



UTMACH

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA

CINÉTICA DE SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN PARA
PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE CÁSCARA DE BANANO
MADURO MEDIANTE PRETRATAMIENTO DE SECADO.

BADARACO OCAÑA ROLLY DECKER
INGENIERO QUÍMICO

VEINTIMILLA CARDENAS GARY FAVIO
INGENIERO QUÍMICO

MACHALA
2019



UTMACH

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA
SALUD

CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA

CINÉTICA DE SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN PARA
PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE CÁSCARA DE
BANANO MADURO MEDIANTE PRETRATAMIENTO DE
SECADO.

BADARACO OCAÑA ROLLY DECKER
INGENIERO QUÍMICO

VEINTIMILLA CARDENAS GARY FAVIO
INGENIERO QUÍMICO

MACHALA
2019



UTMACH

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA
SALUD

CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA

TRABAJO TITULACIÓN
TRABAJO EXPERIMENTAL

CINÉTICA DE SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN PARA PRODUCCIÓN DE
BIOETANOL A PARTIR DE CÁSCARA DE BANANO MADURO MEDIANTE
PRETRATAMIENTO DE SECADO.

BADARACO OCAÑA ROLLY DECKER
INGENIERO QUÍMICO

VEINTIMILLA CARDENAS GARY FAVIO
INGENIERO QUÍMICO

ROMERO BONILLA HUGO ITALO

MACHALA, 13 DE FEBRERO DE 2019

MACHALA
2019

Nota de aceptación:

Quienes suscriben, en nuestra condición de evaluadores del trabajo de titulación denominado CINÉTICA DE SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN PARA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE CÁSCARA DE BANANO MADURO MEDIANTE PRETRATAMIENTO DE SECADO., hacemos constar que luego de haber revisado el manuscrito del precitado trabajo, consideramos que reúne las condiciones académicas para continuar con la fase de evaluación correspondiente.



ROMERO BONILLA HUGO ITALO
0702616251
TUTOR - ESPECIALISTA 1



MORALES AUZ JAIME ROBERTO
0701132904
ESPECIALISTA 2



PESANTEZ FREDIS FRANCO
0703244012
ESPECIALISTA 3

Machala, 13 de febrero de 2019

Urkund Analysis Result

Analysed Document: Tesis Bioetanol (Urkund).docx (D47262058)
Submitted: 1/25/2019 9:27:00 PM
Submitted By: hromero@utmachala.edu.ec
Significance: 1 %

Sources included in the report:

tesis final.doc (D34390491)

Instances where selected sources appear:

1

CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

Los que suscriben, BADARACO OCAÑA ROLLY DECKER y VEINTIMILLA CARDENAS GARY FAVIO, en calidad de autores del siguiente trabajo escrito titulado CINÉTICA DE SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN PARA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE CÁSCARA DE BANANO MADURO MEDIANTE PRETRATAMIENTO DE SECADO., otorgan a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tienen potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

Los autores declaran que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

Los autores como garantes de la autoría de la obra y en relación a la misma, declaran que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asumen la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.

Machala, 13 de febrero de 2019



BADARACO OCAÑA ROLLY DECKER
0705101939



VEINTIMILLA CARDENAS GARY FAVIO
0705249167

AGRADECIMIENTO

Agradecer en primer lugar a Dios por ser el apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultad y de debilidad.

A mis padres Nelly Cárdenas y Gary Veintimilla por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años de estudio, gracias por la ayuda que me han brindado para cumplir un sueño más.

A Rolly Badaraco por haber sido un excelente compañero de trabajo de titulación y amigo.

A mi tutor Hugo Romero Bonilla PhD. por su amplia experiencia y conocimientos que me orientaron al desarrollo y culminación de este trabajo.

A todos mis amigos y futuros colegas que me ayudaron de una manera desinteresada, gracias infinitas por toda su ayuda y buena voluntad.

Gary Favio Veintimilla Cárdenas

En primer lugar, agradecer a Dios que ha forjado mi camino y me ha guiado por el sendero correcto, por su amor y bondad infinita, por permitirme alcanzar los logros que son gracias a su ayuda y estar junto a mis seres queridos y disfrutar día a día con ellos.

Agradezco a mis padres por haber hecho la persona que soy hoy en día; por formarme con sus reglas, motivándome a seguir mis sueños; muchos logros se los debo a ustedes y este no es excepción.

A mi compañero de trabajo de titulación Gary Veintimilla por acompañarme en este arduo camino y ser parte de muchas alegrías y fracasos

A mi tutor Dr. Hugo Romero, por su valiosa ayuda y asesoramiento en la realización de este trabajo de titulación.

Y gracias a todas las personas que fueron de ayuda directa e indirectamente en la culminación de este trabajo.

Rolly Decker Badaraco Ocaña

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a Dios por ser la guía y la fuente de apoyo en el transcurso de mi vida.

El presente trabajo de grado va dedicado a mis padres y mi hermana, quienes con su apoyo incondicional, amor y confianza permitieron que logre culminar mi carrera profesional.

A mí querida Jossy por estar siempre en los momentos más turbulentos, por la paciencia y motivación que me ha aportado en cada uno de mis logros.

Gary Favio Veintimilla Cárdenas

Dedico este trabajo a mi abuelito Homero Ocaña quien en paz descansa y aunque ya no esté presente quiero que sepa que siempre fue mi inspiración y un ejemplo a seguir.

A mis padres, Marilú Ocaña y Rómulo Badaraco por su apoyo incondicional, su esfuerzo y por confiar en mí durante todo el transcurso de mi carrera universitaria.

A mis hermanas y familia en general que también me motivaron a perseguir mis objetivos, aumentando mi confianza para culminar esta etapa de mi vida.

Rolly Decker Badaraco Ocaña

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la cinética de bioconversión de la cáscara de banano maduro en bioetanol, mediante su sacarificación y fermentación alcohólica aprovechando así, los residuos orgánicos en este caso la cáscara de banano para obtener un biocombustible que haga frente a la escasez de fuentes de energía no renovables. La caracterización de los componentes lignocelulósicos de la cáscara de banano se determinó mediante análisis termogravimétrico para conocer el porcentaje inicial de Lignina, Celulosa y Hemicelulosa, el cual fue $21.12 \pm 0,24\%$, $19.33 \pm 0,28\%$ y $11.43 \pm 0,39\%$ respectivamente.

Las cáscaras de banano maduro fueron solicitadas en la empresa “Diana Food” ubicada en la parroquia de la Peaña de la ciudad de Pasaje, estas a su vez fueron transportadas al laboratorio de investigación para posteriormente seleccionar las cáscaras en un mismo grado de maduración para ser previamente secadas en una incubadora a 70°C por 4 días. Posteriormente se redujo su tamaño de partícula mediante molienda mecánica hasta malla de $250 \mu\text{m}$. La mezcla del sustrato celulósico al 5% p/v y agua fue sometida a agitación constante controlada durante 24 horas, a un pH de 4.8 y una temperatura de 40°C . En estas condiciones se le agregó la enzima comercial celulasa al sustrato lignocelulósico para realizar la hidrólisis enzimática. La cantidad de azúcares reductores producida durante este proceso aerobio fue determinada por el método del ácido dinitro salicílico (DNS) por colorimetría con un espectrofotómetro de UV-Visible con una longitud de onda de 540 nm. Para ello, se realizaron 3 tratamientos en relación a la cantidad de inóculo añadido para la hidrólisis enzimática, los cuales fueron $30 \mu\text{L/g}$ de sustrato procesado (D1), $60 \mu\text{L/g}$ de sustrato procesado y $90 \mu\text{L/g}$ de sustrato procesado respectivamente. Obteniendo mejores resultados a las 4 horas de hidrólisis enzimática con el tratamiento D1 con un rendimiento de azúcares reductores de 4750 ppm.

Para la fermentación alcohólica se procedió a inactivar previamente la enzima en un equipo de autoclave a 121°C en un lapso de 15 min. Luego de lo cual, se realizó una fermentación alcohólica en un biorreactor herméticamente cerrado de color ámbar durante 4 días (96 h) empleando como inóculo la levadura *Saccharomyces cerevisiae* previamente activada a 37°C con el 10% de sacarosa por 48 horas. Este inóculo fue añadido de acuerdo a la glucosa obtenida del proceso de hidrólisis enzimática (1mL de levadura activada /1000mL de hidrolizado). El bioetanol fue cuantificado por cromatografía de gases con un tiempo de retención de 3 minutos correspondientes a un

área ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$) de 993976,9. Se obtuvo como resultado 11050 ppm de azúcares reductores ($11,05\pm 0,44$ g/L) y 7609 ppm de etanol ($7,6\pm 0,17$ g/L). Para determinar la constante de velocidad se empleó un modelo cinético de Monod el cual dio como resultado una constante cinética de sacarificación obtenida de $K= 0,169$ g/L·h, mientras que la constante cinética de fermentación alcohólica fue de $K= 0,697$ g/L·h. Demostrando así que un pretratamiento físico nos permite realizar una mejor bioconversión de los componentes lignocelulósicos de la cáscara de banano maduro para la obtención de bioetanol.

Palabras claves: Hidrólisis enzimática, bioetanol, cinética, fermentación alcohólica, cáscara de banano.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the kinetics of bioconversion of the ripe banana peel in bioethanol, by saccharification and alcoholic fermentation, taking advantage of the organic waste in this case the banana peel to obtain a biofuel to cope with the shortage of Non-renewable energy sources. The characterization of the lignocellulosic components of the banana peel was determined by thermogravimetric analysis to know the initial percentage of Lignin, Cellulose and Hemicellulose, which was $21.12 \pm 0.24\%$, $19.33 \pm 0.28\%$ and $11.43 \pm 0.39\%$ respectively.

The "banana peels" were requested in the company "Diana Food", located in the parish of the city of the city. Past, these times were also transported in the research laboratory to select the husks in the same degree of maturation to be previously dried in an incubator at $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 4 days. Subsequently, its particle size was reduced by mechanical grinding to $250\text{ }\mu\text{m}$ mesh. The mixture of the cellulose substrate at 5% w / v and the water was subjected to a constant agitation for 24 hours, at a pH of 4.8 and a temperature of $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Under these conditions, the commercial enzyme cellulase is obtained in the lignocellulosic substrate for perform enzymatic hydrolysis. The amount of reducing sugars produced during this aerobic process was determined by the dinitro salicylic acid (DNS) method by colorimetry with a UV-Visible spectrophotometer with a wavelength of 540 nm. For this, see 3 treatments in relation to the amount of inoculum for enzymatic hydrolysis, which were $30\text{ }\mu\text{L/g}$ of processed substrate (D1), $60\text{ }\mu\text{L/g}$ of processed substrate and $90\text{ }\mu\text{L/g}$ of processed substrate respectively. Obtaining better results at 4 hours of enzymatic hydrolysis with the D1 treatment with a yield of reducing sugars of 4750 ppm.

For alcoholic fermentation, the enzyme was previously inactivated in an autoclave set at $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ within 15 min. Then, over 4 days (96 h) using the yeast as inoculum, *Saccharomyces cerevisiae* was previously activated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ with 10% sucrose for 48 hours. This inoculum was added to the glucose to the correct response of the enzymatic hydrolysis process (1 ml of activated yeast / 1000 ml of hydrolyzate). The bioethanol was quantified by gas chromatography with a retention time of 3 minutes in one area (UV*s) of 993976.9. The result was 11050 ppm of reducing sugars ($11.05 \pm 0.44\text{ g / L}$) and 7609 ppm of ethanol ($7.6 \pm 0.17\text{ g/L}$). To determine the constant of the speed, a kinetic model of Monod was used, which resulted in a kinetic constant of

saccharification that of $K = 0.169 \text{ g/L}\cdot\text{h}$, while the kinetic constant of alcoholic fermentation was $K = 0.697 \text{ g/L}\cdot\text{h}$. Demonstrating that a physical pretreatment allows us to perform a better bioconversion of the lignocellulosic components of the ripe banana peel to obtain bioethanol.

Keywords: Enzymatic hydrolysis, bioethanol, kinetics, alcoholic fermentation, banana peel

ÍNDICE

AGRADECIMIENTO	I
DEDICATORIA	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT	VI
ÍNDICE	VIII
TABLA DE ILUSTRACIONES	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABLAS	XI
ÍNDICE DE ANEXOS	XII
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
PROBLEMA.....	2
JUSTIFICACIÓN	2
OBJETIVOS	4
OBJETIVO GENERAL.....	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
HIPÓTESIS	4
HIPÓTESIS NULA	4
HIPÓTESIS ALTERNATIVA.....	4
CAPÍTULO II	5
2. MARCO REFERENCIAL	5
2.1 MINIMIZACIÓN DE RESIDUOS	5
2.2 BIOMASA AGRO-INDUSTRIAL	5
2.2.1 COMPONENTES LIGNOCELULÓSICOS DE LOS RESIDUOS AGRÍCOLAS	6
2.2.1.1 LIGNINA.....	7
2.2.1.2 HEMICELULOSA.....	7
2.2.1.3 CELULOSA	8
2.2.1.4 HOLOCELULOSA.....	8
2.3 PRETRATAMIENTOS LIGNOCELULÓSICOS	8
2.3.1 PRETRATAMIENTO FÍSICO	9

2.3.2	PRETRATAMIENTO QUÍMICO	10
2.3.3	PRETRATAMIENTO FÍSICO-QUÍMICO	10
2.3.4	PRETRATAMIENTO BIOLÓGICO	10
2.4	SACARIFICACIÓN DE RESIDUOS	11
2.5	HIDRÓLISIS.....	12
2.5.1	HIDRÓLISIS ÁCIDA.....	12
2.5.2	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.....	12
2.6	ENZIMAS COMERCIALES	12
2.6.1	CELULASA	13
2.7	CÁSCARA DE BANANO	13
2.7.1	USOS DE LA CÁSCARA DE BANANO	14
2.8	BIOENERGÍA.....	15
2.8.1	ETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN	15
2.9	FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA	16
2.10	CINÉTICA DE BIOCONVERSIÓN.....	16
2.11	CONSTANTE CINÉTICA	17
	CAPÍTULO III.....	18
3.	METODOLOGÍA	18
3.1	MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1.1	MATERIALES.....	18
3.1.2	REACTIVOS	18
3.1.3	EQUIPOS.....	19
3.2	UBICACIÓN DE INVESTIGACIÓN.....	19
3.3	OBTENCIÓN DE LA MATERIA PRIMA	19
3.4	ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LA CÁSCARA DE BANANO	19
3.4.1	PREPARACIÓN DE SUSTRATO	19
3.4.2	PROPORCIÓN DEL RESIDUO LIGNOCELULÓSICO.....	20
3.4.3	ADICIÓN DEL CÓCTEL ENZIMÁTICO.....	20
3.4.4	MEDICIÓN DE LOS AZÚCARES REDUCTORES	20
3.4.5	PROCESO DE FERMENTACIÓN DE LAS CÁSCARAS DE BANANO.....	20
3.4.6	DETERMINACIÓN DE ETANOL.....	21
3.5	CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPONENTES LIGNOCELULÓSICOS DE LA CÁSCARA DE BANANO	22

3.5.1	DETERMINACIÓN DE LIGNINA.....	22
3.5.2	DETERMINACIÓN DE HOLOCELULOSA	22
3.5.3	DETERMINACIÓN DE CELULOSA.....	22
3.5.4	DETERMINACIÓN DE HEMICELULOSA	23
3.6	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	23
CAPÍTULO IV		24
4.	RESULTADOS.....	24
4.1	CARACTERIZACIÓN DE LA CÁSCARA DE BANANO MADURO	24
4.2	CONCENTRACIÓN DEL INÓCULO RESPECTO AL SUSTRATO LIGNOCELULÓSICO	24
4.3	PROCESO DE SACARIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES LIGNOCELULÓSICOS DE LA CÁSCARA DE BANANO	25
4.4	CINÉTICA DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA CÁSCARA DE BANANO MADURO.....	26
4.5	PROCESO DE FERMENTACIÓN DE LA CÁSCARA DE BANANO PARA LA OBTENCIÓN DE ETANOL	27
4.6	CINÉTICA DE LA FERMENTACIÓN	28
4.7	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ETANOL OBTENIDO EN LA FERMENTACIÓN DE LA CÁSCARA DE BANANO MADURO	29
CAPÍTULO V		30
5.	CONCLUSIONES	30
CAPÍTULO VI		31
6.	RECOMENDACIONES	31
ANEXOS		42

TABLA DE ILUSTRACIONES

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de pre-tratamientos para biomasa lignocelulósica.	9
Figura 2. Reactor de fermentación	21
Figura 3. Caracterización de los componentes lignocelulósicos presentes en la cáscara de banano maduro seca.....	24
Figura 4. Glucosa obtenida a partir de la variación de la concentración de celulosa durante la hidrólisis enzimática.....	25
Figura 5. Comportamiento de los azúcares reductores durante la hidrólisis enzimática de la cáscara de banano maduro al 5%.p/v.	26
Figura 6. Cinética hidrólisis enzimática del 5% p/v de cáscara de banano maduro en polvo (*) Concentración de glucosa (ppm).	27
Figura 7. Comportamiento de la concentración de etanol de la cáscara de banano maduro al 5% p/v luego de 4 días de fermentación.	28
Figura 8. Cinética de fermentación de la cáscara de banano maduro en polvo al 5% (*) Concentración de etanol (ppm).	28
Figura 9. Cromatograma de etanol presente en la fermentación alcohólica de las cáscaras de banano maduro al 5% p/v.....	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición porcentual de componentes lignocelulósicos en diversos residuos orgánicos.....	7
Tabla 2. Ejemplos de aplicaciones industriales de enzimas.	13
Tabla 3. Composición química de la cáscara de banano.	14
Tabla 4. Diseño del experimento.....	23

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Secado de la cáscara de banano maduro	42
Anexo 2. Cáscara de banano maduro seca	42
Anexo 3. Molienda de cáscara seca de banano maduro	43
Anexo 4. Proceso de hidrólisis enzimática	43
Anexo 5. Condiciones del proceso de hidrólisis enzimática	44
Anexo 6. Medición de azúcares reductores en el espectrofotómetro UV-Visible	44
Anexo 7. Biorreactor de fermentación alcohólica	45
Anexo 8. Determinación de etanol por cromatografía de gases	45
Anexo 9. Caracterización de lignina	46
Anexo 10. Caracterización de celulosa	46
Anexo 11. Caracterización de Holocelulosa.....	47

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con British Petroleum la reserva total de petróleo y gas natural en el mundo hasta el final del año 2017, se vio disminuida en 0.5 mil millones de barriles, sobre la base del consumo de energía actual, estas reservas podrían soportar aproximadamente el consumo de energía para los próximos 50.2 años. El agotamiento de suministro de energía ha aumentado el interés mundial en una búsqueda exhaustiva de fuentes alternativas de energía que sean renovables, sostenibles y respetuosas con el medio ambiente.

Es por ello que los biocombustibles, entre ellos el bioetanol es reconocido mundialmente como una alternativa a los combustibles de transporte derivados del petróleo. Este biocombustible se produce principalmente a partir de la fermentación de azúcares presentes en materia prima de origen vegetal así como también de la hidrólisis de los desechos agrícolas, forestales o industriales caracterizados por ser una materia prima de bajo costo que no amenaza a la biodiversidad.

Siendo Ecuador un país biodiverso en producción agrícola es una rica fuente también de biomasa lignocelulósica para la producción de bioetanol, según el INEC en el 2016 la costa ecuatoriana generó el 62% de residuos orgánicos que fueron destinados a rellenos sanitarios y botaderos.

El presente estudio busca aprovechar uno de los residuos orgánicos como lo es la cáscara del banano maduro para obtener bioetanol mediante la sacarificación de la biomasa efectuando una hidrólisis enzimática para su posterior fermentación alcohólica.

PROBLEMA

La provincia de El Oro es una de las más grandes productoras de banano en el Ecuador caracterizada por la buena calidad de su fruto. Gracias al banano han surgido empresas que usan esta materia prima para diversos procesos alimenticios, como la harina de banano o el deshidratado de banano. En lo cual muchas de las veces los residuos orgánicos provenientes de estos procesos como lo son las cáscaras no son aprovechadas en su totalidad, generando una acumulación de desperdicio que son el principal cultivo de muchos agentes patógenos generando contaminación ambiental.

Esto nos conlleva a aprovechar el residuo orgánico para obtener un biocombustible que haga frente a la escasez de fuentes de energía no renovable.

JUSTIFICACIÓN

El consumo de energía ha incrementado constantemente durante el último siglo debido a que la población mundial se ha multiplicado y que más países se han industrializado. El petróleo crudo ha sido la principal fuente de explotación para satisfacer las necesidades crecientes de demanda de energía¹. Combustibles derivados del petróleo como la gasolina han demostrado que pueden conducir a la degradación global del ambiente, como el cambio climático, el efecto invernadero, la lluvia ácida, el agotamiento de ozono, etc.

El interés por nuevas fuentes de energía ha dado paso al bioetanol como posible sustituto de la gasolina². Su producción se ha expandido a países como Estados Unidos y Brasil represando más del 70% de la producción mundial total, con Estados Unidos produciendo 5.3 billones de galones y Brasil produciendo 4.5 billones de galones en el 2006. Otros países, como China y la India, también están adquiriendo un mayor interés en el etanol como combustible alternativo³.

Este biocombustible se puede producir mediante el uso de residuos agrícolas que son unos de los desechos más abundantes en la tierra, el uso de residuos agrícolas como cáscaras de tubérculos o de frutos son el potencial prometedor de fuentes naturales renovables para la producción de bioenergía⁴. Una de las técnicas más factibles para

tratar estos residuos carentes de azúcar y producir el biocombustible es la hidrólisis enzimática, la cual se encarga de hidrolizar la masa sólida mediante el uso de enzimas en azúcares que puedan ser fermentables⁵.

En nuestra provincia El Oro se genera una gran cantidad de residuos agrícolas como lo son las cáscaras de banano, las cuales están compuestas de material de lignocelulosa, el cual mediante la aplicación de enzimas como la celulasa mejora la capacidad de convertir la composición de estos desechos en monómeros de interés para la obtención de bioetanol⁶.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la cinética de la sacarificación y fermentación durante la producción de bioetanol a partir de cáscara de banano maduro mediante pretratamiento de secado.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar mediante análisis físico-químicos la cantidad de componentes lignocelulósicos al emplear un pretratamiento de secado.
- Cuantificar los azúcares fermentables presentes en la cáscara de banano maduro.
- Cuantificar el etanol obtenido del proceso de fermentación alcohólica.
- Determinar la constante de velocidad de la bioconversión de los azúcares fermentables a etanol en el proceso de fermentación alcohólica.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS NULA

No es posible obtener azúcares fermentables a partir de la sacarificación de la cáscara de banano empleando hidrólisis enzimática y su posterior bioconversión en etanol mediante fermentación alcohólica.

No es posible determinar la cinética de la bioconversión de los azúcares fermentables a etanol en el proceso de fermentación alcohólica.

HIPÓTESIS ALTERNATIVA

Es posible obtener azúcares fermentables a partir de la sacarificación de la cáscara de banano empleando hidrólisis enzimática y su posterior bioconversión en etanol mediante fermentación alcohólica.

Sí es posible determinar la cinética de la bioconversión de los azúcares fermentables a etanol en el proceso de fermentación alcohólica.

CAPÍTULO II

2. MARCO REFERENCIAL

2.1 MINIMIZACIÓN DE RESIDUOS

Los residuos son aquellos que se generan a partir de procesos industriales, el manejo y la eliminación inadecuados de estos residuos pueden causar problemas higiénicos y ambientales, es por ello que la minimización de residuos tiene por objetivo reducir la cantidad de desechos que se descarga al medio ambiente al reducir la cantidad de desechos generados⁷.

Los residuos pueden ser aprovechados según su reutilización o reciclaje, como se describe a continuación:

- Recuperación de energía: Manejan a los residuos como una fuente de energía a través del tratamiento térmico ya sea por incineración, gasificación y pirolisis generando vapor para el funcionamiento de maquinarias⁸.
- Reprocesamiento físico: Este proceso maneja grandes volúmenes de residuos; atraviesa diferentes pasos, como la eliminación de contaminantes, el secado y el reprocesamiento en fusión para producir nueva materia prima⁹.
- Reprocesamiento biológico: Controlan y aceleran el proceso natural de la materia orgánica, tales como, material vegetal, restos de alimentos y productos de papel que pueden recuperarse a través de los procesos de compostaje y digestión como también generar biocombustibles a través de la fermentación y sacarificación¹⁰.

2.2 BIOMASA AGRO-INDUSTRIAL

La biomasa vegetal, posee características biodegradables y además es un recurso renovable, por ello es la fuente de materia orgánica con mayor abundancia en la tierra. Bosques, residuos agroindustriales y residuos municipales, sitios donde podemos encontrar esta biomasa, y por su alta eficiencia energética sirven como fuente potencial para la obtención de etanol, y a su vez ser el reemplazante de la gasolina¹¹. Sus propiedades físicas y químicas los hacen adecuados para su conversión¹².

La biomasa agroindustrial es un recurso natural característico para el acopio a gran escala y rentable de bioenergía, ya que, está compuesta por residuos lignocelulósicos¹³. Por su potencial para la producción de bioproductos y bioenergía sostenible, los residuos de biomasa agroindustrial están recibiendo mayor atención¹⁴.

Los residuos agroindustriales, que se originan durante la cosecha de cultivos y el procesamiento industrial, son una fuente de materiales renovables y de bajo costo. Ha habido un gran interés en emplear estos residuos para obtener polímeros biodegradables como el almidón, las proteínas, la hemicelulosa, la celulosa y la lignina, que pueden usarse para desarrollar películas y compuestos comestibles¹⁵. Toda esta biomasa agroindustrial son adecuados para la fermentación de etanol transformando carbohidratos en azúcares fermentables¹⁵.

Los residuos de biomasa agroindustrial son subproductos de la agricultura o de su industria relacionada, incluidos los tallos de algodón, la paja de trigo y arroz, las cáscaras de coco, las mazorcas de maíz, las ramas de yute y las cáscaras de arroz. Los residuos agrícolas se producen descentralizados y tienen una baja densidad. Debido al alto costo del transporte, es costoso aplicar residuos agrícolas como el combustible principal en las centrales eléctricas. Dentro de los residuos agroindustriales, el estiércol seco se considera una fuente terciaria¹⁶.

2.2.1 COMPONENTES LIGNOCELULÓSICOS DE LOS RESIDUOS AGRÍCOLAS

Los materiales lignocelulósicos son la materia prima más prometedora como recurso natural y renovable esencial para el funcionamiento de las sociedades industriales modernas. Las enormes cantidades de biomasa lignocelulósica pueden convertirse en diferentes productos de alto valor como biocombustibles, productos químicos de valor agregado y fuentes de energía baratas para la fermentación microbiana y producción de enzimas. Todos los materiales vegetales están compuestos principalmente por tres unidades principales, es decir, celulosa, hemicelulosa y lignina. Los materiales lignocelulósicos, incluidos los residuos agrícolas¹³.

Tabla 1. Composición porcentual de componentes lignocelulósicos en diversos residuos orgánicos

Composición porcentual de componentes lignocelulósicos en diversos materiales lignocelulósicos.			
Material Lignocelulósico	Lignina (%)	Hemicelulosa (%)	Celulosa (%)
Bagazo de caña de azúcar	20,00	25	42
Sorgo dulce	21	27	45
Madera dura	18-25	24-40	40-55
Madera blanda	25-35	25-35	45-50
Mazorcas de maíz	15	35	45
Rastrojo de maíz	19	26	38
Paja de arroz	18	24	32,1
Cáscaras de nuez	30-40	25-30	25-30
Pastos	10-30	25-50	25-40
Paja de trigo	16-21	26-32	29-35
Residuos de plátano	14	14,8	13,2
Bagazo	23,33	16,52	58,87
Fibras de calabaza	15,46	17,44	66,59

Fuente: ¹³

2.2.1.1 LIGNINA

La lignina es generalmente la fracción más compleja y más pequeña, que representa aproximadamente el 10-25% de la biomasa en peso¹³. Además es un polímero natural que actúa como pegamento entre las fibras de celulosa de las plantas vivas¹⁷.

La lignina es un complejo polímero amorfo tridimensional compuesto por tres unidades de fenilpropano: p-hidroxifenilo (H), guaicilo (G) y siringilo (S). Estas unidades, que contienen un grupo hidroxilo en la posición para de la cadena de alquilo, están conectadas por diferentes enlaces de éter y carbono a carbono. Además de las funciones de éter creadas durante la biosíntesis de lignina, las cadenas de alquilo también contienen otros grupos oxigenados tales como las funciones de alcohol, carbonilo y ácido carboxílico¹⁸.

2.2.1.2 HEMICELULOSA

Las hemicelulosas son carbohidratos amorfos ramificados que representan el 15-30% de la biomasa lignocelulósica en peso¹⁹. Son posiblemente el segundo componente renovable más abundante de biomasa lignocelulósica después de la celulosa. Sin embargo, a diferencia de la celulosa, en la que las unidades monoméricas son químicamente homogéneas, las hemicelulosas son un grupo heterogéneo ramificado de

polisacáridos constituido por piranosas y furanosas azucaradas unidades, incluyendo xilosa, manosa, arabinosa, glucosa y ácido galacturónico²⁰.

2.2.1.3 CELULOSA

La celulosa es el biopolímero natural renovable más abundante en la tierra y está presente en una amplia variedad de especies vivas, incluidas plantas, animales y algunas bacterias. Es el componente estructural principal de las plantas y recupera la importancia como recurso químico renovable para reemplazar los materiales derivados del petróleo. Independientemente de las fuentes, la celulosa consiste en un homopolisacárido lineal compuesto por unidades de -d-glucopiranosas unidas por enlaces de β -1-4. La unidad repetitiva es un dímero de glucosa, conocido como celobiosa²¹.

2.2.1.4 HOLOCELULOSA

La holocelulosa es el principal polímero de la madera, capaz de ser utilizadas como materia prima para la obtención de biocombustibles y bioproductos²², pero tratándose de material lignocelulósico está, por lo tanto, compuesta de celulosa y hemicelulosa²³, y además de ser el primordial constituyente de la materia lignocelulósica, han revelado ser en su estado puro anaeróbicamente biodegradables²⁴.

2.3 PRETRATAMIENTOS LIGNOCELULÓSICOS

En una biorrefinería basada en materiales lignocelulósicos, que tiene azúcares como intermedios, es necesario descomponer la estructura de la materia prima y luego obtener azúcares de celulosa y hemicelulosa. Por esta razón, necesitamos un sistema de tratamiento previo antes del paso de conversión²⁵.

Las tecnologías de pretratamiento tienen como objetivo aumentar la accesibilidad de las enzimas a la biomasa y los rendimientos de azúcares fermentables. Por lo tanto, se requiere alguna modificación estructural del material lignocelulósico (pretratamiento) y para seleccionar una tecnología de pretratamiento adecuada, el reconocimiento de los principales factores limitantes estructurales es un paso crítico. Estos factores incluyen (1) área de superficie específica, (2) índice de cristalinidad de celulosa, (3) grado de polimerización.

En general, los métodos de pretratamiento se dividen en cuatro categorías diferentes: física, química, físico-química y biológica²⁶.

En el siguiente esquema se presentan los tipos de pretratamientos utilizados en biomasa lignocelulósica.



Figura 1. Clasificación de pre-tratamientos para biomasa lignocelulósica.

Fuente: ²⁷.

2.3.1 PRETRATAMIENTO FÍSICO

La reducción de la cristalinidad, el tamaño de las partículas y el grado de polimerización son el principal motivo para tratar la biomasa utilizando métodos mecánicos. La hidrólisis enzimática se puede facilitar al alterar la estructura de la biomasa mediante la aplicación de estrés mecánico sin la adición de reactivos químicos o biológicos para aumentar el área de superficie de la celulosa²⁸.

El tratamiento previo físico aumentará el área de superficie accesible y el tamaño de los poros, y disminuirá la cristalinidad y los grados de polimerización de la celulosa. Los tratamientos físicos comúnmente utilizados para degradar los residuos lignocelulósicos incluyen: vaporización, molienda y fresado, irradiación, temperatura y presión. Una desventaja de este proceso es su alto consumo de energía ²⁹.

2.3.2 PRETRATAMIENTO QUÍMICO

Los productos químicos que van desde agentes oxidantes, álcali, ácidos y sales pueden usarse para eliminar y/o alterar la lignina, hemicelulosa y celulosa desentrañando así la red de hemicelulosa de la lignina. Para ello es necesaria la hinchazón de los poros para aumentar el área de la superficie interna y disminuir el grado de polimerización y cristalinidad³⁰.

El tratamiento previo con ácido diluido (ácido sulfúrico, ácido oxálico y maleico) o álcali suave (hidróxido de sodio, hidróxido de potasio e hidróxido de amonio) es el método más convencional a escala industrial para tratar la biomasa lignocelulósica³¹. Los ácidos orgánicos como el ácido oxálico, el ácido acetilsalicílico y el ácido salicílico también se pueden usar como catalizador, mientras que también se utiliza una mezcla de disolventes orgánicos o acuosos con ácidos inorgánicos (HCl o H₂SO₄) para romper los enlaces internos de lignina y hemicelulosa, sin embargo, los ácidos concentrados no son los preferidos porque son corrosivos y deben recuperarse para que el tratamiento previo sea económicamente viable³².

2.3.3 PRETRATAMIENTO FÍSICO-QUÍMICO

Los pretratamientos que combinan los procesos químicos y físicos son importantes para disolver la hemicelulosa y la alteración de la estructura de la lignina, lo que proporciona una mejor accesibilidad de la celulosa para las enzimas hidrolíticas. Esta categoría incluye la gran mayoría de los métodos de pretratamiento como explosión de vapor, agua caliente líquida, fibra de amoníaco / explosión de congelación, oxidación húmeda, percolación de reciclaje de amoníaco, amoníaco acuoso y explosión de CO₂³³.

2.3.4 PRETRATAMIENTO BIOLÓGICO

El pretratamiento biológico se puede realizar mediante la aplicación de microorganismos que son capaces de degradar la lignina, como los hongos que son capaces de producir enzimas que actúan sobre la hemicelulosa y lignina presentes en la biomasa. Se considera que el método es respetuoso con el medio ambiente y que ahorra energía, ya que se realiza a baja temperatura y no requiere el uso de productos químicos³⁴.

Esto ha atraído el interés debido a sus ventajas potenciales sobre los pretratamientos físicos / químicos, como la especificidad de la reacción y el sustrato, los bajos requerimientos de energía, la falta de generación de compuestos tóxicos y el alto rendimiento de los productos deseados³⁵.

Sin embargo, la velocidad de los procesos de pretratamiento biológico es demasiado baja para el uso industrial, y se pierde algo de material, ya que estos microorganismos, en cierta medida, también consumen hemicelulosa y celulosa, o lignina. El método podría usarse como un primer paso seguido por algunos de los otros tipos de métodos de pretratamiento³⁶.

2.4 SACARIFICACIÓN DE RESIDUOS

La producción de diversos productos químicos mediante procesos de bajo costo utilizando residuos orgánicos como materia prima cumple dos propósitos: Reduce el desperdicio y también economiza el proceso de producción de estos químicos. Muchos compuestos como el ácido acético, el almidón, el etanol, el ácido láctico, el ácido fórmico, etc. pueden fabricarse utilizando materias primas para piensos de bajo costo y materiales de desecho³⁷.

Esto es posible ya que muchos de los residuos orgánicos, entre los que destacan los residuos agrícolas están compuestos en su totalidad por material lignocelulósico que puede ser hidrolizado produciendo pequeños azúcares fermentables (por ejemplo, maltosa, amilosa, glucosa, jarabes de maltosa y fructosa) en el proceso de sacarificación, mientras que las celulasas y las xilanasas, incluidas la endoglucanasa, la exoglucanasa, la b-glucosidasa y la b-xylosidasa, también se pueden emplear para mejorar la hidrólisis de cereales para la conversión de almidones en glucosa³⁸. Para ello, según³⁹ son necesarias las siguientes operaciones:

1. Reducción del tamaño de la biomasa para aumentar el área de superficie y la uniformidad;
2. Tratamiento previo para romper las estructuras de lignina y hemicelulosa, lo que reduce la cristalinidad de la celulosa y aumenta la porosidad de la biomasa;
3. Hidrólisis enzimática para convertir los azúcares poliméricos en monoméricos.

2.5 HIDRÓLISIS

La hidrólisis es una reacción química donde ocurre la ruptura de la molécula del agua. Los reactantes así como los productos de esta reacción pueden ser especies neutras (como en el caso de las moléculas orgánicas) y/o iónicas (como en el caso de las sales). La biomasa proporciona una fuente potencial de productos químicos de valor añadido, como azúcares reductores, furfural, etanol y otros productos, mediante catalización con ácido o mediante hidrólisis catalizada por enzimas¹⁹.

2.5.1 HIDRÓLISIS ÁCIDA

Es un proceso químico que mediante el uso de catalizadores ácidos, como: H_2SO_4 , HCl , HNO_3 , entre otros, transforma las cadenas de polisacáridos que forman la biomasa (hemicelulosa y celulosa) en sus monómeros elementales. La hidrólisis ácida concentrada de biomasa está limitada por la corrosión y los costosos problemas de recuperación de ácido⁴⁰.

2.5.2 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

La hidrólisis enzimática es la operación unitaria en el proceso de conversión de lignocelulosa que utiliza enzimas para despolimerizar la biomasa lignocelulósica. Los componentes sacáridos liberados son la materia prima para la fermentación. El contenido de sólidos en la hidrólisis enzimática ofrece potencialmente muchas ventajas sobre las conversiones que se realizan con cargas de bajo o moderado de sólidos, incluyendo el aumento de las concentraciones de azúcar y etanol y la reducción de los costos de capital y operación⁴¹.

2.6 ENZIMAS COMERCIALES

Las enzimas son proteínas que producen las células de los organismos vivos que actúan como catalizadores biológicos de reacciones químicas necesarias para la vida⁴². El empleo de enzimas se considera respectivamente como la estrategia más viable que ofrece ventajas sobre las rutas de conversión química de rendimientos más altos, formación mínima de subproductos, bajos requerimientos de energía, condiciones de operación moderadas y procesamiento respetuoso con el medio ambiente⁴³.

En la siguiente tabla se detallan se dan ejemplos de las formas en que las enzimas se han utilizado en procesos comerciales e industriales:

Tabla 2. Ejemplos de aplicaciones industriales de enzimas.

Industria	Aplicación (es)	Enzimas (clase o específicas)
Biorremediación	Degradación de pesticidas tóxicos y contaminantes	hidrolasas, oxidorreductasas
Biotecnología	Manipulación del ADN, proteólisis, etc.	proteasas, polimerasas, ligasas, etc.
Industria química	Síntesis de productos naturales y químicos fríos	varios
Productos de limpieza	Quitamanchas	proteasas, lipasas, amilasas, celulasas
Procesamiento de alimentos y aceites	Ablandamiento, espesamiento, estabilizante, emulsionante	varios
Procesamiento de cuero	Limpieza y desengrase	proteasas y lipasas
Medicina	Tratamientos terapéuticos	esterasas
Industria de la pasta y el papel	Destintado, procesamiento	Amilasas, celulasas, lipasas, xilanasas, etc
Farmacia	Síntesis de productos farmacéuticos y productos intermedios	varios
Fabricación textil	Fregado, acabado	Amilasas, celulasas, proteasas, etc.

Fuente: ⁴⁴

2.6.1 CELULASA

Las celulasas y hemicelulasas se usan típicamente en biocombustibles avanzados para obtener azúcares fermentables hidrolizando materiales lignocelulósicos. Se encargan de reducir la cantidad de agua para aumentar la producción general de etanol. Los nuevos equipos, la tecnología de retratamiento y los cócteles de celulasa se han combinado para convertir por ejemplo fibras de grano de maíz en azúcares fermentables para etanol adicional⁶.

2.7 CÁSCARA DE BANANO

El banano es la segunda fruta más grande producida después de los cítricos, con un 16% en la producción mundial de fruta ⁴⁵, mayormente los residuos de la fruta, en este caso

las cáscaras, se secan, se muelen y se venden a los fabricantes de piensos a un precio bajo, siendo una propuesta altamente no viable. Comprende entre el 30 - 40% del peso total de la fruta y contiene carbohidratos, proteínas y fibra en representativas cantidades, a pesar de ser el residuo de la misma⁴⁶. La textura de la cáscara de banano contiene una rica estructura porosa constituida por biopolímeros en las paredes celulares de las plantas, como celulosas, hemicelulosas, pectinas, ligninas y proteínas⁴⁵. Los componentes de la cáscara de banano se muestran a continuación:

Tabla 3. Composición química de la cáscara de banano.

Componente	Cáscara de plátano (% base seca)
Almidón	38,89
Humedad	89,1
Hemicelulosa	14,8
Celulosa	13,2
Lignina	14
Magnesio	0,16
Calcio	0,29
Cenizas	11,37

Fuente: ⁴⁷.

Al momento de ser desechadas prolifera la contaminación en nuestro medio ambiente, ya que liberan gases cuando se someten a descomposición y biodegradación. Como solución, el mejor uso alternativo de las cáscaras de banano es utilizarlo para la obtención de biocombustibles⁴⁸. La digestión anaerobia de la cáscara de banano también se puede usar para generar energía en condiciones de temperatura mesofílica⁴⁹.

2.7.1 USOS DE LA CÁSCARA DE BANANO

La cáscara de banano es un residuo agrícola que se puede aplicar como un sustrato para la elaboración de etanol debido a sus ricos carbohidratos, proteínas crudas y azúcares reductores. Además, las cáscaras de banano son materia prima potencial para la producción de etanol, ya que estas son materias asequibles y renovables de bajo costo⁵⁰.

Como otros usos de las cáscaras de banano han incorporado la producción de proteínas, etanol, metano, pectinas, extractos y enzimas. Actualmente, en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria en cáscaras de banano se han identificado compuestos antioxidantes de gran valor ⁴⁵. Muchas otras como la aplicación como un sustrato para generar biomasa fúngica; uso en la producción de lacasa; y la utilización como un biosorbente para la eliminación de metales pesados⁵¹.

Las cáscaras de banano son desechos agrícolas fácilmente disponibles que se utilizan poco como medio de crecimiento potencial para la cepa de levadura, a pesar de su rico contenido de carbohidratos y otros nutrientes básicos que pueden ayudar al crecimiento de la levadura⁴⁶.

2.8BIOENERGÍA

Los biocombustibles se refieren a la biomasa vegetal y los productos refinados que se queman para obtener energía (calor y luz). Similar a los combustibles fósiles, los biocombustibles existen en formas sólidas, líquidas y gaseosas⁵².

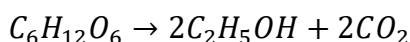
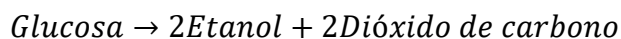
Los biocombustibles sólidos incluyen leña, astillas de madera, pellets de madera y carbón vegetal material utilizado para la generación de electricidad (biopoder) y calefacción. Los biocombustibles líquidos cubren el bioetanol, el biodiesel, el bio-aceite de pirólisis y los combustibles de transporte. Los biocombustibles gaseosos se extienden al biogás y al gas de síntesis. La producción de biogás a partir de desechos orgánicos por digestión anaeróbica ha aumentado rápidamente en Europa y China, con el potencial de desplazar el 25% del consumo actual de gas natural⁵³.

2.8.1 ETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN

Los biocombustibles pueden clasificarse en las categorías de biocombustibles de primera o segunda generación. Los biocombustibles de primera generación generalmente están hechos de carbohidratos, lípidos y aceites o desechos agroindustriales utilizando tecnologías convencionales. Los biocombustibles de segunda generación como el biohidrógeno, biometanol y alcoholes generalmente se derivan de la biomasa lignocelulósica, incluida la biomasa de plantas celulósicas, como los tallos, tallos y madera cubriendo actualmente el 10% de la demanda energética del mundo⁵⁴.

2.9 FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

La fermentación es un proceso biológico el cual se lleva a cabo por una gran diversidad de microorganismos, ya sean en cultivos puros o mixtos que se encargan de convertir los azúcares simples en alcohol y dióxido de carbono en ausencia de oxígeno⁵⁵. La conversión química de la fermentación alcohólica, se puede resumir en:



La fermentación en la producción de alcohol como el etanol es un proceso crítico donde los principales parámetros que afectan las vías de fermentación incluyen, la composición del medio, el pH, la temperatura, la velocidad de agitación, la concentración de azúcar y el tipo de inóculo microbiano⁵⁶.

Se han utilizado varios tipos de cepas de levadura en la fermentación para la producción de etanol, incluidas las levaduras híbridas, recombinantes y de tipo salvaje. Las levaduras pueden fermentar directamente los azúcares simples en etanol, mientras que otros tipos de materias primas deben convertirse en azúcares fermentables antes de que puedan fermentarse a etanol. Los procesos comunes implicados en la producción de etanol son el tratamiento previo, la hidrólisis y la fermentación⁵⁷.

Es bastante difícil esperar que el hidrolizado sea completamente uniforme en términos del monómero de azúcar, sería fracciones de diferentes monómeros y varios otros oligosacáridos con inhibidores probables o sustancias no digeribles. Teóricamente, cada kg de glucosa y xilosa puede producir 0.49 Kg de dióxido de carbono con 0.51 Kg de etanol⁵⁸.

2.10 CINÉTICA DE BIOCONVERSIÓN

Los estudios cinéticos son necesarios para obtener una comprensión básica de cualquier fermentación, y son muy útiles para la producción económica eficiente de metabolitos⁵⁹.

Se requieren modelos confiables de cinética de enzimas para el diseño efectivo de los procesos de bioconversión. Sin embargo, las expresiones cinéticas de la velocidad de reacción catalizada por enzimas son frecuentemente complejas y establecer valores

precisos de parámetros cinéticos normalmente requiere un gran número de experimentos⁶⁰.

Los modelos cinéticos proporcionan información sobre el mecanismo enzimático y la cinética, y también apoyan el diseño del proceso de bioconversión y la evaluación de la viabilidad⁶¹.

2.11 CONSTANTE CINÉTICA

Se denomina constante cinética, a aquella velocidad de reacción que define las moléculas adsorbidas⁶², siendo un parámetro dependiente de la temperatura que se definirá relacionando con cifras experimentales⁶³, además, esta aumenta al aumentar el tamaño de los poros si no hay una interacción específica entre el adsorbato y el adsorbente⁶⁴. Las constantes cinéticas especifican para las celulasas los mecanismos moleculares y las relaciones estructura-función⁶⁵.

CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA

3.1 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.1 MATERIALES

- Probeta de 100mL
- Tubos de ensayo de 10mL
- Vasos de precipitación de 50, 250 y 600 mL
- Embudo de vidrio con soporte
- Cubetas plásticas
- Envases de plástico ámbar 500 mL
- Pipetas de 10 mL y 5 mL
- Micropipetas de 10 μ L y 1000 μ L
- Balones volumétricos de 25mL
- Envases plásticos de 500 mL
- Espátula
- Desecador
- Filtros de jeringa cromatográfica
- Jeringa cromatografía de 5 μ L
- Llave de tres pasos

3.1.2 REACTIVOS

- Hidróxido de sodio al 1 N
- Tartrato doble de Na-K
- Ácido Dinitrosalicílico 3,5
- Etanol grado cromatografico 99%
- Glucosa pura
- Ácido sulfúrico al 72%
- Hipoclorito de sodio concentrado 70%
- Tolueno

3.1.3 EQUIPOS

- Agitador magnético
- Balanza Analítica Uni Bloc®
- pHmetro Bante901®
- Thermo Scientific™ Espectrofotómetros Evolution™ 201/220 UV Vis
- Estufa Memmert UN®
- Incubadora MEMMERT®
- Centrifuga DYNAC®
- Cromatógrafo de gas FULI 9790 II
- Dionex ASE 150 Thermo Scientific™

3.2 UBICACIÓN DE INVESTIGACIÓN

La presente investigación se realizó en los meses de septiembre-noviembre del 2018 en los laboratorios de investigación de la Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud, perteneciente a la Universidad Técnica de Machala.

3.3 OBTENCIÓN DE LA MATERIA PRIMA

Los residuos agroindustriales, en este caso las cáscaras de banana fueron recolectadas en la empresa Diana Food ubicada en La Peaña, de la ciudad de Pasaje. Las cáscaras recogidas no presentaban un grado de descomposición similar, por lo cual se procedió a almacenar en fundas plásticas para luego ser separados en un mismo grado de descomposición.

3.4 ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LA CÁSCARA DE BANANO

3.4.1 PREPARACIÓN DE SUSTRATO

Se recogieron las cáscaras de plátano, se lavaron manualmente con agua corriente para eliminar la suciedad adherida, se secaron a 75 °C en una mufla durante 4 días, se molieron y se cribaron para seleccionar la fracción de partículas con un tamaño de 250 µm, se homogeneizaron en un solo lote y se almacenaron hasta que sea necesario⁶⁶.

3.4.2 PROPORCIÓN DEL RESIDUO LIGNOCELULÓSICO

El sustrato lignocelulósico se preparó al 5 % p/v, en un vaso de precipitación de 250 mL, donde el 95% agregado fue agua desionizada⁶⁷.

3.4.3 ADICIÓN DEL CÓCTEL ENZIMÁTICO

Se controlaron parámetros como el pH en el que la mezcla se ajuste a un aproximado de 4.8 y una temperatura de 40°C. La adición del cóctel enzimático fue empleado en 30 µL por cada gramo de residuo lignocelulósico⁶⁸.

3.4.4 MEDICIÓN DE LOS AZÚCARES REDUCTORES

Se pesaron 0,5 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico, 15 g de tartrato de Na-K y 0,8 g de NaOH calentados en agua desionizada y aforados en un balón de 50 mL. Para medir la acción de la enzima con este método se tomó 0,5 mL de muestra mezclados con 0,5 mL de DNS y completados hasta 10 mL para leer en el equipo de espectrofotometría de uv-visible con una longitud de onda de 540nm⁶⁹.

3.4.5 PROCESO DE FERMENTACIÓN DE LAS CÁSCARAS DE BANANO

La fermentación de la biomasa previamente hidrolizada fue llevada a un equipo de autoclave a 121°C por 15 minutos para inactivar a la enzima y eliminar ciertos microorganismos. La muestra luego fue filtrada y se añadió 1 mL de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) /1000 mL de hidrolizado. La levadura utilizada en el proceso de fermentación fue previamente activada con una mezcla de agua destilada y 10% de sacarosa a 35°C⁷⁰.

La fermentación se llevó a cabo durante 4 días (96 h) a 35°C donde se tomaron muestras de °Brix, °Gay-Lussac y contenido de etanol. El experimento se realizó en un frasco ámbar (biorreactor) en condiciones anaerobias, con una trampa de agua para la expulsión del CO₂ (Figura 1).

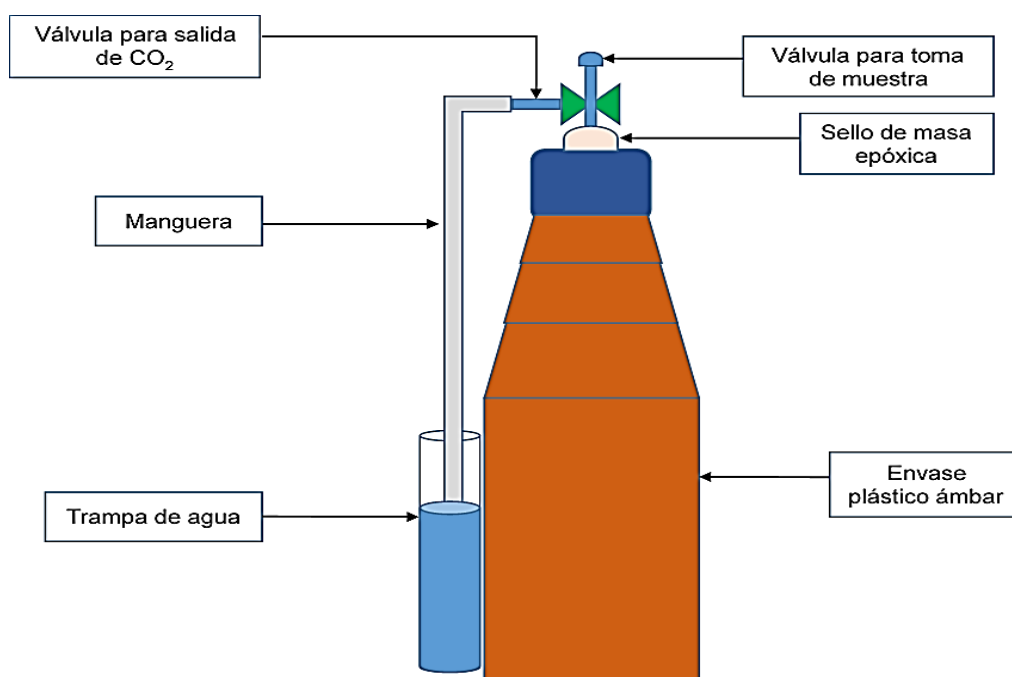


Figura 2. Reactor de fermentación

3.4.6 DETERMINACIÓN DE ETANOL

El contenido de etanol se cuantificó en un cromatógrafo de gases FULI 9790 II equipado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna capilar KROMAT KB FFAP (30m x 0.030mm x 100 μ m).

La muestra de 1 μ L fue inyectada por una jeringa HAMILTON Microliter™ Syringes cada 24h. La temperatura del horno se controló con un programa de elevación de la temperatura durante el análisis, que se fijó a 62 °C durante 2,5 minutos, luego se aumentó a una velocidad de 25 ° C / minuto a 120 °C y se mantuvo a esta temperatura durante 4 minutos. Columna de gas 0,11 MPa, Columna del líquido 0,1 MPa, Carrier 0,3 MPa, Detector de gas 0,1 MPa, Detector de líquido 0,1 MPa y Aire 0,045 MPa. La curva estándar de etanol se determinó para concentraciones entre 0.5 y 3% (v / v)⁷¹.

3.5 CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPONENTES LIGNOCELULÓSICOS DE LA CÁSCARA DE BANANO

3.5.1 DETERMINACIÓN DE LIGNINA

Se extrajeron 5 g de material lignocelulósico provenientes del tratamiento de secado utilizando etanol al 99% durante 30 minutos en un equipo de Soxhlet DIONEX ASE 150. El material extraído se seca en una estufa a 105°C. Se utilizó H₂SO₄ al 72% para hidrolizar la muestra libre de extracción en una proporción de 15 mL / g en agitación vigorosa por 2 horas. Esta solución se diluyó luego a 4% en peso de H₂SO₄ agregando agua destilada para lo cual se calentó durante 4 h. La muestra posteriormente se filtró y se secó en estufa a 105°C para determinar mediante peso constante⁷².

3.5.2 DETERMINACIÓN DE HOLOCELULOSA

Se pesaron 2 gr de material lignocelulósico, colocando y agregando 145 mL de agua destilada en un matraz junto con 1 g de clorito de sodio diluido en una pequeña cantidad de agua y 0.2 mL de ácido acético, el material se lleva a baño maría entre 70 y 85°C por 1 hora sellando el matraz; se vuelven a añadir 0,2 mL de ácido acético, 1 g de clorito de sodio y se sella, el procedimiento se repite hasta que la muestra se torne color blanco; posterior al blanqueo se coloca en agua helada el matraz hasta alcanzar 10°C y se filtra el contenido del envase; se procede a realizar un lavado con agua destilada; el material filtrado se lleva a un crisol y se deja secar a una temperatura de 105°C; por último se pesa y almacena la muestra final para utilizarla en el procedimiento de celulosa⁷³.

3.5.3 DETERMINACIÓN DE CELULOSA

Para determinar celulosa se realiza previamente la caracterización de holocelulosa del material lignocelulósico para lo cual se toma 1 g de muestra para depositarlo en un matraz con 100 mL de agua destilada, se elabora una solución de Hidróxido de Sodio al 17,5%, añadiendo 10 mL de esta solución a la muestra, se agita mediante un agitador magnético y se deja en reposo por 5 minutos; se añaden 5 mL de NaOH al 17,5%, se agita y vuelve a reposo por 30 minutos; se agregan 30 mL de agua destilada y posteriormente se deja en reposo por 1 hora; la muestra es llevada luego a un filtrado al vacío, luego que toda la muestra se haya filtrado se realiza un lavado con una mezcla de 30 mL de agua destilada y 25 mL de Hidróxido de Sodio al 17,5%; se repite el lavado esta vez solo con 30 mL de agua destilada; una vez filtrado se añaden 5 mL de ácido

acético al 10%, sin filtrar al vacío el cual se deja en reposo por 3 minutos, aplicando filtrado al vacío. Se lava por última vez con 50 mL de agua destilada; para finalizar se retira la muestra filtrada, colocándola en una luna de vidrio y llevando a una estufa a 65°C; esto se lleva a un desecador y se pesa en una balanza analítica⁷⁴.

3.5.4 DETERMINACIÓN DE HEMICELULOSA

Para obtener hemicelulosa se procede a realizar la diferencia entre los resultados obtenidos entre holocelulosa y celulosa.

3.6 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó cáscara de banano previamente seca y molida al 5% p/p con un pH de 4,8 y temperatura constante de 40°C. En el diseño se varió la cantidad de inóculo añadido por cada gramo hidrolizado, esto es una relación de 30µL de enzima/g de cáscara (D1); 60µL de enzima/g de cáscara (D2) y 90µL de enzima/g de cáscara (D3).

Tabla 4. Diseño del experimento

Experimento	Temperatura (°C)	Sustrato (%)	Cant. de enzima
D1	40	5	1D1:1D1
D2	40	5	2D2:1D1
D3	40	5	3D3:1D1

VARIABLES

VARIABLES DEPENDIENTES

- Cantidad de azúcares reductores en la cáscara de banano.

VARIABLES INDEPENDIENTES

- Tiempo de fermentación.
- Concentración de inóculo (enzima).

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERIZACIÓN DE LA CÁSCARA DE BANANO MADURO

Se determinó que las cáscaras de banana maduro en el pretratamiento de secado presentan un contenido porcentual (p/p) de celulosa de $19.33\pm 0,28\%$, hemicelulosa $11.43\pm 0,39\%$ y lignina de $21.12\pm 0,24\%$. Este resultado se asemeja a los autores⁷⁵ cuya investigación se basa en pretratamientos de secado de la cáscara de banana a 60°C en 24h con una composición lignocelulósica del 12,1 % de celulosa, 10,2 % de hemicelulosa y 2,9 % de lignina. Lo que se puede determinar es que un pretratamiento de secado maximiza los componentes lignocelulósicos de acuerdo a la investigación de⁷⁶, quienes emplearon cáscara de banana en base húmeda con $9\pm 1\%$ de celulosa, $5,1\pm 0,5\%$ de hemicelulosa y $5\pm 0,5\%$ de lignina.

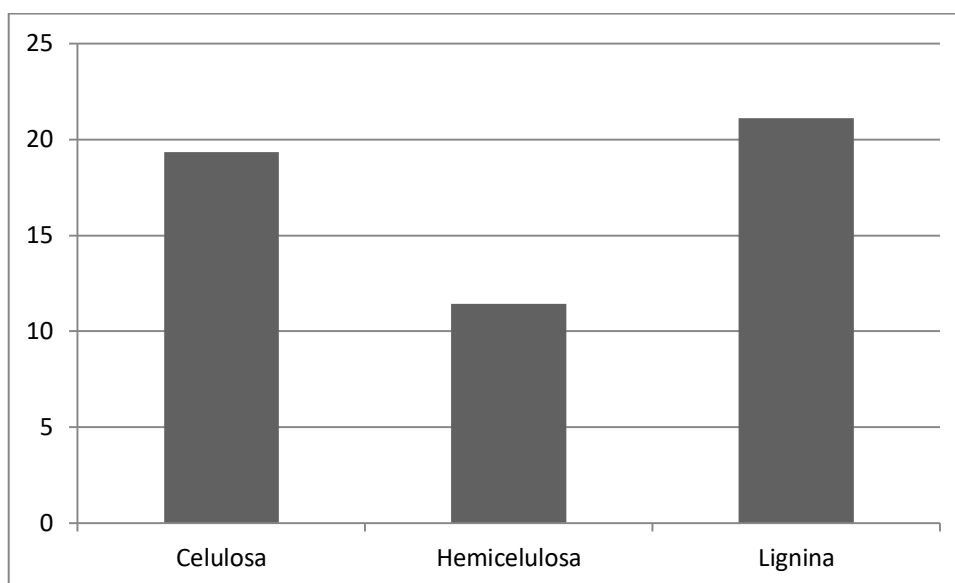


Figura 3. Caracterización de los componentes lignocelulósicos presentes en la cáscara de banana maduro seca.

4.2 CONCENTRACIÓN DEL INÓCULO RESPECTO AL SUSTRATO LIGNOCELULÓSICO

Los resultados de glucosa en función de la cantidad enzima celulasa agregada se muestran en la Figura 4, donde se puede observar que con el tratamiento D1 ($30\mu\text{L}$ de

enzima celulasa/ g de biomasa) a las 4 horas se obtuvo el mejor resultado con 4750 ppm de glucosa en comparación con los tratamientos D2 y D3.

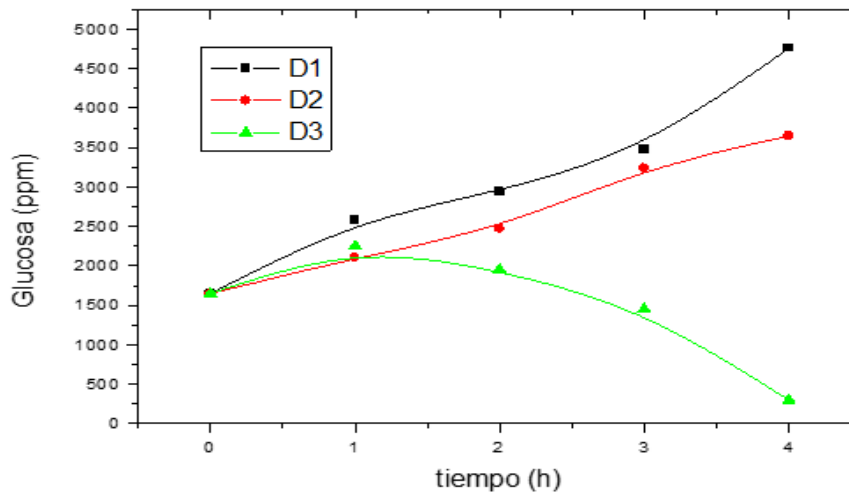


Figura 4. Glucosa obtenida a partir de la variación de la concentración de celulasa durante la hidrólisis enzimática.

4.3 PROCESO DE SACARIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES LIGNOCELULÓSICOS DE LA CÁSCARA DE BANANO

En la Figura 5 se puede observar que los azúcares reductores iniciales presentes en la cáscara tienen una concentración de $5,7 \pm 0,25$ g/L, lo que, en el transcurso de la hidrólisis enzimática aumenta a $11,05 \pm 0,44$ g/L luego de 24h de proceso con enzima comercial celulasa. La presente investigación concuerda con los datos obtenidos por⁶⁶, el cual obtuvo como concentración final de 14,85 g/L de azúcares reductores utilizando como materia prima la cáscara de banano en polvo en un tamaño de partícula de 45-697 μ m con un pretratamiento con H₂SO₄ y empleando un conjunto de enzimas como: α -amilasa, pectinasa, amiloglucosidasa, celulasa.

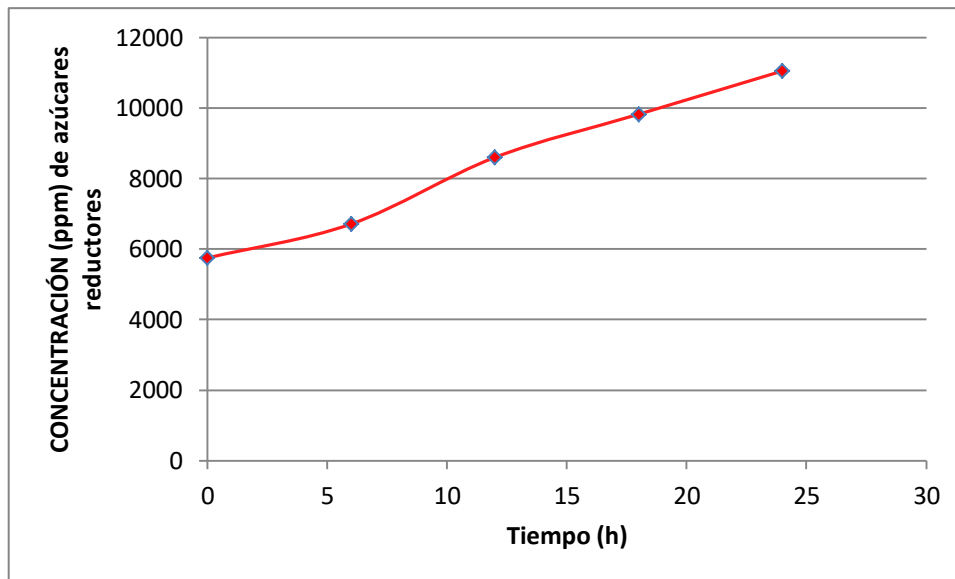


Figura 5. Comportamiento de los azúcares reductores durante la hidrólisis enzimática de la cáscara de banano maduro al 5%.p/v.

4.4 CINÉTICA DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA CÁSCARA DE BANANO MADURO

En el proceso de cinética de hidrólisis enzimática se trató de demostrar la bioconversión de los componentes lignocelulósicos en azúcares, para ello se utilizó el modelo cinético de⁷⁷, las ecuaciones son las siguientes:

$$\ln \frac{c_0}{c} k_{exp} t \quad (1)$$

o

$$\ln \frac{c_0}{c} k_{exp} t \quad (2)$$

A continuación se demuestra el comportamiento de glucosa respecto al tiempo (Figura 6) empleando el modelo cinético antes descrito:

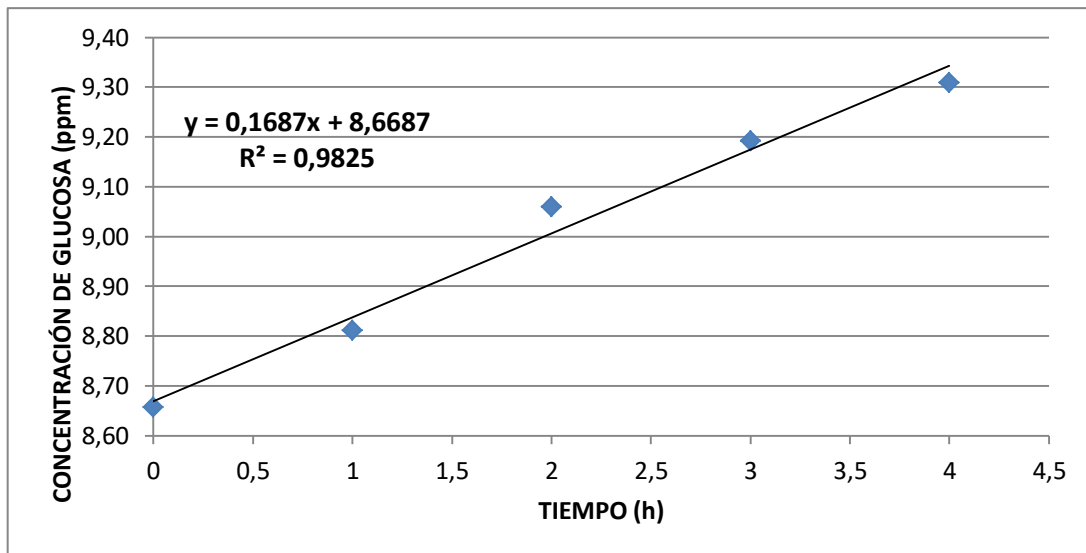


Figura 6. Cinética hidrólisis enzimática del 5% p/v de cáscara de banana maduro en polvo (*) Concentración de glucosa (ppm).

Esta constante cinética $K= 0,169 \text{ g/L}\cdot\text{h}$ obtenida en este estudio para el proceso de sacarificación es comparable con la reportada por⁷⁸, los cuales obtuvieron una $K= 0,846 \text{ g/L}\cdot\text{h}$ a partir de la hidrólisis de celulosa sintética, con tamaño de partícula de $5,54 \mu\text{m}$.

4.5 PROCESO DE FERMENTACIÓN DE LA CÁSCARA DE BANANO PARA LA OBTENCIÓN DE ETANOL

La biomasa lignocelulósica resultante de la hidrólisis enzimática fue fermentada por levadura comercial (*Saccharomyces cerevisiae*) obteniendo un rendimiento de etanol del $7,6\pm 0,17\%$ a los 4 días de fermentación a temperatura constante de 37°C . El resultado se puede comparar a la investigación de⁴⁶, los cuales obtuvieron un rendimiento de etanol del $6,54\%$ a los 7 días utilizando cáscara de banana con una cepa fúngica (*Aspergillus niger*). El proceso de fermentación se muestra continuación:

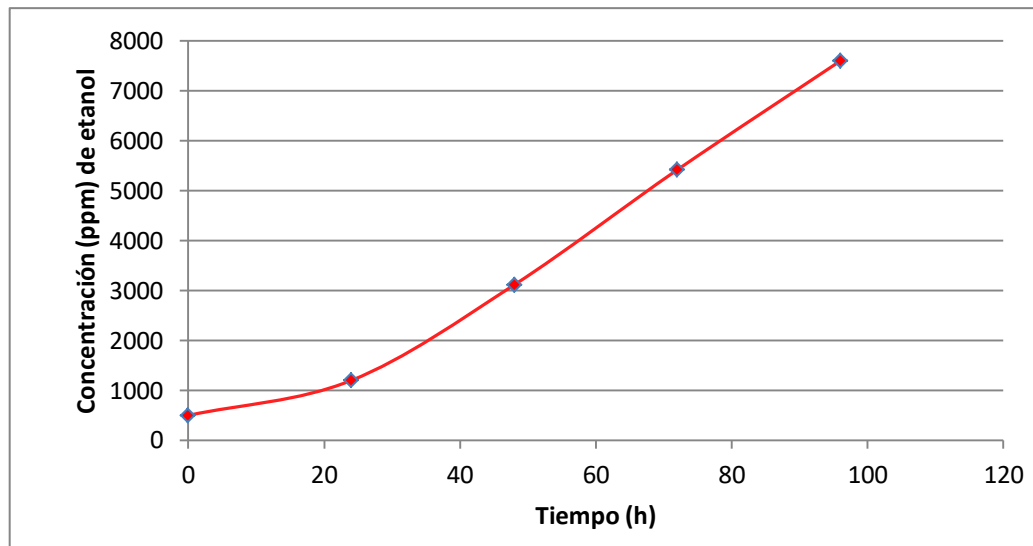


Figura 7. Comportamiento de la concentración de etanol de la cáscara de banana maduro al 5% p/v luego de 4 días de fermentación.

4.6 CINÉTICA DE LA FERMENTACIÓN

La constante cinética obtenida en el proceso de fermentación alcohólica de $K = 0,697$ g/L·h es comparable con la constante cinética de los autores⁷⁹, quienes reportaron una $K = 0,48$ g/L·h empleando hidrólisis enzimática con *Trichoderma reesei* en residuos de papel. Por otro lado, la investigación efectuada por⁸⁰ demuestran alcanzar mejores resultados de bioconversión al pretratar el bagazo de la caña de azúcar con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al obtener una constante cinética de $K = 4,1$ g/L.

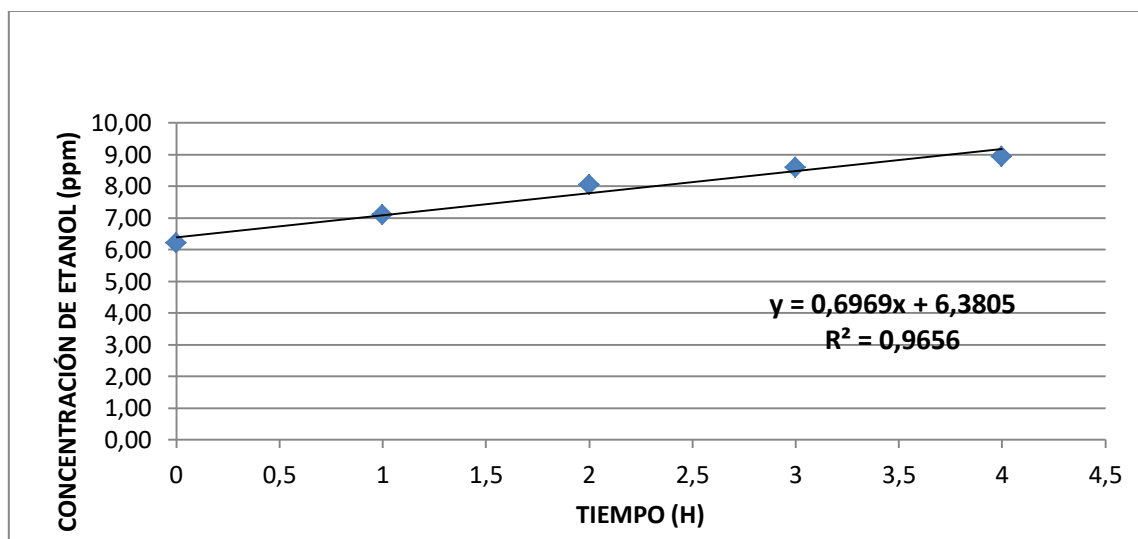


Figura 8. Cinética de fermentación de la cáscara de banana maduro en polvo al 5% (*) Concentración de etanol (ppm).

4.7 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ETANOL OBTENIDO EN LA FERMENTACIÓN DE LA CÁSCARA DE BANANO MADURO

En la Figura 9 se muestra un cromatograma de etanol obtenido al 4to día de fermentación alcohólica, donde se obtuvo la mayor concentración de alcohol. El tiempo de retención fue de 3 minutos con un Área (uV*s) de 993976,9 el cual corresponde a una concentración final de $7,6 \pm 0,17$ g/L.

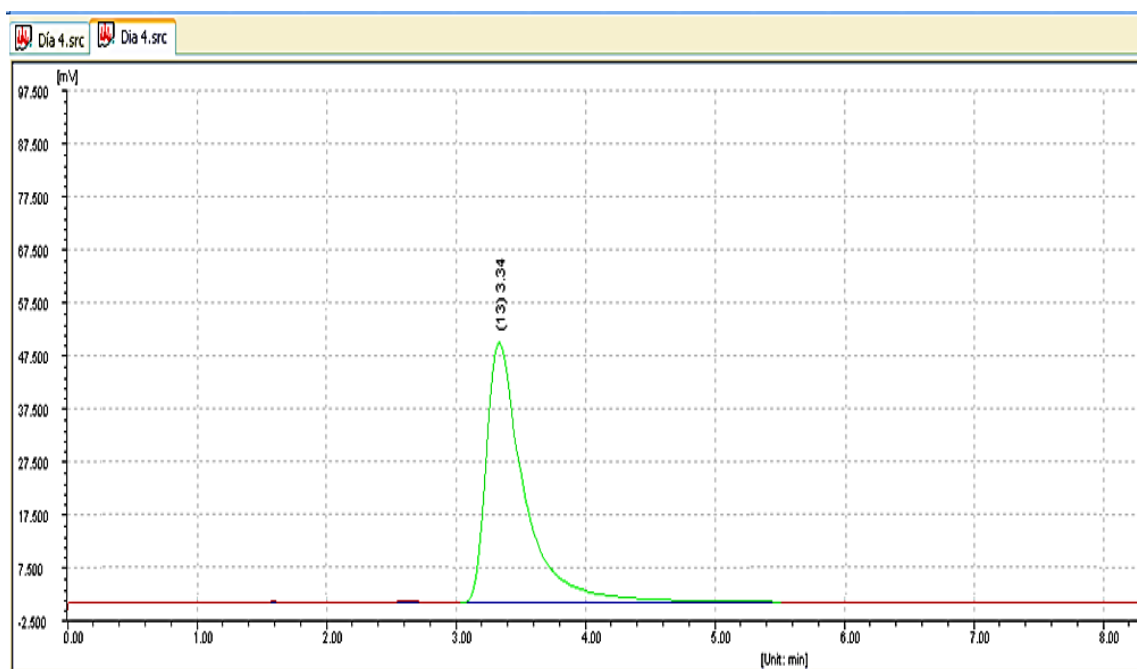


Figura 9. Cromatograma de etanol presente en la fermentación alcohólica de las cáscaras de banana maduro al 5% p/v.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES

Las constantes cinéticas de sacarificación y de fermentación alcohólica fueron de $K=0,169$ g/L·h y $K=0,697$ g/L·h respectivamente, demostrando así que, un tratamiento previo de secado de la cáscara de banano maduro permite al inóculo realizar una mejor bioconversión para la obtención de bioetanol.

Se determinó que las cáscaras de banano maduro con el pretratamiento de secado presentan un contenido porcentual (p/p) de celulosa de $19.33\pm0,28\%$, hemicelulosa $11.43\pm0,39\%$ y lignina de $21.12\pm0,24\%$ lo que permite demostrar que un pretratamiento previo incrementa los componentes lignocelulósicos.

Luego del proceso de hidrólisis enzimática realizado durante 24h se pudo obtener $11,05\pm0,44$ g/L de glucosa, así mismo mediante cromatografía de gases se pudo establecer que el etanol obtenido mediante la bioconversión de glucosa en la fermentación fue de $7,6\pm0,17$ g/L.

CAPÍTULO VI

6. RECOMENDACIONES

- Es importante que las condiciones de temperatura y pH en los que se va a adicionar el inóculo sean estables para no afectar el proceso de bioconversión.
- Utilizar biorreactores herméticamente cerrados para evitar el acceso de microorganismos que puedan afectar con los rendimientos de alcohol.
- Realizar un estudio de comparación económica entre un pretratamiento físico-biológico contra un pretratamiento físico-químico para evaluar los costos de producción.
- Utilizar una mezcla de inóculo previo a un tratamiento físico con menor tamaño de partícula al presentado en esta investigación con la finalidad de reducir el tiempo de bioconversión.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Ellabban, O.; Abu-rub, H.; Blaabjerg, F. Renewable Energy Resources : Current Status , Future Prospects and Their Enabling Technology. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2014**, *39*, 748–764. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.113>.
- (2) García, A.; Cara, C.; Moya, M.; Rapado, J.; Puls, J.; Castro, E.; Martín, C. Dilute Sulphuric Acid Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Jatropha Curcas Fruit Shells for Ethanol Production. *Ind. Crops Prod.* **2014**, *53*, 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.029>.
- (3) Elobeid, A.; Hart, C. Ethanol Expansion in the Food versus Fuel Debate: How Will Developing Countries Fare? *J. Agric. Food Ind. Organ.* **2007**, *5* (2). <https://doi.org/10.2202/1542-0485.1201>.
- (4) Gupta, A.; Verma, J. P. Sustainable Bio-Ethanol Production from Agro-Residues: A Review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2015**, *41*, 550–567. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.08.032>.
- (5) Guerrero, A. B.; Ballesteros, I.; Ballesteros, M. The Potential of Agricultural Banana Waste for Bioethanol Production. *Fuel* **2018**, *213* (October 2017), 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.10.105>.
- (6) Harris, P. V.; Xu, F.; Kreel, N. E.; Kang, C.; Fukuyama, S. New Enzyme Insights Drive Advances in Commercial Ethanol Production. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19* (1), 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.02.015>.
- (7) Demirbas, A. Waste Management, Waste Resource Facilities and Waste Conversion Processes. *Energy Convers. Manag.* **2011**, *52* (2), 1280–1287. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.09.025>.
- (8) Lombardi, L.; Carnevale, E.; Corti, A. A Review of Technologies and Performances of Thermal Treatment Systems for Energy Recovery from Waste. *Waste Manag.* **2015**, *37*, 26–44. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.11.010>.
- (9) Al-sabagh, A. M.; Yehia, F. Z.; Eshaq, G.; Rabie, A. M.; Elmetwally, A. E. Greener Routes for Recycling of Polyethylene Terephthalate. *Egypt. J. Pet.* **2015**, *25* (1), 53–64.

<https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.001>.

- (10) Bagban, M.; Kadam, P.; Ingale, S.; Kad, R. An Insight into Different Waste Types and Waste Segregation Methods. *Int. Res. J. Eng. Technol.* **2016**, 3 (4), 2060–2063.
- (11) Gonçalves, F. A.; Sanjinez-Argandoña, E. J.; Fonseca, G. G. Utilization of Agro-Industrial Residues and Municipal Waste of Plant Origin for Cellulosic Ethanol Production. *J. Environ. Prot. (Irvine, Calif.)*. **2011**, 02 (10), 1303–1309.
<https://doi.org/10.4236/jep.2011.210150>.
- (12) Rincón, S. L.; Gómez, A. Comparative Behaviour of Agricultural Biomass Residues during Thermochemical Processing. *Glob. Nest J.* **2012**, 14 (2), 111–117.
- (13) Anwar, Z.; Gulfraz, M.; Irshad, M. Agro-Industrial Lignocellulosic Biomass a Key to Unlock the Future Bio-Energy: A Brief Review. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* **2014**, 7 (2), 163–173.
<https://doi.org/10.1016/j.jrras.2014.02.003>.
- (14) Tonini, D.; Hamelin, L.; Astrup, T. F. Environmental Implications of the Use of Agro-Industrial Residues for Biorefineries: Application of a Deterministic Model for Indirect Land-Use Changes. *GCB Bioenergy* **2016**, 8 (4), 690–706. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12290>.
- (15) Maniglia, B. C.; Tessaro, L.; Ramos, A. P.; Tapia-Blácido, D. R. Which Plasticizer Is Suitable for Films Based on Babassu Starch Isolated by Different Methods? *Food Hydrocoll.* **2018**, No. October.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.038>.
- (16) Kang, Q.; Appels, L.; Tan, T.; Dewil, R. Bioethanol from Lignocellulosic Biomass: Current Findings Determine Research Priorities. *Sci. World J.* **2014**, 2014 (Ci).
<https://doi.org/10.1155/2014/298153>.
- (17) Berghel, J.; Frodeson, S.; Granström, K.; Renström, R.; Ståhl, M.; Nordgren, D.; Tomani, P. The Effects of Kraft Lignin Additives on Wood Fuel Pellet Quality, Energy Use and Shelf Life. *Fuel Process. Technol.* **2013**, 112, 64–69.
<https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2013.02.011>.
- (18) Collard, F.; Blin, J. A Review on Pyrolysis of Biomass Constituents : Mechanisms and Composition of the Products Obtained from the

Conversion of Cellulose , Hemicelluloses and Lignin. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2014**, 38, 594–608.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.06.013>.

- (19) Kapu, N. S.; Trajano, H. L.; Columbia, B. Review of Hemicellulose Hydrolysis in Softwoods and Bamboo. *Biofuels, Bioprod. Biorefining* **2014**, 8 (6), 857–870. <https://doi.org/10.1002/bbb>.
- (20) Farhat, W.; Venditti, R. A.; Hubbe, M.; Taha, M. A Review of Water-Resistant Hemicellulose-Based Materials : Processing and Applications. **2016**, 1–20. <https://doi.org/10.1002/cssc.201601047>.
- (21) Khalil, H. P. S. A.; Davoudpour, Y.; Islam, N.; Mustapha, A.; Sudesh, K.; Dungani, R.; Jawaid, M. Production and Modification of Nanofibrillated Cellulose Using Various Mechanical Processes : A Review. *Carbohydr. Polym.* **2014**, 99, 649–665.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.069>.
- (22) Jiang, W.; Han, G.; Via, B. K. Rapid Assessment of Coniferous Biomass Lignin – Carbohydrates with Near-Infrared Spectroscopy. *J. Int. Acad. Wood Sci.* **2014**, 109–122. <https://doi.org/10.1007/s00226-013-0590-3>.
- (23) El-zawawy, W. K.; Ibrahim, M. M.; Abdel-fattah, Y. R.; Soliman, N. A.; Mahmoud, M. M. Acid and Enzyme Hydrolysis to Convert Pretreated Lignocellulosic Materials into Glucose for Ethanol Production. *Carbohydr. Polym.* **2011**, 84 (3), 865–871.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.12.022>.
- (24) Taylor, P.; Monlau, F.; Barakat, A.; Trably, E.; Dumas, C.; Steyer, J.; Carrère, H. Critical Reviews in Environmental Science and Technology Lignocellulosic Materials Into Biohydrogen and Biomethane : Impact of Structural Features and Pretreatment and Biomethane : Impact of Structural Features. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, No. April 2013, 37–41.
<https://doi.org/10.1080/10643389.2011.604258>.
- (25) Conde-mejía, C.; Jiménez-gutiérrez, A.; El-halwagi, M. A Comparison of Pretreatment Methods for Bioethanol Production from Lignocellulosic Materials. *Process Saf. Environ. Prot.* **2011**, 90 (3), 189–202. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2011.08.004>.
- (26) Haghghi, S.; Hossein, A.; Tabatabaei, M. Lignocellulosic Biomass to Bioethanol , a Comprehensive Review with a Focus on Pretreatment.

Renew. Sustain. Energy Rev. **2013**, *27*, 77–93.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.033>.

- (27) Ravindran, R.; Jaiswal, A. K. Bioresource Technology A Comprehensive Review on Pre-Treatment Strategy for Lignocellulosic Food Industry Waste : Challenges and Opportunities. *Bioresour. Technol.* **2016**, *199*, 92–102.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.106>.
- (28) Akhtar, N.; Gupta, K.; Goyal, D.; Goyal, A. Recent Advances in Pretreatment Technologies for Efficient Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass. *Environ. Prog. Sustain. Energy* **2015**, *35* (2), 489–511. <https://doi.org/10.1002/ep>.
- (29) Binod, P.; Sindhu, R.; Singhanian, R. R.; Vikram, S.; Devi, L.; Nagalakshmi, S.; Kurien, N.; Sukumaran, R. K.; Pandey, A. Bioethanol Production from Rice Straw: An Overview. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101* (13), 4767–4774.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.079>.
- (30) Behera, S.; Arora, R.; Nandhagopal, N.; Kumar, S. Importance of Chemical Pretreatment for Bioconversion of Lignocellulosic Biomass. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2014**, *36*, 91–106.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.047>.
- (31) Rastogi, M.; Shrivastava, S. Recent Advances in Second Generation Bioethanol Production : An Insight to Pretreatment , Saccharification and Fermentation Processes. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2017**, *80* (January), 330–340. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.225>.
- (32) Song, Y.; Wi, S. G.; Kim, H. M.; Bae, H. Cellulosic Bioethanol Production from Jerusalem Artichoke (*Helianthus Tuberosus* L.) Using Hydrogen Peroxide-Acetic Acid (HPAC) Pretreatment. *Bioresour. Technol.* **2016**, *214*, 30–36.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.065>.
- (33) Singh, A.; Bajar, S.; Bishnoi, N. R. Physico-Chemical Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Cotton Stalk for Ethanol Production by *Saccharomyces Cerevisiae*. *Bioresour. Technol.* **2017**.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.123>.
- (34) Sindhu, R.; Binod, P.; Pandey, A. Biological Pretreatment of Lignocellulosic Biomass – An Overview. *Bioresour. Technol.* **2015**, *199*, 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.030>.

- (35) Rajendran, K.; Drielak, E.; Varma, V. S.; Muthusamy, S.; Kumar, G. Updates on the Pretreatment of Lignocellulosic Feedstocks for Bioenergy Production – a Review. *Biomass Convers. Biorefinery* **2017**, 8 (2), 471–483. <https://doi.org/10.1007/s13399-017-0269-3>.
- (36) Kiran, E. U.; Trzcinski, A. P.; Liu, Y. Enhancing the Hydrolysis and Methane Production Potential of Mixed Food Wastes by an Effective Enzymatic Pretreatment. *Bioresour. Technol.* **2015**, 183, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.033>.
- (37) Kulkarni, S. J.; Shinde, N. L.; Goswami, A. K. A Review on Ethanol Production from Agricultural Waste Raw Material. *Int. J. Sci. Res. Sci. Eng. Technol.* **2015**, 4 (4), 231–233.
- (38) Kiran, E. U.; Trzcinski, A. P.; Ng, W. J.; Liu, Y. Bioconversion of Food Waste to Energy : A Review. *FUEL* **2014**, 135 (June), 389–399. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.05.074>.
- (39) De Farias Silva, C. E.; Gois, G. N. S. B.; Da Silva, L. M. O.; Almeida, R. M. R. G.; Abud, A. K. D. S. Citric Waste Saccharification under Different Chemical Treatments. *Acta Sci. - Technol.* **2015**, 37 (4), 387–395. <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v37i4.28133>.
- (40) Wang, S.; Copeland, L. Effect of Acid Hydrolysis on Starch Structure and Functionality : A Review Effect of Acid Hydrolysis on Starch Structure and Functionality : A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2013**, No. October, 37–41. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.684551>.
- (41) Modenbach, A. A.; Nokes, S. E. Enzymatic Hydrolysis of Biomass at High-Solids Loadings e A Review. *Biomass and Bioenergy* **2013**, 56, 526–544. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.05.031>.
- (42) Salim, R.; Nazir, F.; Yousf, N.; Amin, F.; Rather, A. H.; Reshi, M. Food Processing Applications of Enzymes. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **2017**, 6 (6), 2238–2240.
- (43) Guerfali, M.; Saidi, A.; Gargouri, A. Enhanced Enzymatic Hydrolysis of Waste Paper for Ethanol Production Using Separate Saccharification and Fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2014**, 175 (1), 25–42. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1243-1>.
- (44) Porter, J. L.; Rusli, R. A.; Ollis, D. L. Directed Evolution of Enzymes

for Industrial Biocatalysis. *ChemBioChem* **2016**, 2601, 197–203.
<https://doi.org/10.1002/cbic.201500280>.

- (45) Albarelli, J. Q.; Rabelo, R. B.; Santos, D. T.; Beppu, M. M.; Meireles, M. A. A. Effects of Supercritical Carbon Dioxide on Waste Banana Peels for Heavy Metal Removal. *J. Supercrit. Fluids* **2011**, 58 (3), 343–351. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2011.07.014>.
- (46) Singh, A. K.; Rath, S.; Kumar, Y.; Masih, H.; Peter, J. K.; Benjamin, J. C.; Singh, P. K.; Dipuraj; Singh, P. Bio-Ethanol Production from Banana Peel by Simultaneous Saccharification and Fermentation Process Using Cocultures *Aspergillus Niger* and *Saccharomyces Cerevisiae*. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **2014**, 3 (5), 84–96.
- (47) Feumba, D. R. Chemical Composition of Some Selected Fruit Peels. *Eur. J. Food Sci. Technol.* **2018**, 4 (4), 12–21.
- (48) Khan, A. M.; Khaliq, S.; Sadiq, R. Investigation of Waste Banana Peels and Radish Leaves for Their Biofuels Potential. *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* **2015**, 29 (2), 239–245.
<https://doi.org/10.4314/bcse.v29i2.7>.
- (49) Pisutpaisal, N.; Boonyawanich, S.; Saowaluck, H. Feasibility of Biomethane Production from Banana Peel. *Energy Procedia* **2014**, 50, 782–788. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2014.06.096>.
- (50) Bhatia, L.; Paliwal, S. Banana Peel Waste as Substrate for Ethanol Production. *Int. J Biotechnol Bioeng Res.* **2010**, 1 (June).
- (51) Ibrahim, H. M. M. Green Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Using Banana Peel Extract and Their Antimicrobial Activity against Representative Microorganisms. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* **2015**, 8 (3), 265–275. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2015.01.007>.
- (52) Guo, M.; Song, W.; Buhain, J. Bioenergy and Biofuels : History , Status , and Perspective. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2015**, 42, 712–725. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.10.013>.
- (53) Popp, J.; Lakner, Z.; Harangi-rákos, M.; Fári, M. The Effect of Bioenergy Expansion : Food , Energy , and Environment. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2014**, 32, 559–578.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.01.056>.
- (54) Ingale, S.; Joshi, S. J.; Gupte, A. Production of Bioethanol Using Agricultural Waste: Banana Pseudo Stem. *Brazilian J. Microbiol.*

2014, 45 (3), 885–892. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000300018>.

- (55) Simal-gándara, J. A Review on the Fermentation of Foods and the Residues of Pesticides — Biotransformation of Pesticides and Effects on Fermentation and Food Quality. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2013**, No. September 2013, 37–41. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.677872>.
- (56) Moscoviz, R.; Toledo-Alarcón, J.; Trably, E.; Bernet, N. Electro-Fermentation : How To Drive Fermentation Using Electrochemical Systems. *Trends Biotechnol.* **2016**, 34 (11), 856–865. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.04.009>.
- (57) Hajar, S.; Azhar, M.; Abdulla, R.; Jambo, A.; Marbawi, H.; Azlan, J.; Azifa, A.; Faik, M.; Francis, K. Yeasts in Sustainable Bioethanol Production: A Review. *Biochem. Biophys. Reports* **2017**, 10, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.03.003>.
- (58) Aditiya, H. B.; Mahlia, T. M. I.; Chong, W. T.; Nur, H.; Sebayang, A. H. Second Generation Bioethanol Production : A Critical Review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2016**, 66, 631–653. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.015>.
- (59) Sasikumar, E.; . Thangavelu, V. Kinetic and Optimization Studies on the Bioconversion of Lignocellulosic Material into Ethanol. *Bioresources* **2010**, 5, 1879–1894.
- (60) Chen, B. H.; Micheletti, M.; Baganz, F.; Woodley, J. M.; Lye, G. J. An Efficient Approach to Bioconversion Kinetic Model Generation Based on Automated Microscale Experimentation Integrated with Model Driven Experimental Design. *Chem. Eng. Sci.* **2009**, 64 (2), 403–409. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2008.09.030>.
- (61) Rios-solis, L.; Mothia, B.; Yi, S.; Zhou, Y.; Micheletti, M.; Lye, G. J. Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic High Throughput Screening of Monoamine Oxidase (MAO-N-D5) Substrate Selectivity and Rapid Kinetic Model Generation. **2015**, 120, 100–110. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.07.001>.
- (62) Wunder, S.; Polzer, F.; Lu, Y.; Mei, Y.; Ballauff, M. Kinetic Analysis of Catalytic Reduction of 4-Nitrophenol by Metallic Nanoparticles Immobilized in Spherical Polyelectrolyte Brushes. *J. Phys. Chem. C* **2010**, 114 (19), 8814–8820. <https://doi.org/10.1021/jp101125j>.

- (63) Speranza, V.; De Meo, A.; Pantani, R. Thermal and Hydrolytic Degradation Kinetics of PLA in the Molten State. *Polym. Degrad. Stab.* **2014**, *100* (1), 37–41.
<https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2013.12.031>.
- (64) Haque, E.; Lee, J. E.; Jang, I. T.; Hwang, Y. K.; Chang, J. S.; Jegal, J.; Jung, S. H. Adsorptive Removal of Methyl Orange from Aqueous Solution with Metal-Organic Frameworks, Porous Chromium-Benzenedicarboxylates. *J. Hazard. Mater.* **2010**, *181* (1–3), 535–542.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.05.047>.
- (65) Cruys-Bagger, N.; Elmerdahl, J.; Praestgaard, E.; Tatsumi, H.; Spodsberg, N.; Borch, K.; Westh, P. Pre-Steady-State Kinetics for Hydrolysis of Insoluble Cellulose by Cellobiohydrolase Cel7A. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (22), 18451–18458.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.334946>.
- (66) Chantawongsa, N. Pretreatment methods for Banana Peel as a Substrate for the Bioproduction of Ethanol in SHF and SSF. *Int. J. Comput. Internet Manag.* **2013**, *21* (2), 15–19.
- (67) Tibolla, H.; Maria, F.; Cecilia, F. LWT - Food Science and Technology Cellulose Nano Fibers Produced from Banana Peel by Chemical and Enzymatic Treatment. *LWT - Food Sci. Technol.* **2014**, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.011>.
- (68) Yang, A. J.; Kim, J. E.; Kim, H. E. Enhanced Enzymatic Hydrolysis of Hydrothermally Pretreated Empty Fruit Bunches at High Solids Loadings by the Synergism of Hemicellulase and Polyethylene Glycol. *Process Biochem.* **2017**.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.04.019>.
- (69) Bello, Daniel; Carrera, Emilia; Díaz, Y. Determinación de Azúcares Reductores Totales En Jugos Mezclados de Caña de Azúcar Utilizando El Método Del Ácido 3,5 Dinitrosalicílico. *Redalyc* **2006**, *XL* (0138-6204), 45–50.
- (70) Arumugam, R.; Manikandan, M. Fermentation of Pretreated Hydrolyzates of Banana and Mango Fruit Wastes for Ethanol Production. *Asian J. Exp. Biol. Sci.* **2011**, *2* (2), 246–256.
- (71) Belisario, Y.; Taboada, A.; Marín, F.; Iguaz, A. Dealcoholized Wines by Spinning Cone Column Distillation : Phenolic Compounds and Antioxidant Activity Measured by the 1, 1-Diphenyl-2-

- Picrylhydrazyl Method. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57* (15), 6770–6778. <https://doi.org/10.1021/jf900387g>.
- (72) Jiang, G.; Nowakowski, D. J.; Bridgwater, A. V. A Systematic Study of the Kinetics of Lignin Pyrolysis. *Thermochim. Acta* **2010**, *498*, 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2009.10.003>.
- (73) Ona, T.; Sonoda, T.; Shibata, M.; Fukazawa, K. Small-Scale Method to Determine the Content of Wood Components from Multiple Eucalypt Samples. *Tappi J.* **2015**, No. March 1995.
- (74) Carrier, M.; Loppinet-serani, A.; Denux, D.; Lasnier, J. Thermogravimetric Analysis as a New Method to Determine the Lignocellulosic Composition of Biomass. *Biomass and Bioenergy* **2010**, *5*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.08.067>.
- (75) Pelissari, F. M.; Jose, P.; Menegalli, F. C. Isolation and Characterization of Cellulose Nanofibers from Banana Peels. *Cellulose* **2014**, *21* (1), 417–432. <https://doi.org/10.1007/s10570-013-0138-6>.
- (76) Alibardi, L.; Cossu, R. Composition Variability of the Organic Fraction of Municipal Solid Waste and Effects on Hydrogen and Methane Production Potentials. *Waste Manag.* **2015**, *36*, 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.11.019>.
- (77) Manikandan, K.; Saravanan, V.; Viruthagiri, T. Kinetics Studies on Ethanol Production from Banana Peel Waste Using Mutant Strain of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Indian J. Biotechnol.* **2008**, *7*, 83–88.
- (78) Yeh, A.; Huang, Y.; Hsin, S. Effect of Particle Size on the Rate of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *79* (1), 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.07.049>.
- (79) Zhang, J.; Shao, X.; Townsend, O. V.; Lynd, L. R. Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation of Paper Sludge to Ethanol by *Saccharomyces Cerevisiae* RWB222 — Part I : Kinetic Modeling and Parameters. *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *104* (5), 920–931. <https://doi.org/10.1002/bit.22464>.
- (80) Ramos, R.; Andrade, D.; Maugeri, F.; Maciel, R.; Carvalho, A. Bioresource Technology Kinetics of Ethanol Production from Sugarcane Bagasse Enzymatic Hydrolysate Concentrated with Molasses under Cell Recycle. *Bioresour. Technol.* **2013**, *130*, 351–

359. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.045>.

ANEXOS



Anexo 1. Secado de la cáscara de banano maduro



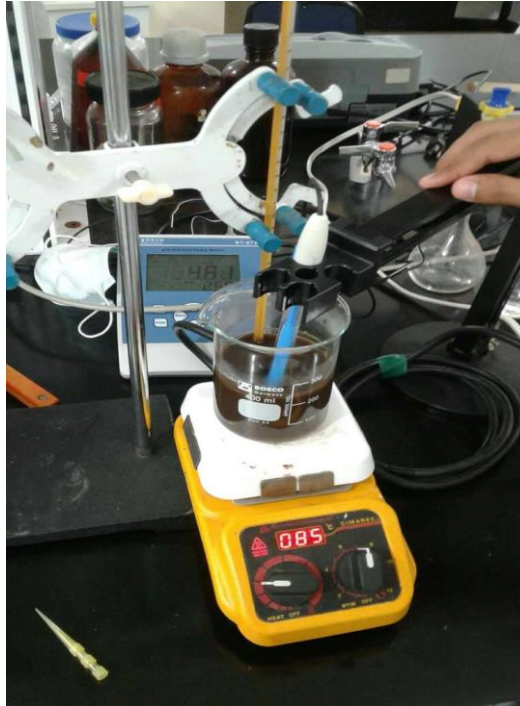
Anexo 2. Cáscara de banano maduro seca



Anexo 3. Molienda de cáscara seca de banano maduro



Anexo 4. Proceso de hidrólisis enzimática



Anexo 5. Condiciones del proceso de hidrólisis enzimática



Anexo 6. Medición de azúcares reductores en el espectrofotómetro UV-Visible



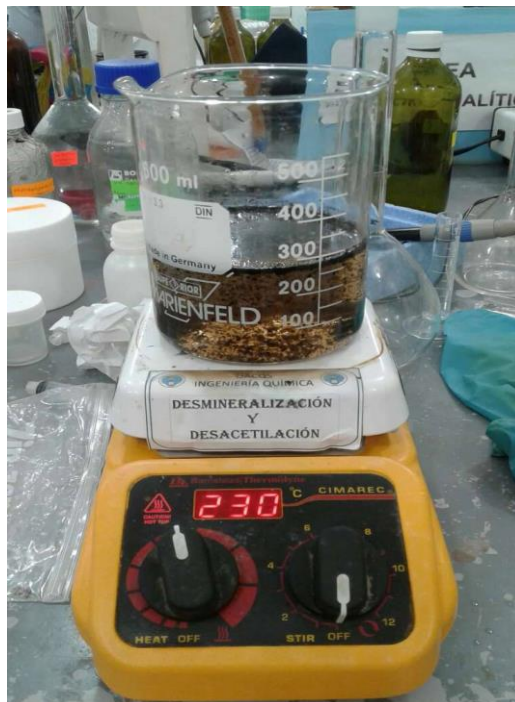
Anexo 7. Biorreactor de fermentación alcohólica



Anexo 8. Determinación de etanol por cromatografía de gases



Anexo 9. Caracterización de lignina



Anexo 10. Caracterización de celulosa



Anexo 11. Caracterización de Holocelulosa