rendimiento se opta por trabajar con las mejores condiciones recomendadas por el sistema a fin de maximizar respuestas (mayor es mejor).

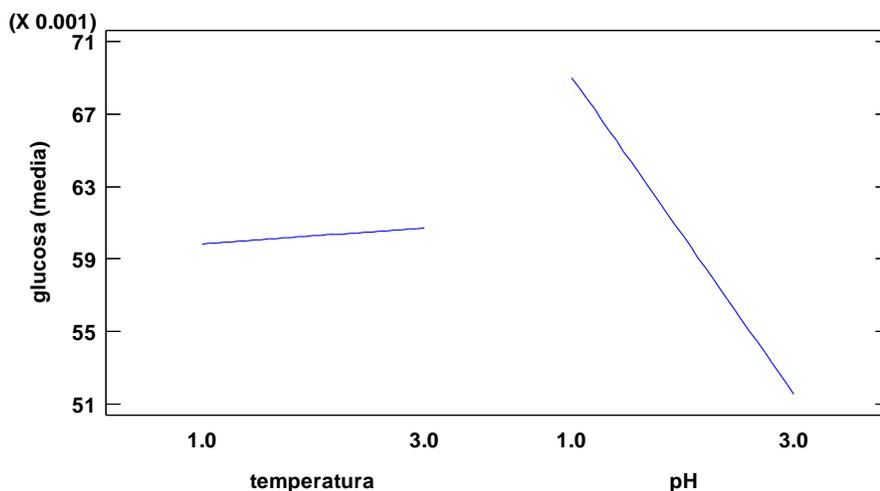


Figura 21: Efectos principales para azúcares totales

Temperatura	pH
1: 60 ° C	1: 4.5
2: 65 ° C	2: 5
3: 70 ° C	3: 5.5

4.5. Determinación de las concentraciones óptimas de enzima y sustrato:

Luego del acondicionamiento de la biomasa, el almidón fue diluido, dando las condiciones al medio para facilitar la acción de la enzima en la conversión a carbohidratos.

La enzima utilizada fue glucoamilasa, la cual cataliza la degradación de almidón a unidades de glucosa. Para la presente investigación se trabajó con los rangos dados en las especificaciones técnicas del proveedor Novozymes y mediante el diseño estadístico, obteniendo:

Tabla 15: Estadístico mostrando los 11 tratamientos con sus respuestas

Tratamiento	Sustrato (%)	Enzima (%)	Glucosa (g/L)
1	3.0	0.04	1.3711 ± 0.005
2	3.0	0.04	1.3894 ± 0.007
3	3.0	0.01	1.4742 ± 0.033
4	2.0	0.02	0.9569 ± 0.031
5	4.0	0.02	1.7122 ± 0.076
6	4.0	0.06	1.9899 ± 0.005
7	1.6	0.04	0.7488 ± 0.005
8	3.0	0.04	1.4027 ± 0.012
9	2.0	0.06	1.0135 ± 0.031
10	4.4	0.04	2.0165 ± 0.007
11	3.0	0.07	1.4261 ± 0.021

El diseño superficie respuesta es muy atractivo para los investigadores, permite inspeccionar una respuesta, que se puede mostrar como una superficie, cuando los experimentos investigan el efecto que tiene el variar factores cuantitativos en los valores que toma una variable dependiente o respuesta; y tratar de encontrar los valores que optimicen esta respuesta (Colina, 1998).

Se observa que los tratamientos que presentan valores más altos en glucosa son aquellos con mayor concentración de sustrato. Para determinar significancia de las variables de estudio se realizó un análisis de varianza la cual se presenta en la Tabla 16.

Tabla 16: Análisis de varianza (anova) para contenido de glucosa

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:sustrato	1.55276	1	1.55276	366.06	0.0000
B:enzima	0.00886287	1	0.00886287	2.09	0.2080
AA	0.0000251507	1	0.0000251507	0.01	0.9416
AB	0.0122213	1	0.0122213	2.88	0.1504
BB	0.00565307	1	0.00565307	1.33	0.3005
Error total	0.0212092	5	0.00424183		
Total (corr.)	1.60151	10			

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de “Glucosa” en contribuciones debidas a varios factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Por lo observado, la variable estadísticamente significativa para la investigación a un nivel de confianza del 95% es la concentración de Sustrato.

Tabla 17: Coeficiente de regresión del modelo matemático

<i>Coeficiente</i>	<i>Estimado</i>
constante	0.43869
A:sustrato	0.342675
B:enzima	-12.9549
AA	-0.00211041
AB	2.76375
BB	79.0988

De la función que describe el modelo de segundo orden se calculó el punto estacionario de manera teórica (por el programa Statgraphic Centurion VI), derivando esta ecuación. Las coordenadas de este punto obtenidas por este método, se sustituyeron en la ecuación general para calcular la cantidad de glucosa producida en las condiciones del punto óptimo.

En la tabla 17 se muestran los coeficientes del modelo de regresión, cuya ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Glucosa} = 0.43869 + 0.342675*\text{sustrato} - 12.9549*\text{enzima} -$$

$$0.00211041*\text{sustrato}^2 + 2.76375*\text{sustrato}*\text{enzima} + 79.0988*\text{enzima}^2$$

La figura 22, permite visualizar la superficie de respuesta en un espacio tridimensional, en el que la tercera dimensión representa el rendimiento de glucosa sobre el plano bidimensional definido por las combinaciones de los niveles de los dos factores (concentración enzimática de glucoamilasa y de sustrato). Analizando esta superficie de respuesta se observa que a una concentración enzimática de glucoamilasa de 0.06828 % favorece la producción de glucosa, mostrándose la existencia de un máximo local en la misma. De igual forma sucede con la concentración de sustrato, teniendo su punto máximo en 4.41421 %. Si nos alejamos de este punto, aumentando o disminuyendo los valores de concentración, el valor esperado decrece. Por tanto para alcanzar el porcentaje de rendimiento óptimo en el proceso de hidrólisis enzimática que estamos considerando, debemos trabajar con los valores de concentración enzima y sustrato que nos indica el punto óptimo.

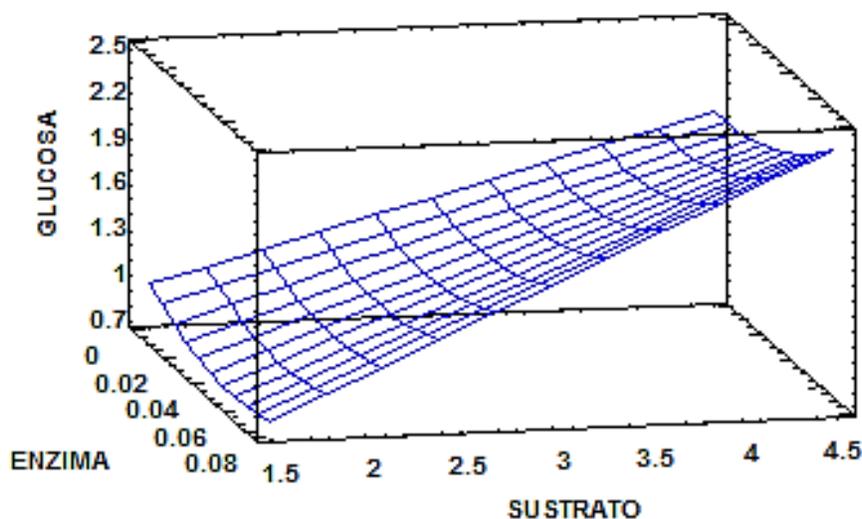


Figura 22: Superficie de respuesta tridimensional de los rendimientos de glucosa en función a la concentración de enzima y sustrato

El valor teórico de la optimización de la respuesta permitió obtener una concentración de glucosa de: 2.22746 g/L. La tabla 18 muestra la combinación de los niveles de factores, la cual maximiza la obtención de glucosa.

Tabla 18: Valores críticos resultados de la optimización de las concentraciones de enzima y sustrato

Valores críticos; Variable: Rendimiento de glucosa

	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Sustrato	1.58579	4.41421	4.41421
Enzima	0.0117157	0.0682843	0.0682843

Para validar la optimización de parámetros mediante el software estadístico, se realizó un ensayo de hidrólisis enzimática a partir de las concentraciones óptimas de enzimas y sustrato en la cascara de banano, en la Tabla 19 se muestran los valores de producto (glucosa en g/L) y productividad (g/L*min) durante el tiempo de reacción.

Tabla 19: Cinética enzimática con los valores óptimos de enzima y sustrato

t (min)	glucosa (g/l)	
0	0	
5	1.870147	± 0.033
10	1.906744	± 0.009
20	1.943341	± 0.009
30	2.146288	± 0.019
60	2.159596	± 0.009
120	2.182885	± 0.009
180	2.256079	± 0.009
240	2.29933	± 0.028
360	2.362543	± 0.028
480	2.415775	± 0.019
960	2.578798	± 0.014
1320	2.721859	± 0.019
1680	2.805034	± 0.014
2160	2.805034	± 0.000
2880	2.805034	± 0.014

se realizó un ensayo de hidrólisis enzimática a partir de las concentraciones óptimas de enzimas y sustrato en la cascara de banano, en la Tabla se muestran los valores de producto (glucosa en g/L) durante el tiempo de reacción. Teniendo en el mismo tiempo de 30 min; una diferencia de sólo 3.6% con lo estimado teóricamente.

En un tiempo de 2880 minutos, donde se describe el rendimiento máximo alcanzado en un valor de 2.80503 g/L correspondiente al minuto 1680 de la hidrólisis, manteniendo en tiempos posteriores concentraciones constantes de producto.

Los valores reportados por Monsalve et. al., (2006) al hidrolizar la cáscara de banano por hidrólisis ácida se obtiene un jarabe de 20g/l de azúcares reductores como máxima concentración en 5 horas. Por otro lado Cortez et. Al. , (2013) Reportaron en las muestras de banano son de 38,77 g/L de azúcares reductores por hidrólisis ácida en 24 horas.

4.6. Fermentación del hidrolizado de cáscara de banano

Se realizó la fermentación con la cepa *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126, con la finalidad de validar los resultados obtenidos en la hidrólisis enzimática de cáscara de banano para obtener jarabe de glucosa.

Los resultados de producción de biomasa y consumo de sustrato se muestran en la siguiente figura:

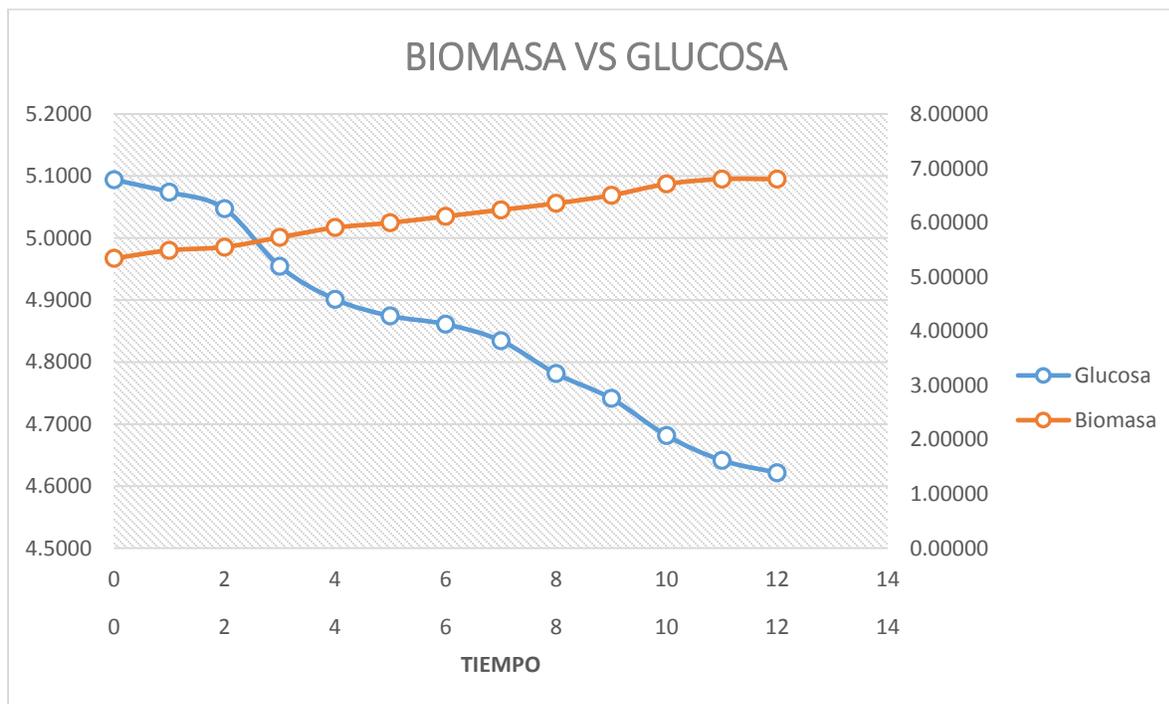


Figura 23: Producción de biomasa vs Glucosa

En la figura 23 se observa la disminución de la glucosa en el medio de reacción, la cual es usada parcialmente por el microorganismo para la producción de biomasa. En el apartado siguiente se analiza la producción de etanol.

4.7. Análisis cromatográfico de etanol

Para la determinación de la concentración de etanol, se utilizó la Cromatografía de Gases y Headspace.

El rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol es de 0.511 g de etanol y 0.489 g de CO₂ por 1g de glucosa. El rendimiento experimental varía entre 90% y 95% del teórico, es decir, de 0.469 a 0.485 g/g (Linde et al, 2007).

Tabla 20: Producción de etanol a partir de la cáscara de banano hidrolizada

Tiempo (h)	Etanol (g/L)
0	0.543
4	0.518
6	0.726
8	0.854
12	0.907

La Tabla 20 muestra que en el tiempo 0 ya se tenía una concentración inicial de 0.543 g/L de etanol, esto puede atribuirse a una producción en la fase de activación de la cepa. Mientras a un tiempo de 12 horas de fermentación, se obtiene una concentración máxima de 0.907 g/L de etanol. Concentración que equivale a una conversión del 32.393% de glucosa a etanol (Ver anexos). Además se logra valores superiores reportados por Monsalve et. al., (2006), Para la fermentación realizada con *Sacharomyces cerevisiae* se logra una concentración de etanol de $7.92 \pm 0.31\%$, no se aprecia una producción considerable de etanol (menor de 0.1 g/l) para ninguno de los medios fermentados con *Z. mobilis*

V.

CONCLUSIONES:

- De la caracterización fisicoquímica de la cascara de banano, se determinó que el almidón es el principal componente de la materia prima, seguido de la celulosa y hemicelulosa.
- Para la caracterización cinética de la glucoamilasa se determinaron sus parámetros cinéticos así como la actividad catalítica usando almidón puro como sustrato.
- Se determinó para la hidrólisis enzimática de la cáscara de banano como sustrato, las condiciones ambientales óptimas de temperatura y pH, con valores de 70°C y 4.5, respectivamente.
- Se determinó que las concentraciones de enzima y sustrato óptimas para la hidrólisis enzimática de la cáscara de banano fueron: 0.0683 % de glucoamilasa, y 4.4142 % de concentración de sustrato.
- La hidrólisis de la cáscara de banano, a las concentraciones óptimas de enzima y sustrato, dieron una concentración de 2.8 g/L de glucosa, al final de las 48 horas de reacción.
- En la fermentación de *Saccharomyces cerevisiae* en glucosa obtenida a partir de cáscara de banano, se logró una conversión de 32.39%, validando el producto con la obtención de etanol.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar la evaluación económica para determinación de la factibilidad de escalar el proceso.
- Evaluar la presencia de otros alcoholes producto de la fermentación del hidrolizado.
- Usar un antioxidante para mejorar la apariencia de la harina de cáscara de banano obtenida.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aldabe, J., Hueto, A., Juni, J., y López, P. (1998). *Biología*. Erein,1, 125.
- Banik, G., Cremonesi, P., La Chapelle, A., y Montalbano, L. (2003). *Nuove metodologie nel restauro del materiale cartaceo*. Padova, Il Prato,
- Beltrán, P., Y Maldonado, P. (2002). *Caracterización microbiológica de cebada malteada y arroz y determinación de actividad enzimática amilolítica microbiana en el proceso de elaboración de mosto cervecero (tesis de grado)*. Universidad Javierana, Bogotá, Colombia.
- Bertoldo, C., y Antranikian, G. (2002). Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Curr. Opin. Chem. Biol*, 6,151-160.
- Bhella, R., y Altosaar, I. (1987). Production of multiple forms of glucoamylase in *Aspergillus awamori*. *Biochem. Cell. Biol*, 65, 762-765.
- Braverman, J. (1980) .*Introducción a la bioquímica de los alimentos*. Omega., S. A. Barcelona, Argentina.
- Bas, D., Boyaci, H., 2007. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology, *Journal of food engineering*, 78, 836-845.
- Castillo, A. (2015) *Manual de Bioprocesos*. Universidad Nacional del Santa. Perú
- Chandrakant, P., Bisaria, V. (2000). Simultaneous bioconversion of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of xylose isomerase. *Applied Microbiology and Biotechnology Cell. Biol*, 53, 301 – 309.}
- Comité de Innovación Tecnológica del Departamento de San Vicente (2002). *Estudio Técnico y de Mercado del Plátano en El Salvador*. Recuperado de <http://www.sanvicenteproductivo.org/est/Estudio%20Platano.pdf>

- Coronel, P., y Mendoza. (2000). “Obtención del jarabe de glucosa por el método enzimático a partir de ñelén de arroz” (tesis de pregrado). Universidad Nacional del Santa, Perú.
- Cremosi, P. (2002). L'uso degli enzimi nella pulitura di oprer policrome, Padova. Il prato.
- Cunningham, R., y López G. (1994). Etanol de lignocelulósicos tecnología y perspectivas, Santiago de Compostela, universidad, servicio de publicación e intercambio científico, Programa CYTED.
- Cortes W, Ibla J, Calderón L, Herrera A (2013). Cuantificación de azúcares reductores en las cáscaras de naranja y banano. Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia.
- Doman-Pytka M y Bardowski J (2004). Pullulan degrading enzymes of bacterial origin. Crit. Rev. Microbiol. (30), p. 107-121.
- Ducki A, Grundmann O, Konermann L, Mayer F y Hoppert M (1998). Glucoamylase from *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*: sequence studies and analysis of the macromolecular architecture of the enzyme. J. Gen. Appl. Microbiol. (5), p. 327-335
- Estudio Técnico y de Mercado del Plátano en El Salvador. (2002). Comité de Innovación Tecnológica del Departamento de San Vicente: <http://www.sanvicenteproductivo.org/est/Estudio%20Platano.pdf>
- Ford C (1999). Improving operating performance of glucoamylase by mutagenesis. Curr. Opin. Biotech. (10), p. 353-357.

- Flores Gorosquera, E., García Suárez, F.J., Flores Huicochea, E., Núñez Santiago, M.C., González Soto, R.A., & Bello Pérez, L.A. (2004). Rendimiento del proceso de extracción de almidón a partir de frutos de plátano (*Musa paradisiaca*). Estudio en planta piloto. *Acta Científica Venezolana*, 55(1)
- Hendricks, A., & Zeeman, G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, (100), p. 10-18.
- Henrissat B (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. *Biochem. J.* (280), p. 309-316.
- Hough, J.S. (1990). *Biotecnología de la cerveza y de la malla*. Zaragoza, España Editorial Acribia, S.A.
- Instituto Nacional de Innovación Agraria – INIA (2013). Recuperado de <http://www.inia.gob.pe/congresomusalac/pdf/articulomusalac.pdf>
- J, Ly. 2004. Bananas y platanos para alimentar cerdos: Aspectos de la composición química de las frutas y de su palatabilidad. Instituto de Investigaciones Porcinas. La Habana, Cuba. Vol (11), p. 5-12.
- KIM MS, Park JT, Kim YW, Lee HS, Nyawira R, Shin HS, Park CS, Yoo SH, Kim YR, Moon TW Y Park KH (2004). Properties of a Novel Thermostable Glucoamylase from the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus* in relation to starch processing. *Appl. Environ. Microbiol.* (70), p. 3933-3940.

- Lara, J. & Fernandez, L (2007). Hidrólisis enzimática de piñas de sotol para incrementar la concentración de azúcar aplicando diferentes tratamientos (tesis de licenciatura). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, México.
- LC Gonçalves Ferreira. (2013). Evaluación de la biodegradabilidad anaerobia de residuos orgánicos pre-tratados térmicamente (tesis doctoral). Universidad de Valladolid, España
- Lehninger, Nelson, Cox, Principios de Bioquímica, 2^o Edición, Ed. Omega, Barcelona, 1995, p. 191.
- Lehninger, Nelson, Cox, Principios de Bioquímica, 4^o Edición, Ed. Omega, Barcelona, 2006. p194.
- Machovic M Y Jenecek S (2007). Amylolytic enzymes: Types, structures and specificities. En Industrial Enzymes, Structure, function and applications. pp. 3-18. Editado por J. Polaina y A.P. MacCabe. Springer. Dordrecht, The Netherlands.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. 2003. Biología de los microorganismos. Décima Edición. Editorial Prentice Hall. España. 121-122 p.

- Mazzeo, M.M., Alzate, G.A., & Marín M.M. (2008). Obtención de Almidón a partir de Residuos Postcosecha del Plátano Dominicano Hartón (Musa Aab Simmonds).
- Mejía, g. L. F., martínez, c. H. A., betancourt, g. J.e. Y castrillón, C. C. E. (2007). Aprovechamiento del residuo agroindustrial del mango común (Mangifera indica L.) en la obtención de azúcares fermentables”; Universidad EAFIT, facultad de ingeniería y ciencias. Pag.44,46.
- Monsalve J., John F. Medina de Pérez, Victoria Isabel, Ruiz Colorado, Angela adriana. Producción de etanol a partir de la cáscara de banano y de almidón de yuca Dyna, 2006: Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=49615002>
- Monsalve J., Medina V., Ruiz A. 2006. Producción de etanol a partir de la cáscara de banano y almidón de yuca Universidad de Colombia, pp. 21-27.
- Nakamura T, Maeda y, Tanoue N, Makita T, Kato M y Kobayashi T (2006). Expression profile of amylolytic genes in Aspergillus nidulans. Biosci. Biotechnol. Biochem. 70: 2363-2370
- Naim Hy, Lacey Sw, Sambrook Jf Y Gething Mj (1991). Expression of a full-length cDNA coding for human intestinal lactase-phlorizin hydrolase reveals an

uncleaved, enzymatically active, and transport-competent protein. J. Biol. Chem. 266: 1231312320.

- Nichols BI, Avery S, Sen P, Swallow Dm, Hahn D y Sterchi E (2003). The maltaseglucoamylase gene: common ancestry to sucrase-isomaltase with complementary starch digestion activities. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100: 1432-1437.
- ostergaard, S., olsson, L., nielsen, J. 2000. Metabolic Engineer of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology and Molecular Biology Reviews 64 (1): 34-50 p.
- Paldi T, Levy I Y Shoseyov O (2003). Glucoamylase starch-binding domain of *Aspergillus niger* B1: molecular cloning and functional characterization. Biochem. J. 372: 905-910.
- Pandey A, Nigam P, Soccol Cr, Soccol Vt, Singh D Y Mohan R (2000). Advances in microbial amylases. Biotechnol. Appl. Biochem. 31:135-152.
- Pretorius Is y Lambrechts MG (1991). The glucoamylase multigene family in *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*: An overview. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 26: 53-76.
- Rico, Yolanda. 1990. Producción, purificación y caracterización parcial de una *Glucoamilasa* de *Aspergillus niger*. Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- Romero B., Ayala A., Lapo C. 2015. Efecto de tres pre-tratamientos de cáscara de banana para la obtención de jarabe glucosado mediante hidrólisis enzimática.

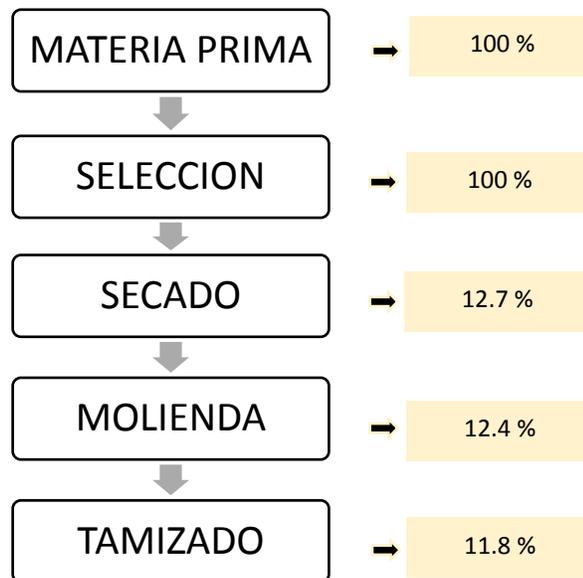
Centro de Investigaciones Químicas y Tecnológicas, Universidad Técnica de Machala, Machala, Ecuador.

- Saddler, J.N.; Mes-Martree, M., Hogan, C.M. And Browneil, H.H. (1984) Steam explosión as a pretreatment method for the enzymatic hydrolysis of lignocellulosics to sugars. Biotechnology and Chemistry Department. Forintek Canadá Corp. Canadá
- Salvador Badui dergal. Química de los Alimentos. Cuarta edición. México, 2006.
- Sevcik J, Solovicova A, Hostinova E, Gasperik J, Wilson KS, y Dauter Z (1998). Structure of glucoamylase from *Saccharomycopsis fibuligera* at 1.7 Å resolution. *Acta. Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 54: 854-866.
- Solovicova A, Gasperik J y Hostinova E (1996). High-yield production of *Saccharomycopsis fibuligera* glucoamylase in *Escherichia coli*, refolding, and comparison of the nonglycosylated and glycosylated enzyme forms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224:790-795.
- Specka U, Mayer F y Antranikian G (1991). Purification and properties of a Thermoactive Glucoamylase from *Clostridium thermosaccharolyticum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2317-2323.
- Schwanninger, M. ; Hinterstoisser, B. 2002. Klason lignin: Modifications to improve the precisión of the standardized determination. *Holzforschung* 56 (2): 161-166.
- Takara, D., Shrestha, P., And Khanal, S. 2010. Lignocellulosic Biomass Pretreatment. *Bioenergy and Biofuel from Biowastes and Biomass*: pp. 172-200.

- Tejada, D., Shrestha, P., And Khanal, S. 2010. Lignocellulosic Biomass Pretreatment. *Bioenergy and Biofuel from Biowastes and Biomass*: pp. 172-200.
- Tuite, M., Oliver, S. 1991. *Saccharomyces cerevisiae*. Editorial Plenum Press. New York. 100 – 120p.
- Uotsu-Tomita R, Tonozuka T, Sakai H y Sakano Y (2001). Novel glucoamylase-type enzyme from *Thermoactinomyces vulgaris* and *Methanococcus jannaschii* whose genes are found in the flanking region of the α -amylase genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 465-473.
- Wallis GL, Swift RJ, Hemming FW, Trinci AP y Peberdy JF (1999). Glucoamylase overexpression and secretion in *Aspergillus niger*: analysis of glycosylation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1472: 576-586.
- Zechel DL y Withers SG (2000). Glycosidase mechanisms: Anatomy of a finely tuned catalyst. *Acc. Chem. Res.* 33: 11-18

ANEXOS

ANEXO N° 01: RENDIMIENTO DE LA OBTENCIÓN DE HARINA DE CÁSCARA DE BANANO



ANEXO N°02: DIAGRAMA DE FLUJO



Selección y clasificación



Secado



Molienda



Tamizado



**Pre- tratamiento
hidrotermico**



Hidrolisis enzimatica



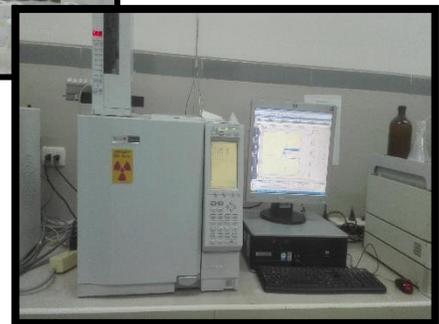
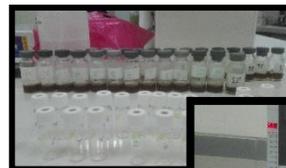
Concentrado



Cuantificación de glucosa



Fermentación



Determinación de etanol

ANEXO N°03: METODOS UTILIZADOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LA CÁSCARA DE BANANO

DETERMINACIÓN DE LIGNINA MÉTODO KLASON

Se pesa un gramo con precisión de 0.0001gr, se mezcla bien con 15ml de H₂SO₄ 72% y se deja reposar 24 horas.

Se trasvasa el contenido del vaso a un matraz de 1000 ml y se añaden 560 ml de agua destilada para pasar de H₂SO₄ 72% a H₂SO₄ 3% se mantiene en ebullición durante 4 horas, al cabo de las cuales se deja sedimentar el sólido y se filtra en una placa filtrante.

El sólido filtrado se lava con agua destilada caliente hasta que el pH del agua de lavado no sea ácido, se seca en estufa a 105°C durante 12 horas y se pesa. Se toma unos 100 mg de sólido y se calcina en mufla a 430°C durante 24 horas, obteniéndose así un porcentaje en materia orgánica (MOling)

Humedad operativa: $100/(100 - \text{Humedad de muestra})$

$$\text{lignina}(\%) = \frac{P_3 - P_2 \cdot (\%MOling)}{P_1 \cdot (100 - \%H)} \times 100$$

P₁ : Peso inicial de la muestra

P₂ : Peso papel filtro

P₃ : Peso sólido después de las 12 horas

%MOling: Materia Orgánica

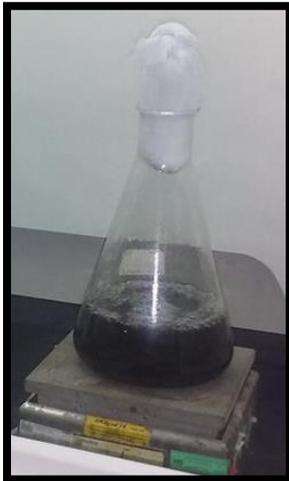
% H : Humedad Operativa

DETERMINACIÓN DE LIGNINA MÉTODO KLASON

$$\text{lignina}(\%) = \frac{P - P^* (\text{Molig})}{P_1 \times (100 - \%H)} \times 100$$

M1
 P3 : 1.98
 P2 : 1.26
 P1 : 1.00
 %Molig : 19.9
 %H : 1.15

$\text{lignina}(\%) =$	$\frac{1.98 - 1.26 \times (19.9)}{1.0001 \times (100 - 1.15)}$	$= 14.53$



DETERMINACIÓN DE HOLOCELULOSA

Se pesan 4 gr de muestra con precisión de 0.0001 gr en un Erlenmeyer de 250 ml de capacidad y se añaden 63 ml de agua destilada.

A la suspensión se le añaden 0.2 ml de ácido acético glacial y 0.6 ml de peróxido de hidrógeno.

Se cubre y se introduce a baño María (70-80°C), agitando de vez en cuando. Este proceso se repite dos veces más. Al finalizar la tercera hora, se coloca en baño de agua –hielo hasta que la temperatura baje a los 10°C.

Se filtra en placa filtrante, y se lava con agua destilada hasta la eliminación de la coloración amarilla.

Después se deja secar a 60°C y se pesa. Al sólido obtenido se le determina porcentajes de humedad (% Holo) y de materia orgánica (%MOholo)

$$\text{HoloCelulosa}(\%) = \frac{(P_3 - P_2) \times (100\% - \%H_{\text{holo}}) \times (\%MO_{\text{holo}})}{P_1 \times (100 - \%H)}$$

P₁ : Peso inicial de la muestra

P₂ : Peso papel filtro

P₃ : Peso sólido después de secar

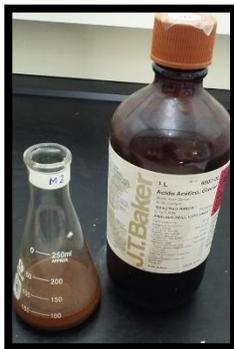
%Hholo: % de humedad del sólido obtenido

%MOholo: % de materia orgánica obtenida

% H : Humedad Operativa

M1
P1 : 4.00
P2 : 1.28
P3 : 2.61
%Hholo : 83.57
%Moholo : 2.27
%H : 1.15

Holocelulosa=	$\frac{(2.61-1.28) \times (100-16.43) \times (97.73)}{4.00 \times (100-1.15)} = 27.48$
---------------	--



DETERMINACIÓN DE CELULOSA

Se pesa 1gr de holocelulosa, con precisión de 0.0001 gr, en un Erlenmeyer de 100 ml. Se añaden 5ml de NaOH 17.5% hasta consumir un total de 12.5 ml y se mantiene 30 minutos a temperatura ambiente. Se añaden 16.5 ml de agua destilada a 20°C para pasar de NaOH 17.5% a 8.3%, se mezclan bien y se mantiene durante 1 hora a temperatura ambiente.

A continuación se filtra en placa filtrante y se lava con 50 ml de NaOH 8.3% y posteriormente con agua destilada. Se repite el lavado con NaOH 8.3% y agua destilada dos veces. Se corta la succión y se añaden 7.5 ml de ácido acético 10% y se deja en contacto 3 minutos. Se vuelve a conectar el vacío y se lava con agua destilada hasta la neutralidad del filtrado. Se seca a 105°C en estufa durante 12 horas se pesa.

Se calcula el contenido en materia orgánica del sólido obtenido (%MOcel), y el contenido en celulosa se calcula de acuerdo con la expresión:

$$\text{Celulosa}(\%) = \frac{(P_3 - P_2) \times (\%MO_{cel}) \times (\%Holocelulosa)}{P_1 \times (\%MO_{holo}) \times (100 - \%Hholo)} \times 100$$

P₁ : Peso inicial de la muestra

P₂ : Peso papel filtro

P₃ : Peso sólido después de secar 12 horas

%MOcel: de humedad de el sólido obtenido

%Holocelulosa: Holocelulosa en porcentaje

%Hholo: % de humedad del sólido obtenido de la Holocelulosa

%Moholo: % de materia orgánica obtenida de la Holocelulosa

M1
P1 : 1.00
P3-P2 : 0.40
%Hholo : 16.43
%MOholo : 97.73
%MOcel : 96.95
%holoceluls : 27.48

Celulosa (%) =	$\frac{(0.40) \times (96.95) \times (27.48)}{1.0001 \times (97.73) \times (100 - 16.43)}$	= 13.05
----------------	---	---------



ANEXO N° 04: DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS

Procedimiento

Se prepararon 5 matraces de 125ml, se adicionaron 25ml de tampón citrato a pH 5, para llevar a cabo la hidrólisis con las concentraciones de enzimas óptimas (*Glucoamilasa 0.04%*), a diferentes concentraciones de sustrato (almidón puro) y todas con un tiempo de reacción de 20 min.

Los ensayos se realizaron por duplicado, como se detalla en la siguiente:

Tabla A1. Diseño experimental para la determinación de parámetros cinéticos.

<i>sustrato (g/L)</i>	<i>tiempo</i>	<i>abs</i>	<i>Glucosa(g/L)</i>
12	0	0	0
	20	0.195	0.0628 ±0.001
21	0	0	0
	20	0.269	0.0875±0.0005
33	0	0	0
	20	0.36	0.1110±0.009
42	0	0	0
	20	0.44	0.1387±0.007
50	0	0	0
	20	0.52	0.1665±0.005

S (g/L)	V	1/V	1/S
12	0.0031	322.580645	0.08333333
21	0.0044	227.272727	0.04761905
33	0.0055	181.818182	0.03030303
42	0.0069	144.927536	0.02380952
50	0.0083	120.481928	0.02

V	0.01341562
----------	-------------------

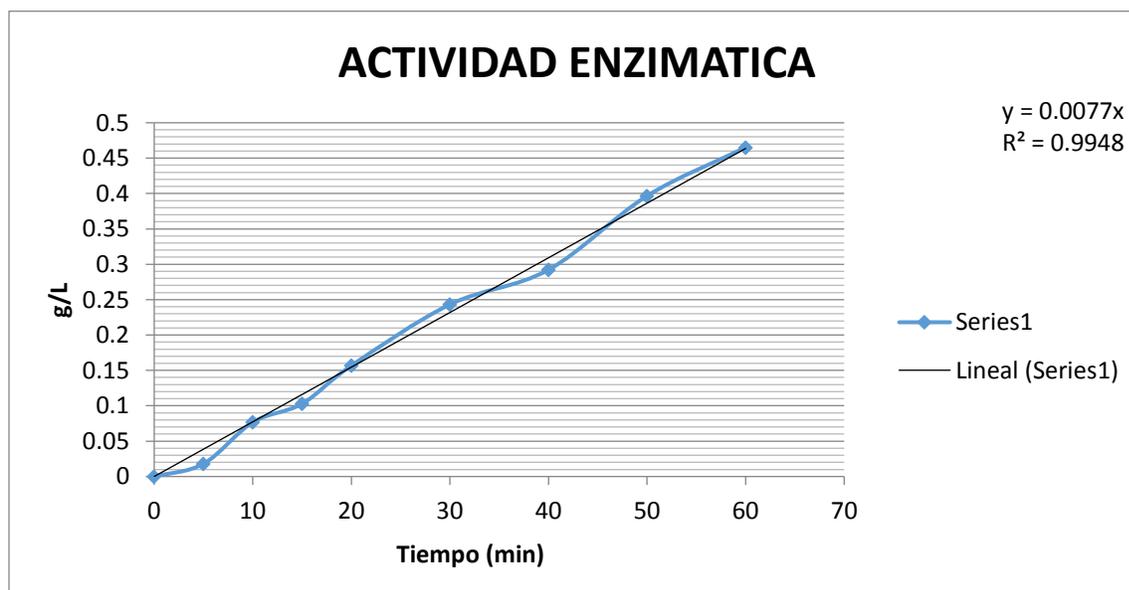
K	40.8478669
----------	-------------------

ANEXO N° 05: DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMATICA

Concentración de Sustrato :	3%	Almidón
concentración de Enzima:	0.04%	Glucoamilasa
pH :	5	
Ecu.(Curva de calibrado gluc.2g/L):	0.3264	X

Tiempo (min)	Abs	g/L*seg
0	0	0
5	0.055	0.017952
10	0.235	0.076704
15	0.315	0.102816
20	0.48	0.156672
30	0.745	0.243168
40	0.895	0.292128
50	1.215	0.396576
60	1.425	0.46512

Factor de Dilucion	20	
1mol gluc	180	g
1mol	1000000	μmol
Vol.Sustrato	0.1	L
Vol. Enzima	0.021	ml
	0.000021	L
Vol. Total	0.100021	L
1min	60	seg
Pendiente	0.0077	g/L.seg
ACTIVIDAD=	4074.92963	U/ml

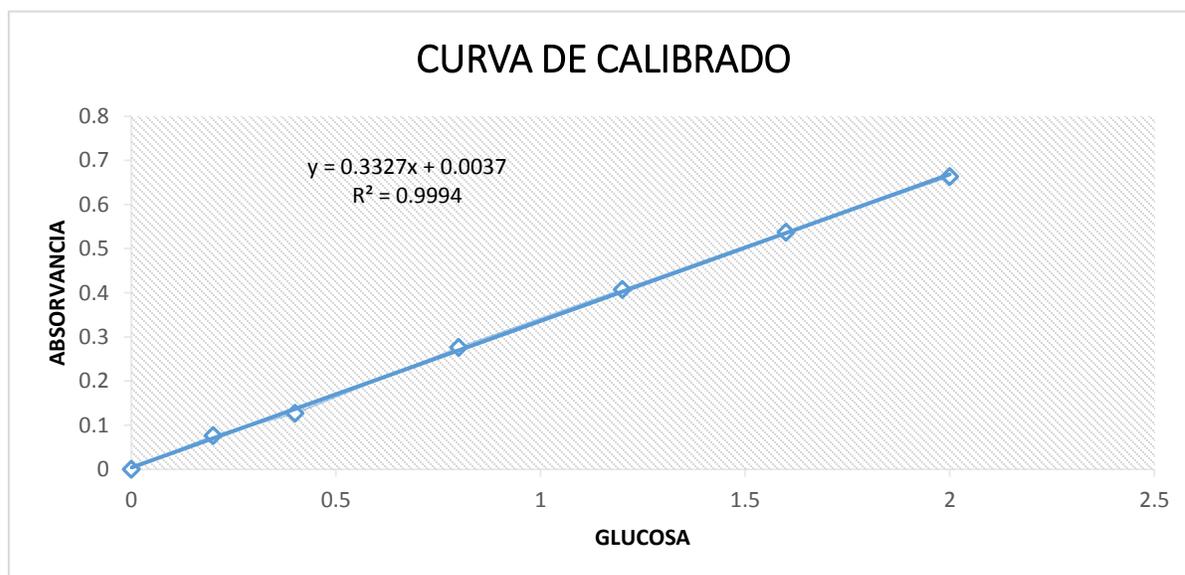


ANEXO N° 06: DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE GLUCOSA, MEDIANTE EL KIT MONLAB TEST

Se realizó una dilución (1:8) del hidrolizado de la cascara de banano, luego se tomó 30 µl de la muestra diluida por duplicado. Se procedió a añadir 30ml del reactivo, se mezcló y se dejó incubar por un periodo de 10 minutos a 37°C. Finalizado este tiempo se llevó al espectrofotómetro a una longitud de onda de 505nm.



Para esta determinación se utilizó la siguiente curva de calibrado.



A	0.3327
B	0.0037
R ²	0.9994

ANEXO N° 07: FICHA TÉCNICA DEL KIT ENZIMATICO



Glucoza Monlabtest®

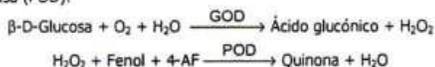
GOD-POD. Líquido.

Determinación cuantitativa de glucoza.

Para uso profesional de diagnóstico in vitro
 Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL MÉTODO

La glucoza oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de glucoza a ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenol, 4-aminofenazona (4-AF), en presencia de la peroxidasa (POD):



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucoza presente en la muestra ensayada^{1,2}.

SIGNIFICADO CLÍNICO

La glucoza es la mayor fuente de energía para las células del organismo; la insulina facilita la entrada de glucoza en las células. La diabetes mellitus es una enfermedad que se manifiesta por una hiperglucemia, causada por un déficit de insulina^{3,4}. El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R	TRIS pH 7,4	92 mmol/L
	Fenol	0,3 mmol/L
	Glucoza oxidasa (GOD)	15000 U/L
	Peroxidasa (POD)	1000 U/L
	4 - Aminofenazona (4-AF)	2,6 mmol/L
CAL GLUCOSA	Patrón primario acuoso de Glucoza 100 mg/dL	

PREPARACIÓN

El reactivo y el calibrador están listos para su uso.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables, hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial, cuando se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita la contaminación durante su uso. No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Absorbancias (A) del Blanco a 505 nm \geq 0,32.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 505 nm.
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

Suero o plasma, libre de hemólisis⁵.
 El suero debe separarse lo antes posible del coágulo.
 Estabilidad de la muestra: La glucoza en suero o plasma es estable 3 días a 2-8°C.

PROCEDIMIENTO

1. Condiciones del ensayo:
 Longitud de onda: 505 nm (490-550)
 Cubeta: 1 cm paso de luz
 Temperatura: 37°C / 15-25°C
2. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
3. Pipetear en una cubeta:

	Blanco	Patrón	Muestra
R (mL)	1,0	1,0	1,0
Patrón ^(Nota 1,2) (µL)	--	10	--
Muestra (µL)	--	--	10
4. Mezclar e incubar 10 minutos a 37°C ó 20 min a temperatura ambiente (15-25°C).
5. Leer la absorbancia (A) del patrón y la muestra, frente al Blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 30 minutos.

CÁLCULOS

AI $\frac{(A)Muestra}{(A)Patrón} \times 100 (\text{Conc. Patrón}) = \text{mg/dL de glucoza en la muestra}$
Factor de conversión: mg/dL x 0,0555 = mmol/L.

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados: CONTROL Normal y Patológico (Ref. MO-165107 y MO-165108)
 Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, se debe revisar los instrumentos, los reactivos y la calibración.
 Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

VALORES DE REFERENCIA¹

Suero o plasma:
 60 - 110 mg/dL \cong 3,33 - 6,10 mmol/L
 Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

Rango de medida: Desde el límite de detección 0,033 mg/dL hasta el límite de linealidad 500 mg/dL.
 Si la concentración de la muestra es superior al límite de linealidad, diluir 1/2 con ClNa 9 g/L y multiplicar el resultado final por 2.

Precisión:

Media (mg/dL)	Intraserie (n=20)		Interserie (n=20)	
	86,7	235	92,5	250
SD	0,44	0,86	2,76	6,44
CV (%)	0,51	0,37	2,98	2,57

Sensibilidad analítica: 1 mg/dL = 0,0039 (A).

Exactitud: Los reactivos MONLABTEST (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x).
 Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:
 Coeficiente de regresión (r): 0,99492.
 Ecuación de la recta de regresión: y=1,104x - 1,249.
 Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

No se han observado interferencias con hemoglobina hasta 19 g/L y bilirrubina hasta 100 mg/L¹.
 Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación de la glucoza^{3,4}.

NOTAS

1. CAL GLUCOSA: Debido a la naturaleza del producto, es aconsejable tratarlo con sumo cuidado ya que se puede contaminar con facilidad.
2. La calibración con el Patrón acuoso puede dar lugar a errores sistemáticos en métodos automáticos. En este caso, se recomienda utilizar calibradores séricos.
3. Usar puntas de pipeta desechables limpias para su dispensación.
4. **MONLAB dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.**

BIBLIOGRAFÍA

1. Kaplan L.A. Glucose. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1032-1036.
2. Trinder P. Ann Clin Biochem 1969; 6: 24-33.
3. Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
4. Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
5. Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
6. Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.

PRESENTACIÓN

Ref.: MO-165086 R: 2 x 125 mL CAL: 1 x 5 mL	Ref.: MO-165087 R: 1 x 1000 mL CAL: 1 x 5 mL
---	--

SÍMBOLOS UTILIZADOS PARA COMPONENTES Y REACTIVOS IVD

	Fabricante		Uso de diagnóstico in vitro
	No reutilizar		Consultar las instrucciones de uso
	Contiene suficiente para <n> test		Mantener seco
	Código		Límite de temperatura
	Número de lote		Fecha de caducidad

ANEXO 08: ACTIVACIÓN Y CULTIVO PARA *Saccharomyces cerevisiae* ATCC

4126.

Tabla A321: Composición de los medios de mantención, activación y cultivo para *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126.

Medio	Nutriente	Concentración (g/l)
Sólido de mantención (YM sólido)	Extracto de levadura	3
	Peptona	5
	Extracto de malta	3
	Agar	20
	Glucosa	10
Activación	Glucosa	15
	Extracto de levadura	3
	Extracto de malta	5
	Solución de sales	5 ml/L
Fermentación	Hidrolizado	28 %v/v
	Extracto de levadura	10 g/L
	(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g/L
	KH ₂ PO ₄	1 g/L
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0.43 g/L
	Solución de sales	10 ml/L
	Tampón citrato pH 4,2	100 ml/L

Fuente: *Manual de bioprocesos, Universidad nacional del santa. Castillo, A.(2015)*

Umáx = 0,37 h⁻¹ en glucosa a 35°C (Lane, M. y Morrissey, J. 2010)

Composición de la solución de sales 100 veces concentrado, utilizadas en los medios de cultivo en g/L: 1,12 CaCL₂.2H₂O; 0.11 ZnSO₄ 7H₂O; 0.06 FeSO₄.7H₂O; 0,05 CuSO₄.5H₂O; 0.01 CoCl₂.6H₂O; 0.0005 MoO₃; 0.027 MnCl₂ 6H₂O y 0,28 NaCl

Condiciones de cultivo: Temperatura 35° y velocidad de agitación de 180 rpm en el agitador orbital (Shaker).

ENZYMES FOR THE HYDROLYSIS OF LIGNOCELLULOSIC MATERIALS

You have received the Novozymes Cellulosic Ethanol Enzyme Kit. This document contains useful information designed to help you understand more about cellulosic ethanol production and how our innovative enzymes can optimize your plant processes and enable commercialization.

Following this brief overview of our work with cellulosic ethanol, you will find basic application information regarding the use of the enzymes contained in this sample kit. More specific details about the characteristics, activity, dosage, etc. of each enzyme are included in the Appendices beginning on page 6.

Overview

Novozymes leads the way in cellulosic ethanol through broad partnerships that employ many feedstocks and processes. We provide the industry's best enzyme solutions and process optimizations to enable commercialization with partners and in our own labs.

We take a holistic approach in developing next-generation bioinnovations to meet your company's ever-changing needs. Along with our unprecedented R&D efforts, we also work closely with our partners to bring different competencies together in an effort to fully understand the critical relationship between process mechanics and enzymes. Together we can create solutions that realize the promise of renewable energy.

Cellulosic ethanol can be a major source of sustainable energy. Many feedstocks – including corn cobs, wheat straw, woody biomass, and municipal solid waste – are readily available, and it is estimated that cellulosic ethanol will reduce CO₂ emissions by 90% compared to petroleum-based fuels.

The complex structure of biomass make it more difficult to convert into ethanol than traditional starch substrates. This has presented unique technical and economic challenges in bringing cellulosic ethanol to market. Enzymes are vital in the conversion of biomass to ethanol, and the state-of-the-art Novozymes Cellic[®] solutions make the technology available at a commercially viable cost. Our groundbreaking innovation is a result of our commitment to creating sustainable solutions that improve the environment and enhance your business.

We are working every day to develop technologies that allow more types of biomass to be turned into commercially viable biofuel.

Our biomass test kit provides you with our leading enzymes for enabling the conversion of a variety of cellulosic feedstocks.

Application

In order to maximize the yield from enzyme hydrolysis, a combination of enzyme activities must be used. The optimal enzyme blend greatly depends on the composition of the various fractions (cellulose, hemicellulose, and lignin) in the biomass substrate. Experiments should be conducted to determine which enzymes and pretreatment method will work best on a specific feedstock.

The following tables contain information on the enzymes included in the test kit. The suggested enzyme dosage is based on weight percentage relative to the amount of biomass (total solids) on a dry basis. The required enzyme dosage may vary significantly based on the specific composition of the biomass feedstock and the particular physical and/or chemical pretreatment method used. Even though some of the enzymes have high temperature ranges, they will still work at lower temperatures, albeit at reduced activity. Operating at temperatures above the upper limit can result in irreversible enzyme denaturation. The general impact of temperature on enzyme activity and stability is shown in Appendix B.



Find out more at
www.bioenergy.novozymes.com

Enzyme classification	Activity ¹	Density ² (g/ml)	pH	Temperature (°C)	Dosage ³ (% w/w (TS))
NS22086 Cellulase complex	1,000 BHU(2)/g	1.15	5.0–5.5	45–50	1–5%
NS22083 Xylanase	2,500 FXU-S/g	1.09	4.5–6.0	35–55	0.05–0.25%
NS22118 β-glucosidase	250 CBU/g	1.2	2.5–6.5	45–70	0.2–0.6%
NS22119 Enzyme complex	100 FBG/g (~ 13,700 PGU/g)	1.19	4.5–6.0	25–55	0.05–0.4%
NS22002 Hemicellulase	45 FBG/g (~ 470 FXU/g)	1.20	5.0–6.5	40–60	0.4–2%
NS22035 Glucoamylase	750 AGU/g	1.15	4.5–5.5	60–70	0.01–0.06%

Table 2. Enzyme activity, density, pH, temperature, and recommended dosage.

1) EGU = Endo-Glucanase Unit, CBU = CelloBiase Unit, FBG = Fungal Beta-Glucanase Unit, PGU = PolyGalacturonase Unit, FXU-S = Fungal Xylanase Unit, and AGU = AmyloGlucosidase Unit. See Appendix A for further information on activity units.

2) Density values are approximate.

3) The required dosage is heavily dependent on feedstock type, pretreatment technology, and processing conditions. Enzyme dosage requirements may therefore vary significantly.

Pretreatment conditions must be optimized to achieve the maximum conversion of polysaccharides to fermentable sugars while minimizing the enzyme requirement. It is essential to evaluate the pretreated biomass for cellulose digestibility at an appropriate solids concentration.



If the solids concentration in a hydrolysis experiment is too high, nonenzymatic factors can be introduced that will interfere with the interpretation of the results. A range of 2–5% total solids (TS) loading is suggested for determining the efficacy of the pretreatment system. Results can be compared by evaluating the required enzyme dosage per mass of cellulose in the feedstock (cellulose content can be determined chemically) in order to give an indication of the enzymatic digestibility of the pretreated substrate (i.e., the efficiency of the pretreatment technology).

Note: Inhibition of enzymatic hydrolysis

The pretreatment method can create inhibiting products that can reduce the performance of the enzyme, resulting in lower cellulose conversion and/or increased enzyme dosage. Lignin and xylo-oligomer released during the pretreatment process can interfere with enzymatic performance by binding irreversibly to the enzymes or by blocking enzyme access to the substrate. An optimal degree of pretreatment does exist where the carbohydrate enzyme accessibility is maximized while the enzyme (and microorganism) inhibition is minimized.

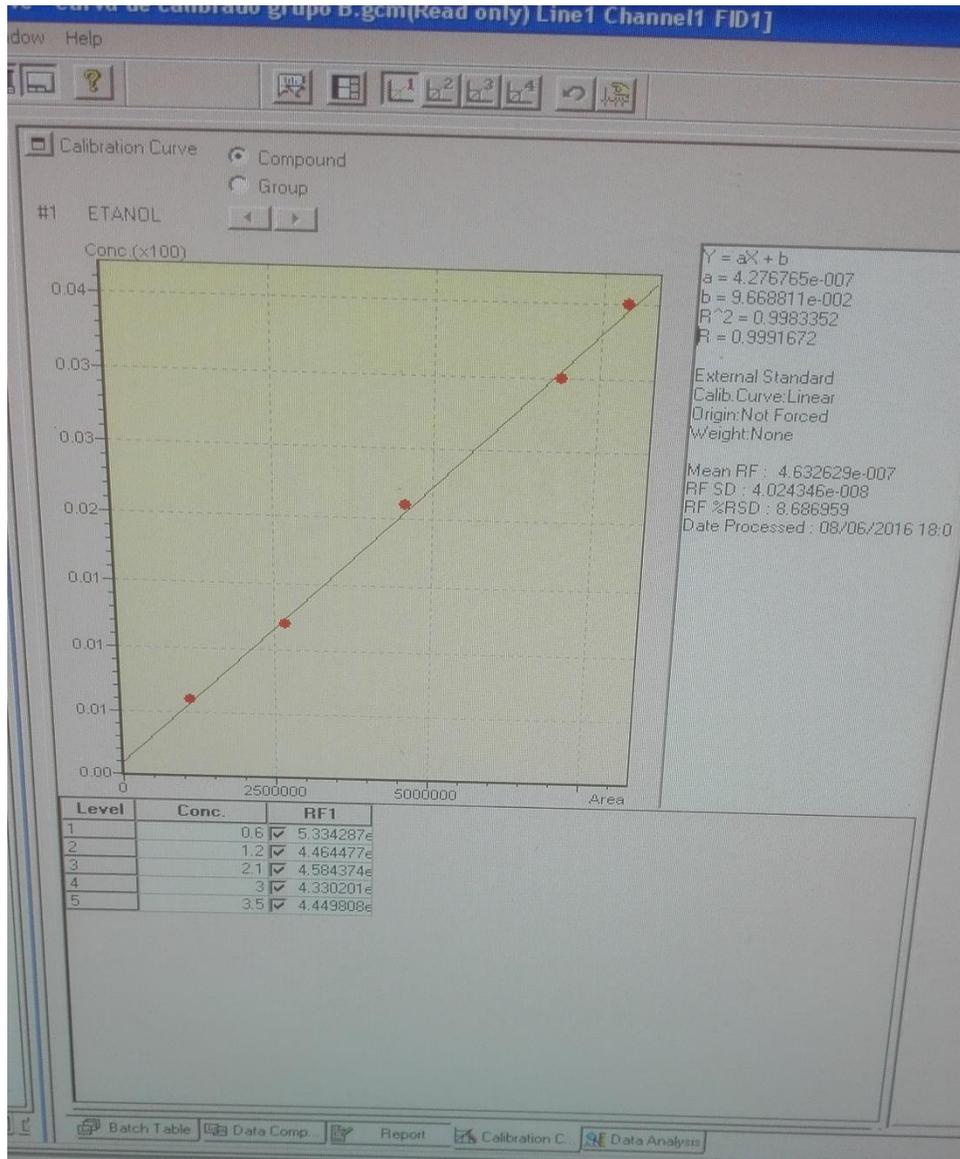
From a cost perspective, it is normally advantageous to perform hydrolysis at the highest possible total solids in order to achieve maximum sugar concentrations.

NS number	Enzyme type	Description
NS22086	Cellulase complex	<ul style="list-style-type: none"> - Primary enzyme for use in the hydrolysis of lignocellulosic material - Catalyzes the breakdown of cellulosic material into glucose, cellobiose, and higher glucose polymers - Can be used to reduce the viscosity or increase the extraction yield of various products of plant origin - The main reaction products of cellulose hydrolysis using NS22086 are cellobiose and glucose - Testing for synergy with NS22118 and NS22083 is recommended to maximize performance
NS22083	Xylanase	<ul style="list-style-type: none"> - Purified endoxylanase with a high specificity toward soluble pentosans - Able to liberate pentose sugars from biomass hemicellulose fractions - Can be used to supplement NS22086 for pretreatment that leaves a significant portion of the hemicellulose intact (i.e., neutral-pH or alkaline pretreatment methods)
NS22118	β -glucosidase	<ul style="list-style-type: none"> - Also known as cellobiase; hydrolyzes cellobiose to glucose - Can be used to supplement NS22086 in order to increase the yield of fermentable sugars - Addition should be approximately 0–4% (v/v) of the amount of NS22086 for complete hydrolysis of the available cellulose
NS22119	Enzyme complex	<ul style="list-style-type: none"> - Contains a wide range of carbohydrases, including arabinase, β-glucanase, cellulase, hemicellulase, pectinase, and xylanase - Can break down cell walls for the extraction of useful components from plant tissue - Able to liberate bound materials and degrade a variety of nonstarch polysaccharides - Can be used to supplement NS22086 for substrates containing pectin
NS22002	β -glucanase Xylanase	<ul style="list-style-type: none"> - Contains a mixture of β-glucanase and xylanase enzyme activities - Possesses additional side activities, including cellulase, hemicellulase, and pentosanase - Can be used to supplement NS22086 for pretreatment that leaves a significant portion of the hemicellulose intact (i.e., neutral-pH or alkaline pretreatment methods)
NS22035	Glucoamylase	<ul style="list-style-type: none"> - Used on liquefied starch-containing substrates to produce sugars for fermentation - Works in dedicated saccharification stages as well as simultaneous saccharification and fermentation - Glucoamylases hydrolyze both 1,4- and 1,6-alpha linkages to liberate glucose for subsequent fermentation by the yeast

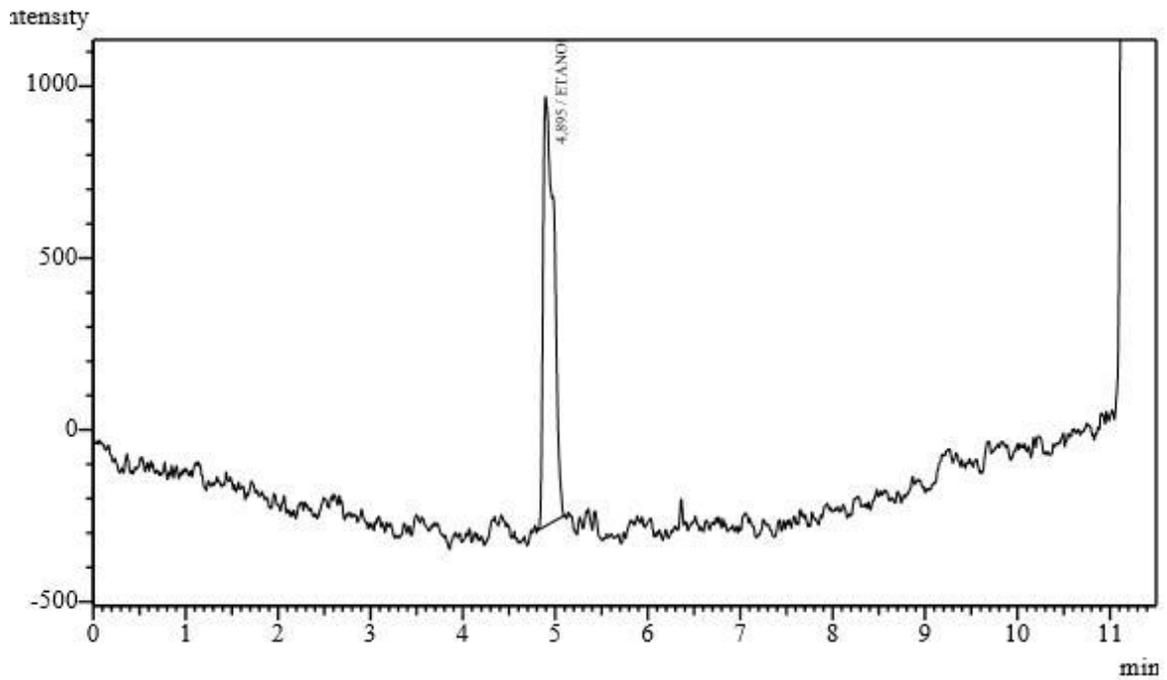
Table 1. Descriptions of enzymes contained in Novozymes' cellulosic ethanol enzyme kit.

ANEXO N° 10: CROMATOGRAMAS DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ETANOL

Curva de calibrado

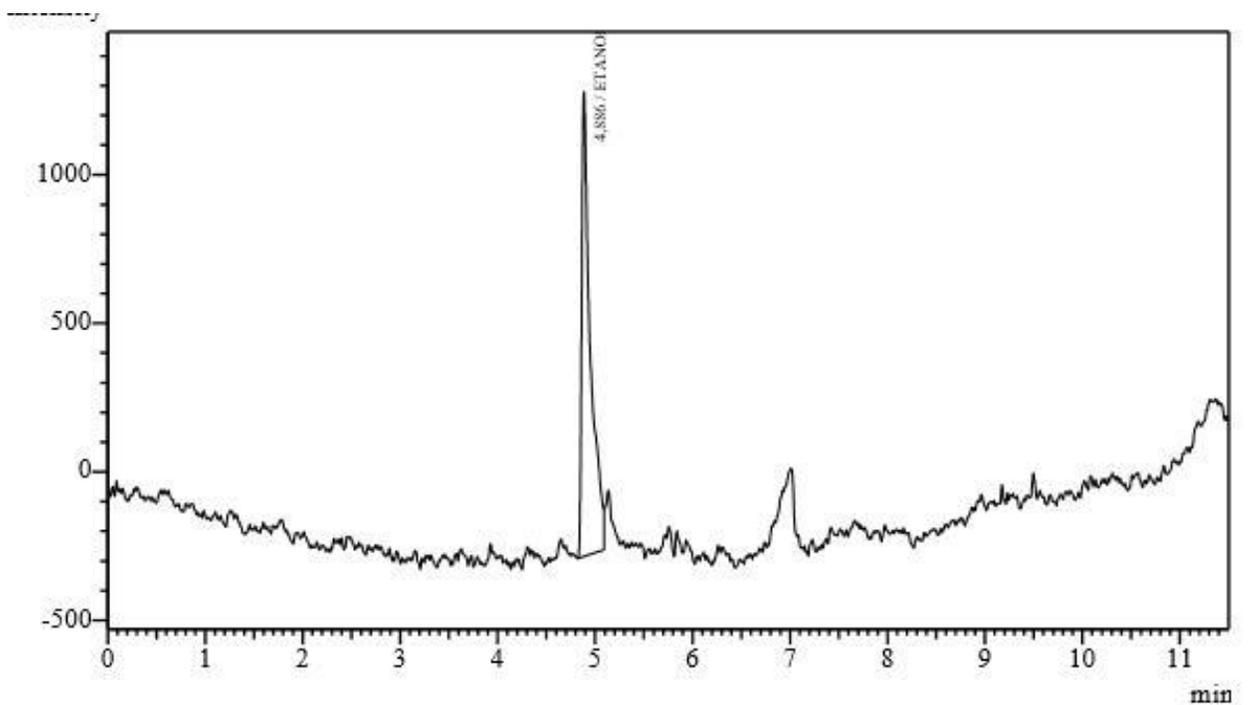


Tiempo: 0 horas



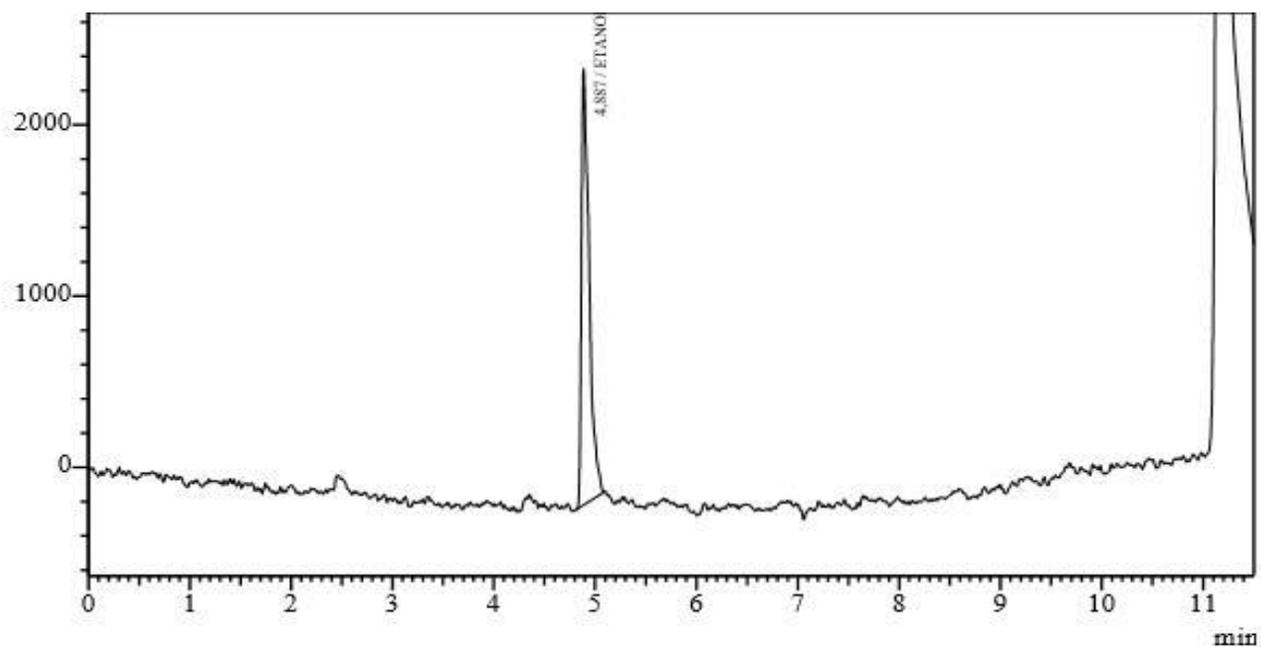
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	4,895	10087	1248	0,543	g/L		1	ETANOL
Total		10087	1248					

Tiempo: 4 horas



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	4,886	9629	1560	0,518	g/L		1	ETANOL
Total		9629	1560					

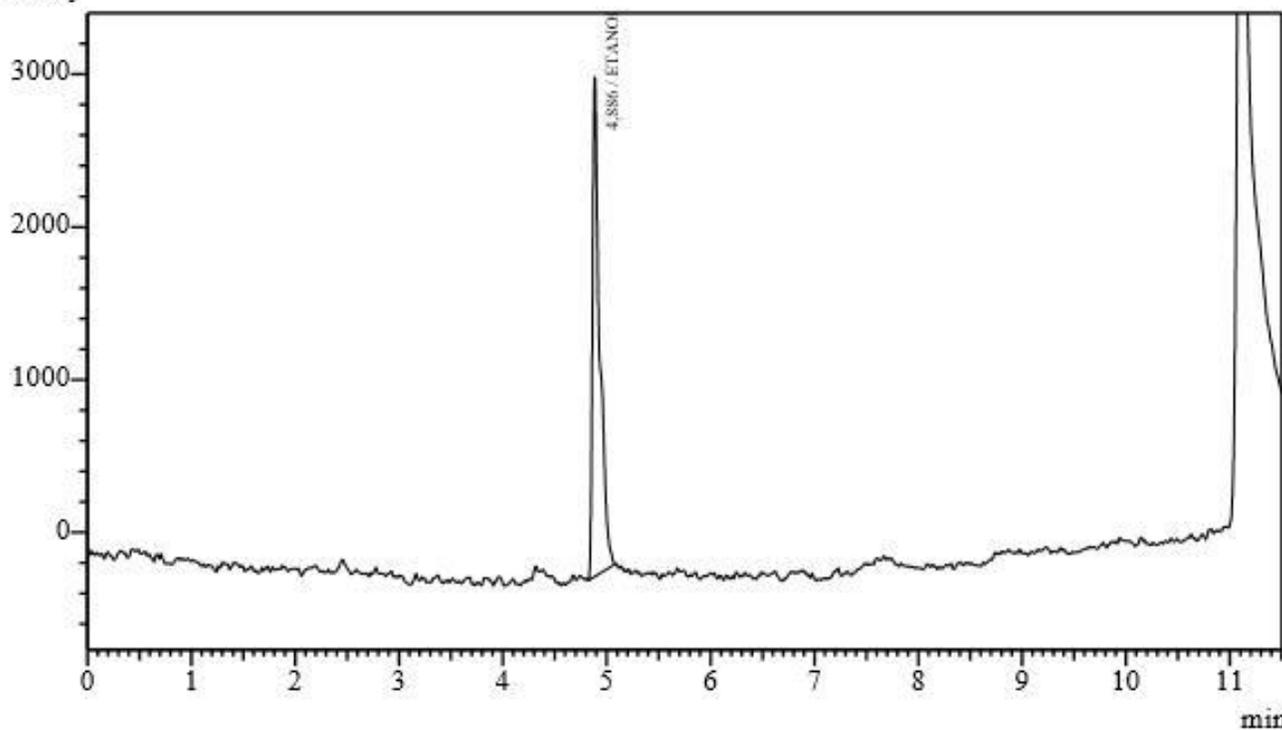
Tiempo: 6 horas



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	4,887	13393	2533	0,726	g/L		1	ETANOL
Total		13393	2533					

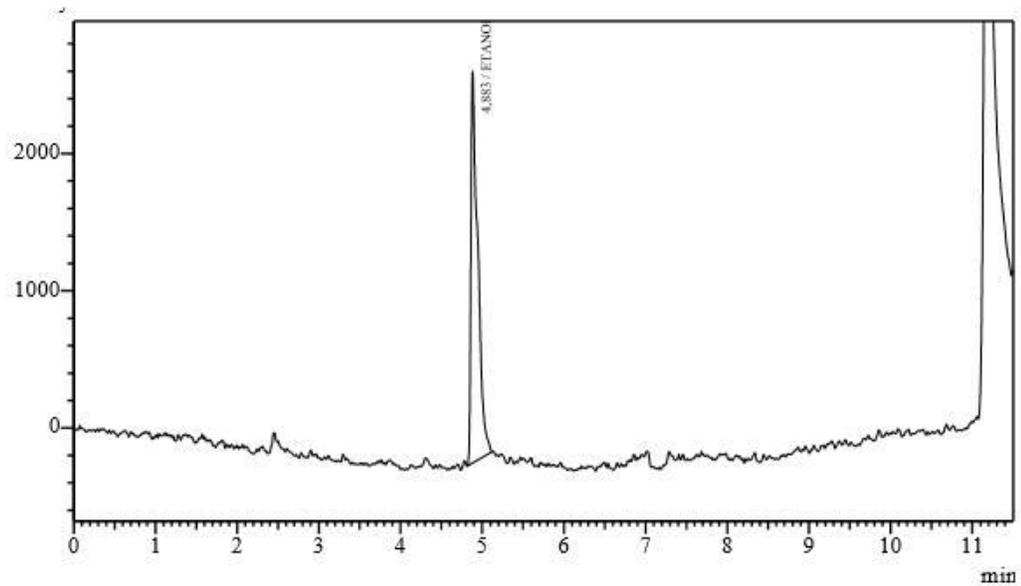
Tiempo: 8 horas

amomay



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	4,886	15697	3264	0,854	g/L		1	ETANOL
Total		15697	3264					

Tiempo: 12 horas



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Unit	Mark	ID#	Cmpd Name
1	4,883	16651	2845	0,907	g/L		1	ETANOL
Total		16651	2845					