



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA

CINÉTICA DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL RAQUIS DE BANANO  
PARA LA PRODUCCIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES.

MENDOZA GUZMAN GIANCARLO STEVEN  
INGENIERO QUÍMICO

TORRES JUNGAL CARLOS LUIS  
INGENIERO QUÍMICO

MACHALA  
2021



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA

CINÉTICA DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL RAQUIS DE  
BANANO PARA LA PRODUCCIÓN DE AZÚCARES  
FERMENTABLES.

MENDOZA GUZMAN GIANCARLO STEVEN  
INGENIERO QUÍMICO

TORRES JUNGAL CARLOS LUIS  
INGENIERO QUÍMICO

MACHALA  
2021



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA

TRABAJO TITULACIÓN  
TRABAJO EXPERIMENTAL

CINÉTICA DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL RAQUIS DE BANANO PARA LA  
PRODUCCIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES.

MENDOZA GUZMAN GIANCARLO STEVEN  
INGENIERO QUÍMICO

TORRES JUNGAL CARLOS LUIS  
INGENIERO QUÍMICO

AYALA ARMIJOS JOSE HUMBERTO

MACHALA, 29 DE ABRIL DE 2021

MACHALA  
2021

# Tesis- Cinética de Hidrólisis enzimática de raquis para la producción de azúcares fermentables.

## INFORME DE ORIGINALIDAD

8%

INDICE DE SIMILITUD

8%

FUENTES DE INTERNET

1%

PUBLICACIONES

3%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="https://dspace.ucuenca.edu.ec">dspace.ucuenca.edu.ec</a> Fuente de Internet	1%
2	Submitted to Universidad Técnica de Machala Trabajo del estudiante	1%
3	Submitted to Universidad Continental Trabajo del estudiante	1%
4	<a href="http://www.proecuador.gob.ec">www.proecuador.gob.ec</a> Fuente de Internet	1%
5	<a href="https://repositorio.utmachala.edu.ec">repositorio.utmachala.edu.ec</a> Fuente de Internet	1%
6	<a href="http://www.dspace.uce.edu.ec">www.dspace.uce.edu.ec</a> Fuente de Internet	1%
7	<a href="https://d2r89ls1uje5rg.cloudfront.net">d2r89ls1uje5rg.cloudfront.net</a> Fuente de Internet	<1%
8	<a href="https://repositorio.ug.edu.ec">repositorio.ug.edu.ec</a> Fuente de Internet	<1%
9	Submitted to UNIV DE LAS AMERICAS Trabajo del estudiante	

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

Los que suscriben, MENDOZA GUZMAN GIANCARLO STEVEN y TORRES JUNGAL CARLOS LUIS, en calidad de autores del siguiente trabajo escrito titulado CINÉTICA DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL RAQUIS DE BANANO PARA LA PRODUCCIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES., 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.

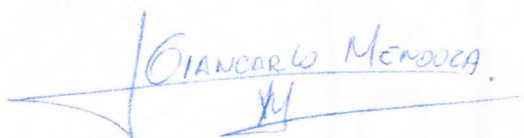
Los autores declaran que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

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, 29 de abril de 2021



MENDOZA GUZMAN GIANCARLO STEVEN  
0704868488



TORRES JUNGAL CARLOS LUIS  
0750216756

## **AGRADECIMIENTO**

Agradecer a nuestras familias por su amor, comprensión, sacrificios, sabiduría que nos ha brindado en todo este tiempo de vida y años de estudios, forjando así nuestro camino para de esta manera cumplir una meta más, gracias por su esfuerzo.

A los tutores Ing. Alim. Humberto Ayala MSc. y Dr. Quim. Hugo Romero PhD, por sus amplios conocimientos, experiencias orientándonos al desarrollo y finalización del trabajo de titulación.

Agradezco a los docentes de la carrera de Ingeniería Química por su tiempo, enseñanzas, mucha paciencia, consejos y sabiduría brindada en cada etapa de la carrera.

A nuestros familiares que aportaron mucho en su apoyo para nuestra formación universitaria, sin duda los mejores.

Agradecemos a nuestros compañeros, amigos, y colegas que nos apoyaron en esta travesía universitaria, los llevaremos en el corazón y quedamos muy agradecidos por su paciencia, cariño y amistad que me brindaron.

**Giancarlo Mendoza y Carlos Torres**

## **DEDICATORIA**

Sin duda este trabajo se lo dedico a toda mi familia, principalmente mi madre, hermanas, hermanos, sobrinas y sobrinos, amigos y amigas que me brindaron su apoyo en todo momento y sus más sinceros deseos, voluntad, fuerzas, cariño y comprensión para poder finalizar la carrera universitaria.

**Giancarlo Steven Mendoza Guzmán**

Como primero dar gracias a Dios por darme este tiempo valioso de ir creciendo profesionalmente y darme vida, este trabajo experimental se lo dedico a mi abuelito que está en el cielo Carlos Millán Malacatus, a mi abuelita Melida Josefina Romero Molina, a mis hermanas Carmen Verónica Torres Jungal y María José Torres Jungal, principalmente a mi mamá Carmen Beatriz Jungal Romero, a mi papá Santos Melciades Torres Zapata por ser mi pilares fundamentales, atribuir de una manera entregada y tener fe en mí.

A mi compañero, amigo y futuro Ingeniero Químico Giancarlo Mendoza, porque con su apoyo incondicional y dedicación no solo a nivel académico sino personal, logramos juntos culminar con la presente tesis. Así mismo, agradezco de manera general a mi linda familia, amigos y compañeros por reforzarme con su apoyo para que el día de hoy salga victorioso y cumplir con una de mis más grandes metas, tener mi título de Ingeniero Químico, gracias a todos por siempre estar ahí.

**Carlos Luis Torres Jungal**

## RESUMEN

La continúa explotación del recurso no renovable (petróleo) como fuentes energéticas siguen amenazando a la sociedad y el ambiente. Por ello las investigaciones globales de obtener bioenergías para minimizar y sustituir los recursos no renovables incrementan notablemente. Las nuevas biotecnologías están en auge para producir estos recursos de alto valor añadido, de gran viabilidad económica y muy sostenible ofreciendo valorar el medio ambiente, igualdad colectiva y una sustitución parcial del petróleo. Estas biotecnologías se logran mediante diversos microorganismos capaces de degradar, transformar o hidrolizar los azúcares (monosacárido – disacáridos – polisacáridos) de biomasa lignocelulósicas donde tenemos cascaras de frutas, vegetales, desechos orgánicos, residuos de los procesos agrícolas como es el raquis de banano, utilizar estos residuos como materia prima para producir azúcares fermentables seguido de una bioconversión para obtener las fuentes energéticas como el bioetanol siendo un recurso renovable que integra un gran aporte al desarrollo sostenible para los países con el fin de aprovechar al máximo la producción energética.

El estudio consistió en determinar la cinética de la hidrólisis enzimática del raquis de banano para producir azúcares fermentables para aplicarlo a una bioconversión a etanol mediante la reutilización de residuos agrícola. En este caso, se trata del raquis del banano, estos azúcares son utilizados para generar productos de alto valor añadido que están experimentando un gran desarrollo, con el fin de reemplazar parcialmente los combustibles convencionales y contribuir a la diversidad de la energía, la protección ambiental y aplicar nuevas tecnologías energéticas.



Se determinó el pH de la hidrólisis para conocer la variación del acondicionamiento de la enzima *Trichoderma reesei* a través del tiempo a temperatura constante de 50 °C, obteniendo los valores dentro de los parámetros del funcionamiento de la enzima pH 4.5 - 5.5. Se realizó una curva de secado en diferente tratamiento de muestra en rodajas y cortados en tamaño de partícula de 2-4 mm determinando una humedad del 93% y el material seco del 7% durante 6 días de tratamiento y se determinó la humedad para validar la curva de las muestras del raquis de banano, el porcentaje fue de humedad es de 93%. Para la producción de azúcares fermentables, a través de la hidrólisis enzimática se aplicó un cantidad de 1000uL de enzima comercial *Trichoderma reesei* obteniendo una relación de 20µL por cada gramo de raquis que transforman las celulasas en glucosas ofreciendo resultados satisfactorios, obteniendo a los 3 días (72h) de hidrólisis un aumento en la producción de azúcares fermentables con respecto a la concentración inicial con valores de A1: 4.0155g/L; A2= 4.8661g/L; A3=6.1207g/L, además se demostró la cinética, de hidrólisis enzimática obtenido una  $K= 0.1261 \text{ g/L}\cdot\text{h}$  afirmando la afinidad de la enzima con el sustrato. Para luego continuar con la bioconversión de glucosa obtenido del hidrolizado a etanol este proceso se realiza mediante una fermentación alcohólica utilizando *Saccharomyces cerevisiae*, se activó 1g de levadura seca (*Saccharomyces cerevisiae*) a temperatura 26 -28 ° C con 50ml de jugo hidrolizado y esterilizado previamente, acondicionado el biorreactor con su trampa de agua para la liberación de CO<sub>2</sub> producida por la fermentación para obtener etanol.

**Palabras claves:** Cinética, azúcares fermentables, hidrólisis enzimática, raquis de banano, *Trichoderma*.

## ABSTRACT

The continued exploitation of the non-renewable resource (petroleum) as a source of energy continues to threaten society and the environment. For this reason, global research on obtaining bioenergy to minimize and replace non-renewable resources is increasing dramatically. New biotechnologies are multiplying to produce these resources with high added value, great economic viability and very sustainable, offering value for the environment, collective equality and partial substitution of oil. These biotechnologies are carried out thanks to various microorganisms capable of degrading, transforming or hydrolyzing the sugars (monosaccharide - disaccharides - polysaccharides) of the lignocellulosic biomass where we have the skins of fruits and vegetables, organic waste, residues of agricultural processes such as the banana rachis, use this waste as a raw material to produce fermentable sugars followed by a bioconversion to obtain energy sources such as bioethanol, being a renewable resource that integrates a great contribution to sustainable development for countries in order to derive the best use of energy production.

The study consisted in determining the kinetics of enzymatic hydrolysis of rachis banana to produce fermentable sugars to apply it to a bioconversion into ethanol by the reuse of agricultural residues. In this case, it is the rachis banana, these sugars are used to generate products with high added value which are experiencing great development, in order to partially replace conventional fuels and to contribute to energy, protection and environmental diversity and to " apply new energy technologies.

The hydrolysis pH was determined to know the variation in conditioning of the enzyme *Trichoderma reesei* over time at a constant temperature of 50 ° C, obtaining the values in

the operating parameters of the enzyme pH 4, 5 - 5.5. A drying curve was carried out in different treatments of the sliced and cut sample in particle size of 2-4 mm, determining a humidity of 93% and the dry material of 7% for 6 days of treatment and the humidity was determined to validate the curve of the banana rachis samples, the moisture percentage was 93%. For the production of fermentable sugars, a quantity of 1000  $\mu\text{L}$  of commercial enzyme *Trichoderma reesei* was applied by enzymatic hydrolysis, obtaining a ratio of 20  $\mu\text{L}$  for each gram of spine which converts cellulases into glucose offering satisfactory results, obtaining after 3 days (72h) of hydrolysis an increase in the production of fermentable sugars compared to the initial concentration with values of A1: 4.0155g / L; A2 = 4.8661 g / L; A3 = 6.1207 g / L, moreover, the enzymatic hydrolysis kinetics have been demonstrated, obtaining a  $K = 0.1261 \text{ g / L} * \text{h}$  confirming the affinity of the enzyme with the substrate. To then continue the bioconversion of the glucose obtained from the hydrolyzed into ethanol, this process is carried out by alcoholic fermentation using *Saccharomyces cerevisiae*, 1g of dry yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) at a temperature of 26-28°C was activated with 50ml of hydrolyzed juice and sterilized beforehand, conditioning the bioreactor with its water trap for the release of  $\text{CO}_2$  produced by fermentation to obtain ethanol.

**Keywords:** Enzymatic Hydrolysis, Kinetics, banana rachis, fermentable sugars, *Trichoderma*.

## ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	I
<b>DEDICATORIA</b> .....	II
<b>RESUMEN</b> .....	III
<b>ABSTRACT</b> .....	V
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	XI
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	XI
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	XII
<b>ÍNDICE DE ANEXOS</b> .....	XIII
<b>CAPÍTULO I</b> .....	1
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1. JUSTIFICACIÓN</b> .....	3
<b>1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	4
<b>1.3. OBJETIVOS</b> .....	5
<b>1.3.1 OBJETIVOS GENERALES</b> .....	5
<b>1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	5
<b>1.4. HIPÓTESIS</b> .....	6
<b>1.4.1. VARIABLE INDEPENDIENTE</b> .....	6
<b>1.4.2. VARIABLE DEPENDIENTE</b> .....	6
<b>CAPÍTULO II</b> .....	7

<b>2. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>7</b>
<b>2.1. RAQUIS DE BANANO.....</b>	<b>7</b>
<b>2.2. DESECHOS AGRÍCOLAS DE BANANO.....</b>	<b>8</b>
<b>2.3. BIOMASA.....</b>	<b>9</b>
<b>2.4. LIGNOCELULOSA.....</b>	<b>10</b>
<b>2.4.1. CELULOSA.....</b>	<b>11</b>
<b>2.4.2. HEMICELULOSA.....</b>	<b>11</b>
<b>2.4.3. LIGNINA.....</b>	<b>12</b>
<b>2.5. TRATAMIENTO FÍSICO.....</b>	<b>12</b>
<b>2.6. TRATAMIENTO DE SECADO.....</b>	<b>13</b>
<b>2.7. ENZIMAS COMERCIALES.....</b>	<b>13</b>
<b>2.7.1. CELULASA.....</b>	<b>13</b>
<b>2.7.1.2. CELULASA TRICHODERMA SPP.....</b>	<b>13</b>
<b>2.8. TRICHODERMA REESEI.....</b>	<b>14</b>
<b>2.9. HIDRÓLISIS BIOMÁSICA.....</b>	<b>14</b>
<b>2.10. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.....</b>	<b>14</b>
<b>2.11. BIOENERGÍAS.....</b>	<b>15</b>
<b>2.12. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.....</b>	<b>15</b>
<b>2.13. BIOETANOL.....</b>	<b>16</b>
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>17</b>
<b>3. METODOLOGÍA.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>17</b>

3.1.1.	LOCALIDAD DE TRABAJO INVESTIGATIVO .....	17
3.1.2.	UNIVERSO DE TRABAJO.....	17
3.2.	MATERIALES Y EQUIPOS.....	17
3.2.1.	MATERIALES .....	17
3.2.2.	REACTIVOS .....	18
3.2.3.	EQUIPO .....	18
3.3.	MÉTODOS .....	19
3.3.1.	DESARROLLO DE ACTIVACIÓN DEL REACTIVO DE 3,5 DINITROSALICÍLICO.....	19
3.3.2.	CURVA DE CALIBRACIÓN - PATRÓN DE GLUCOSA.....	19
3.4.	TÉCNICA .....	20
3.5.	DESARROLLO EXPERIMENTAL .....	20
3.5.1.	TOMAS DE MUESTRAS DE BIOMASA.....	20
3.5.2.	PREPARACIÓN DE MUESTRAS .....	20
3.5.3.	DETERMINACIÓN DE HUMEDAD.....	21
3.5.4.	TRATAMIENTO DE SECADO.....	22
3.5.5.	FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.....	22
	CAPÍTULO IV .....	24
4.	RESULTADOS.....	24
4.1.	Humedad y curva de secado del raquis de banano. ....	24
4.2.	Comportamiento de pH en la producción de azúcares fermentables. ....	25
4.3.	Producción de azúcares fermentables en raquis de banano .....	26

<b>4.4. Cinética de hidrólisis enzimática del raquis de banano .....</b>	<b>27</b>
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>28</b>
<b>6. RECOMENDACIÓN .....</b>	<b>29</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>30</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>36</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Variedades de especies de Banano .....	7
<b>Tabla 2.</b> Variedades de especies de banano. ....	8
<b>Tabla 3.</b> Composiciones diferentes de lignocelulosa. ....	10
<b>Tabla 4.</b> Diseño experimental.....	21

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Tratamiento enzimático combinado con fermentación para obtener etanol. ....	15
--	----



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Curva de calibración de glucosa para muestras de raquis.....	19
<b>Figura 2.</b> Comportamiento del secado de raquis de banano en rodajas de dimensiones de 1cm de longitud. ....	24
<b>Figura 3.</b> Comportamiento del Secado de raquis de banano cortado en pequeñas proporciones de 2mm de longitud. ....	25
<b>Figura 4.</b> Comportamiento de pH durante el tiempo de hidrólisis enzimática a temperatura constante .....	25
<b>Figura 5.</b> Azúcares fermentables de raquis de banano al 5% p/v y su comportamiento mediante la hidrólisis enzimática a través del tiempo.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>Figura 6.</b> Azúcares fermentables de raquis de banano al 5% p/v y comportamiento mediante la hidrólisis enzimática a través del tiempo con inóculo de 1000ppm de <i>Trichoderma reesei</i> . ....	26

## ÍNDICE DE DIAGRAMAS DE FLUJO

<b>Diagrama de flujo 1.</b> Proceso para obtención de raquis de banano seco y triturado....	20
<b>Diagrama de flujo 2.</b> Proceso de Hidrólisis enzimática del raquis de banano.....	20

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Recolección de muestra .....	36
Anexo 2. Preparación de muestra para el secado.....	36
Anexo 3. Secado de raquis de banana. ....	37
Anexo 4. Raquis seco – Trituración de raquis seco.....	37
Anexo 5. Raquis Seco - Reducción de Tamaño – Tamices.....	38
Anexo 6. Enzima comercial.....	38
Anexo 7. Baño termostático- controlador – Biorreactor. ....	39
Anexo 8. Mufla.....	39
Anexo 9. Medición de alcohol mediante un alcoholímetro.....	40
Anexo 10. Tratamiento de muestra a baño María para análisis.....	40
Anexo 11. Espectrofotómetro UV- DR 6000. ....	41
Anexo 12. Balance Analítica. ....	41
Anexo 13. Equipo para determinar pH.....	42
Anexo 14. Registro de actividades experimentales del trabajo de Titulación.....	42
Anexo15. Registro de actividades experimentales del trabajo de titulación.....	43

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUCCIÓN

A través de los años el desarrollo tecnológico e industrial ha provocado un incremento en la explotación de recursos no renovable como son los combustibles, reflejando su agotamiento en los yacimientos y emisiones significativas de gases como el metano ( $\text{CH}_4$ ), ( $\text{CO}_2$ ), ( $\text{N}_2\text{Ox}$ ), ( $\text{O}_3$ ) y los (CFC), ocasionando una gran contaminación ambiental<sup>1</sup>.

En el presente, las nuevas fuentes renovables conocidas como bioenergía, está experimentando un gran desarrollo, con el fin de reemplazar parcialmente los combustibles convencionales y contribuir a la diversidad de la energía, la protección y ambiental y aplicar nuevas tecnologías energéticas.

Ecuador posee gran potencial bananero y agrícola por lo que los residuos orgánicos son muy disponibles y útiles, la cosecha de banano posee una elevada fuente biomásica residual de volúmenes alto, un aproximado 30% de del suministro mundial de banano proviene del país ecuatoriano, por ende es considerado como gran exportador de banano<sup>2</sup>.

El residuo del banano en estimado 100kg, consiste entre 5 kg del pseudotallo, 15 kg hojas, y 2 kg raquis, los mismos que se tiran a las plantaciones como compost, pero sin emplear algún tratamiento previo<sup>3</sup>. Representa el 67% del volumen producción final y son residuos que se convierten en fuentes de contaminación.

Al proporcionar la tecnología adecuada haciendo usos de estos residuos biomásico, las empresas bananeras se benefician al tratar estos desechos luego de ser eliminados de

procesos bananeros, y a su vez se vuelve una alternativa económica y generación de bioenergía útil y también para la producción azúcares fermentables.

La presente investigación permite aprovechar los residuos agrícolas como es el raquis de banano mediante una hidrólisis de acción enzimática, para lograr transformar la biomasa lignocelulósica en producto fermentable para continuar con una bioconversión a bioetanol.

## 1.1. JUSTIFICACIÓN

La energía es un recurso muy utilizado en las actividades que realizan los seres humanos y está creciendo este consumo por la industrialización y el incremento poblacional. El petróleo y sus derivados son los más consumidos y amenazantes, ya que son fuentes no renovables que van degradando el medio ambiente global, como los efectos de gases invernaderos fuertes cambios climáticos, lluvias ácidas entre otros.

Encontrar nuevas tecnologías de recursos renovables aplicando biomasa es una alternativa en auge, dando paso a los biocombustibles o fuentes energéticas renovables, permite a su vez obtener beneficios ambientales y está disponible en gran cantidad, como residuos agrícolas, desechos orgánicos <sup>4,5</sup>.

La continua explotación del recurso no renovable (petróleo) como fuentes energéticas siguen amenazando a la sociedad y el ambiente. Por ello las investigaciones globales de obtener bioenergías para minimizar y sustituir los recursos no renovables incrementa notablemente, con el fin de aprovechar al máximo los residuos orgánicos y derivados para dicha producción energética.

Entre las tecnologías para la producción de fuente energéticas se aprovecha el residuo de raquis de banano como una gran fuente de valor agregado, en varias investigaciones académicas realizadas se puede obtener glucosa del raquis y a su vez contribuimos a reducir los impactos ambientales.

Durante los últimos 10 años se ha desarrollado avances significativos en la biotecnología aplicada a transformación de materiales lignocelulósicos mediante catálisis enzimática, muy imprescindible en la optimización del rendimiento, productividad y eficiencia, en bioenergía y aprovechamiento de estas fuentes renovables.

## **1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La fuente energética principal de más empleada a nivel global es el petróleo, recurso no renovable que se extrae de la naturaleza, pero es limitado, por lo tanto, no permite cumplir con la demanda global, y se refleja la problemática en los países de bajo recursos económicos, lo que genera investigar tecnologías sostenibles que produzcan energías renovables y de bajo costos.

Las nuevas biotecnologías están en auge para producir estos recursos de alto valor añadido, de gran viabilidad económica y muy sostenible ofreciendo valorar el medio ambiente, igualdad colectiva y una sustitución parcial del petróleo. Estas biotecnologías se logran mediante diversos microorganismos capaces de degradar, transformar o hidrolizar los azúcares (monosacárido – disacáridos – polisacáridos) de biomasa lignocelulósicas donde tenemos cascaras de frutas, vegetales, desechos orgánicos, residuos de los procesos agrícolas como es el raquis de banano <sup>6</sup>, utilizar estos residuos como materia prima para producir azúcares fermentables seguido de una bioconversión para obtener las fuentes energéticas (recurso renovable), integrando un gran aporte al desarrollo sostenible para los países.

### **1.3. OBJETIVOS**

#### **1.3.1 OBJETIVOS GENERALES**

Demostrar la cinética de hidrolisis enzimática del raquis de banano mediante ensayos de laboratorio para la producción de azúcares fermentables y su bioconversión para producir bioetanol.

#### **1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinación de humedad y curva de secado del raquis de banano.
- Determinación de pH en la producción de azúcares fermentables.
- Cuantificar la producción de azúcares fermentables en raquis de banano.
- Determinar la cinética de hidrólisis enzimática del raquis de banano.

## **1.4. HIPÓTESIS**

### **HIPÓTESIS NULA**

No se logra determinar la cinética de hidrolisis enzimática en la producción de azúcares fermentables, para consiguiente su bioconversión a etanol mediante la transformación fermentativa de los azúcares.

### **HIPÓTESIS ALTERNATIVA**

Si se logra determinar la cinética de azúcares fermentables a partir de la hidrólisis enzimática para consiguiente su bioconversión a etanol mediante la transformación fermentativa de los azúcares.

#### **1.4.1. VARIABLE INDEPENDIENTE**

- Tiempo de transformación

#### **1.4.2. VARIABLE DEPENDIENTE**

- Concentración de azúcares fermentables
- pH



## CAPÍTULO II

### 2. MARCO TEÓRICO

#### 2.1. RAQUIS DE BANANO

El banano posee un tallo floral llamado raquis o pinzote, obtenido como residuo agrícola a través de la cosecha del banano, los cuales son tirados en las plantaciones como abono, pero generan microorganismos contaminante por no recibir un tratamiento previo <sup>7</sup>. Al raquis lo encontramos en volúmenes elevados por el proceso de cosecha, lo han empleado en diversas propuestas para poder aprovecharlo, con fines de fuente alimenticia para animales, biofertilizantes composta, y productos de valor añadido de fuentes bioenergética e industriales <sup>8</sup>.

**Tabla 1.** Variedades de especies de Banano.

<b>Familia: Musáceae</b>					
<b>Género: Musa</b>					
<b>Sección EUMUSA</b>					
ESPECIES	GRUPO	SUBGRUPO	CLONES	OTROS NOMBRES	
<b>Musa Acuminata</b>	Diploide AA	Sucrier	Baby banano	Lady's Finger	
		Gross Michel	Gross Michel	Orito	
	Triploide  AAA	Cavendish	Gran Naine	Gran Enano	
			Dwarf Cavendish	Cavendish	
			Lacatán	Filipino	
			Valery	Robusta	
			Rojo verde y Rojo	Morado	
			Williams	-	
			Horn Plantain	Barraganete	

**Fuente:** <sup>8,9</sup>.

**Tabla 2.** Variedades de especies de banano.

<b>Familia: Musáceas</b>				
<b>Género: Musa</b>				
<b>Sección EUMUSA</b>				
<b>ESPECIES</b>	<b>GRUPO</b>	<b>SUBGRUPO</b>	<b>CLONES</b>	<b>OTROS NOMBRES</b>
<b>MUSA BALBISIANA</b>	Triploide AAB	Plantain	Maqueño	-
			Limeño	-
			Dominico Harton	-
			French Plantain	Dominico
			Manzano	-
			Horn plantain	Barraganete
	Triploide ABC	Plantain	Cuatrofilo	
			Pelipita	
	Tetraploides AAAC		FHIA 4	
			FHIA 21	

**Fuente:** <sup>8, 9</sup>.

De acuerdo al Ministerio de Comercio Exterior mediante los registros del (MAG), el Ecuador posee un promedio de 162.236 ha de siembra de banano y 4.473 productores. Un aproximado del 42% se encuentran los productores de la zona costera de El Oro, con variedades de cultivo de Musa enana, variedad Cavendish, Orito y filipino y los más grandes son la provincia del Guayas y Los Ríos<sup>10</sup>.

## **2.2. DESECHOS AGRÍCOLAS DE BANANO**

El banano es un fruto muy nutritivo, popular por sus variedades, por sus aromas dulces y texturas, además ricos en minerales con el potasio y calcio<sup>8</sup>. Mediante la producción y extracción del fruto se generan los desechos agrícolas del banano, utilizándolos como abono orgánico, pero no reciben un tratamiento adecuado, provocando que se generen

microorganismos contaminando a los recursos vitales, ocasionando posibles riesgos a la salud <sup>11</sup>.

Dentro de los desechos obtenidos de la cosecha del banano tenemos, pseudo tallo, hojas, raquis(pinzotes) y los sobrantes de la fruta, se los emplean como fertilizante orgánico para los suelos a veces sin tratamiento previo <sup>12</sup>.

### **2.3. BIOMASA**

Se considera la biomasa como una gama de materiales orgánicos renovables de origen vegetal o animal <sup>2</sup>, en otros términos como combustible elaborado a partir de residuos naturales de la agricultura, forestales y pequeñas raciones biodegradables de desechos industriales y urbanos <sup>1</sup>.

- Biomasa originados de cultivos energéticos: Son campos en los que se produce una especie con el fin de su consumo energético.
- Biomasa originados de forma Natural: Producido por naturaleza, animales y plantas, ejemplos los bosques, las heces, y mucho más.
- Biomasa originada de residuos: Generada por interacción humana, como son los residuos agrícolas, agroindustriales, forestales, y los desechos biodegradables.

La biomasa se convirtió en una plataforma química para producir energía donde se logra obtener la producción de biocombustibles importante para la demanda en el transporte y otros productos beneficios disponibilidad global<sup>13</sup>. Los residuos adecuados de biomasa lignocelulósica en particular son la madera, paja, tallos, bagazo, raquis y a su vez se desligan de la industria alimentaria <sup>14</sup>.

## 2.4. LIGNOCELULOSA

La pared celular de las plantas encontramos, composición, material lignocelulósico y su porcentaje de estos polímeros varían dependiendo de las especies de las plantas. En la actualidad utilizar estas fuentes orgánicas para producir biocombustible es una opción prometedora por la disponibilidad global <sup>15</sup>. La lignocelulosa se compone por lignina, celulosa y hemicelulosa siendo el componente fundamental y más común de la biomasa producida por la fotosíntesis <sup>16</sup>.

**Tabla 3.** Composiciones diferentes de lignocelulosa.

COMPOSICIÓN	BIOMASA (%)				
	Madera	Banano	Raquis de Banano	Cascarilla de arroz	Bagazo de caña
Celulosa	38 - 50	33.26	36-42	26-39	49
Hemicelulosa	23 - 32	13.12	29-34	18-22	24.8
Lignina	15 - 25	36.78	10-20	18-25	25.8

**Fuente:** <sup>17, 18, 19, 20</sup>.

Los materiales lignocelulósicos son capaces de separarse brindando productos con valor añadido. Los polímeros celulósicos se derivan de la celulosa, útiles para fabricar papeles y semejantes, a su vez, hidroliza a sus componentes monoméricos produciendo medios fermentables para producir biocombustibles<sup>21</sup>.

Las hemicelulosas y los monoméricos derivados azucarados (pentosas) obtenidos por medios de fermentativos, generan gran cantidad de monómeros y oligómeros, obteniendo á. acético, xilitol y furfural. El procesamiento de raquis para la producción de biodiesel genera enormes cantidades de residuo de masa lignocelulósica compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina. En este trabajo se estudió la valorización de estos componentes, específicamente la fracción mayoritaria, la hemicelulosa.<sup>21</sup>

### **2.4.1. CELULOSA**

Biopolímero natural llamado celulosa, su fórmula química es  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , constituido por unidades de D-glucosa, unidos mediante enlaces  $\beta$  1-4 glucósido. Es componente principal de los tejidos vegetales y abundante en la tierra se encuentran en animales, plantas, y ciertas bacterias<sup>22</sup>.

La celulosa de la planta se forma de piezas cristalinas, las capas de celulosa se unen formando rejillas de celulosa o haces de la misma donde las rejillas en mayoría son independientes y se unen libremente por puentes de hidrogeno <sup>22, 23</sup>.

La celulosa de manera natural en ocasiones no puede emplearse por lo que se deben hidrolizar a través de sustancias bases o ácidas y con enzimas, las primeras mejoran la hidrolisis de celulosa, utilizar estos residuos de gran disponibilidad para producir bioetanol y proteína unicelular son prometedores <sup>24</sup>.

### **2.4.2. HEMICELULOSA**

Estructura compleja de hidratos de carbonos en las paredes celulares de las plantas que tienen espigas dorsales  $\beta$ -(1 4) unidas con una configuración ecuatorial. Las hemicelulosas incluyen xiloglucanos, xilanos, mananos y glucomananos, y  $\beta$ -(1 3,1 4)-glucanos. Estos tipos de hemicelulosas están presentes en las paredes celulares de todas las plantas terrestres, a excepción de los  $\beta$ -(1 3,1 4)-glucanos, que están restringidos a Poales y algunos otros grupos. La estructura detallada de las hemicelulosas y su abundancia varían ampliamente entre diferentes especies y tipos celulares. El papel biológico más importante de la hemicelulosa es su contribución al fortalecimiento de la pared celular mediante la interacción con la celulosa y, en algunas paredes, con la lignina. Estas características se discuten en relación con los modelos ampliamente aceptados de la pared primaria, fáciles de hidrolizar <sup>22</sup>.

### **2.4.3. LIGNINA**

Lignina es un biopolímero de las plantas es muy abundante luego de la celulosa y hemicelulosa, brinda dureza y forma la pared celular del mismo su función es mantener enlazados la celulosa y hemicelulosa posee estructura compleja, es muy utilizada en la industria como materia prima renovable <sup>17</sup>.

La lignina es empleada para producir energía como combustible de calderas, creación de papel y fracciona la biomasa, además aplicada en la preparación de compuestos aromáticos como una opción en la petroquímica, es una materia prima renovable fundamental en crecimiento <sup>25, 26</sup>.

### **2.5. TRATAMIENTO FÍSICO**

Se han desarrollado diferentes tecnologías de pretratamiento para aumentar la accesibilidad de la fibra lignocelulósica al ataque enzimático, incluyendo el mecánico. El tratamiento consiste en reducir el tamaño de una muestra, reducir la cristalinidad y la polimerización. Las ventajas del tratamiento incluyen la baja inversión de capital, el bajo uso de productos químicos y el consumo moderado de energía.

En este tratamiento las muestras de raquis de banano fueron cortadas en trozos de aproximadamente 2 mm. Este material fue sometido a pruebas de secado a temperatura de 105°C, y dos condiciones de aire forzado diferentes en la cámara de secado (sin flujo de aire y con convección de aire forzada, respectivamente). La biomasa seca en condiciones ideales fue sometida a un proceso de hidrolización y se evaluó el efecto del tamaño de las partículas sobre el rendimiento en la reducción de azúcares y la fermentación.

Secado de las pruebas de secado se realizaron en una estufa a 70° C. Aproximadamente 0,7 kg de biomasa húmeda se distribuyeron uniformemente en capa de 1 cm de espesor en rejillas.

## **2.6. TRATAMIENTO DE SECADO**

El secado es un tratamiento empleado en alimento que consiste en una operación de transferencia de masa y calor valorándose mediante diferencias de peso, las muestras pueden ser líquidos y sólidos o mezclas de ellos, donde poseen componentes volátiles en su mayoría agua, muy empleado en la zona alimenticia para minimizar las reacciones de los microorganismos, el secado trae beneficios, disminuye el peso, evita el deterioro de los alimentos o materiales, permite concentrar un producto<sup>27</sup>.

## **2.7. ENZIMAS COMERCIALES**

### **2.7.1. CELULASA**

La celulasa es una enzima catalizadora utilizada para descomponer el alto peso molecular de carbohidratos y celulasas del material lignocelulósica de biomasa para la producción de monosacáridos( $C_6H_{12}O_6$ )<sup>28</sup>. Las celulasas provienen por acciones de microorganismos aerobios o anaeróbicos, otros por variaciones de temperaturas (medias-altas), pero pocos poseen la dicha de producir enzima celulasa, la familia del hongo *Trichoderma* se caracteriza por efectuar correctamente la transformación de la celulasa <sup>29</sup>.

#### **2.7.1.2. CELULASA TRICHODERMA SPP.**

*Trichoderma* spp, hongos independientes muy interactivos en entornos de raíces, suelos, hojas y agente de control biológico. Diversas especies de *Trichoderma* son aplicadas en sistemas fermentativos en cultivos líquidos o sustratos sólidos, de esta forma degrada material lignocelulósico, generando bioenergías<sup>30</sup>. Mediante investigaciones en genética enfocada en enzimas catalizadoras como la *Trichoderma* spp de característica acidófilas

o neutrófilos de pH 4.8 a 6.2 y biomasa vegetal son aplicadas para aumentar los valores de celulasas y xilanas acoplados a una fermentación produce biocompuestos energéticos como biodiesel, etanol<sup>31, 32</sup>.

## 2.8. TRICHODERMA REESEI

El microorganismo aeróbico *Trichoderma reesei* es un derivado del hongo *Trichoderma viride*, esta especie posee la capacidad de producir celulasas y agente de biocontrol, son utilizados en la biotecnología como catalizadores (hidrólisis) para transformar los polisacáridos (celulosa) en monosacáridos (glucosas)<sup>33</sup>.

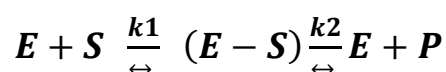
## 2.9. HIDRÓLISIS BIOMÁSICA

Es la acción de estímulo químico y biológico con agua donde se genera una descomposición orgánica de la biomasa de estructuras sencillas o complejas. En la hidrólisis intervienen importantes factores como el tiempo de reacción, temperatura, concentraciones químicas, concentraciones biológicas, se puede realizar hidrólisis ácida, alcalinas y enzimáticas<sup>2</sup>.

## 2.10. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

La hidrólisis enzimática es la acción aplicada para la transformación de los residuos o desechos orgánicos conocido como biomasa mediante microorganismos para obtener beneficios energéticos, esta tecnología enzimática funciona activando enzimas como celulasas, amilasas, entre otras para la descomposición de celulosa y demás polisacáridos produciendo glucosa<sup>34</sup>.

**Reacción 1:** Reacción de la Enzima con el sustrato para formar un producto.

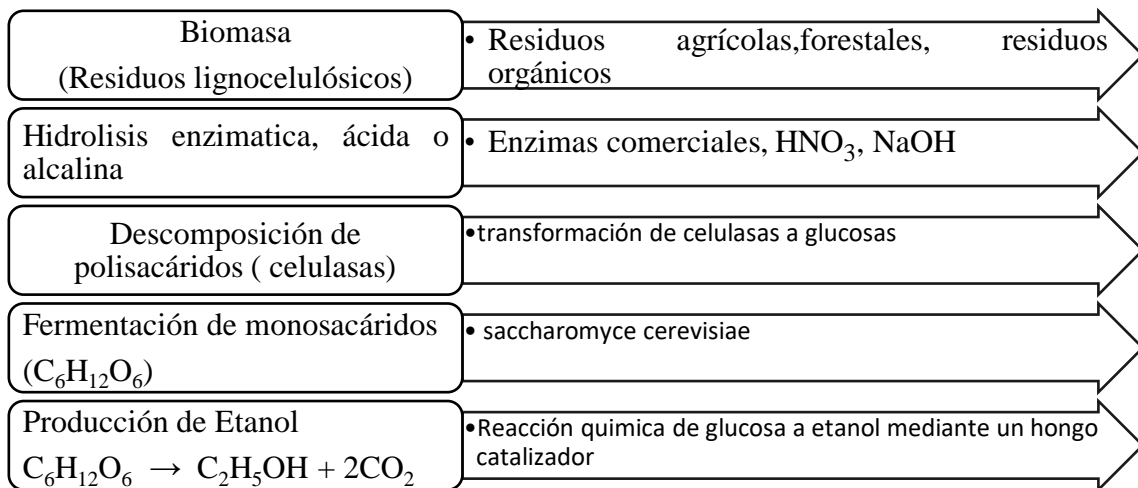




## 2.11. BIOENERGÍAS

Las bioenergías o fuentes energéticas renovables se desarrollan con material lignocelulósico, aplicando innovadoras tecnologías de primera y segunda generación combinado con fermentación produciendo fuentes de energéticas para electricidad, y sector de automotores en producciones de biocombustibles como etanol, biogás, biodiesel<sup>35</sup>. Las bioenergías no ocasionan problemas a la salud, contamina menos el ambiente y es muy utilizado en comercios, casas, transporte, industrias y en energía eléctrica, la biomasa generó 370 TWh de energía eléctrica equivalente una producción eléctrica mundial de 1.5% <sup>31</sup>.

**Cuadro 1.** Tratamiento enzimático combinado con fermentación para obtener etanol.

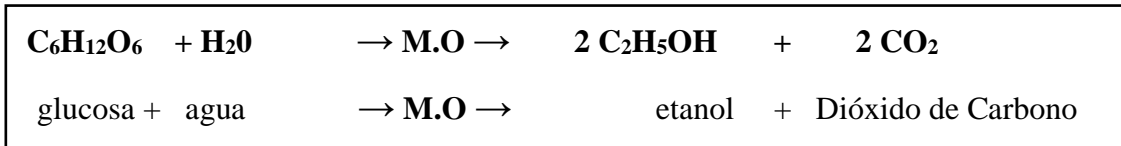


## 2.12. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

El proceso fermentativo para obtener alcohol, se logra mediante un proceso biotecnológico donde actúan microorganismos capaces de transformar los azúcares en etanol, estos azúcares se los obtienen mediante fuentes altas de hidratos de carbonos de

biomasa lignocelulósica como son cereales, frutas, vegetales, residuos agrícolas y desechos orgánicos <sup>36</sup>.

**Reacción 2:** Reacción química de conversión glucosa a etanol.



### 2.13. BIOETANOL

Es el producto obtenido mediante aplicación biotecnológica de transformación de azúcares fermentables por microorganismos a fuentes de biomasa presentes en los residuos frutales, residuos agrícolas las cuales contienen almidones, celulosas, hemicelulosa, y muchos polisacáridos, produciendo bioetanol una fuente alterna a los combustibles fósiles <sup>37</sup>.

## **CAPÍTULO III**

### **3. METODOLOGÍA**

#### **3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN**

Nuestra investigación se realizará mediante un análisis descriptivo-analítico cuasi experimental.

##### **3.1.1. LOCALIDAD DE TRABAJO INVESTIGATIVO**

La investigación se desarrolló en adecuadas condiciones en los laboratorios pertenecientes al área de ciencias químicas y de la salud de la UTMACH, en el Cantón Machala, provincia de El Oro.

##### **3.1.2. UNIVERSO DE TRABAJO**

El racimo de banano posee un tallo flora conocido como raquis de banano, la cual es la muestra de estudio, fue recolectada del sector la Peaña, vía a Pasaje en la finca “LA VILLA”, donde el raquis es desechado como fertilizante orgánico luego de cosechar el banano para la comercialización.

### **3.2. MATERIALES Y EQUIPOS**

#### **3.2.1. MATERIALES**

- Tubos de ensayos de 10ml
- Vasos de precipitación de 100, 500ml, 1000ml
- Embudo de vidrio con soporte
- Papel filtro

- Micropipetas de 10  $\mu$ L y 1000  $\mu$ L
- Puntas para micropipetas
- Erlenmeyer 500ml, 1000ml.
- Balones volumétricos, 100 ml, 200 ml, 250 ml
- Varilla de vidrio
- Desecador
- Jeringa 60ml
- Fundas herméticas
- Papel aluminio
- Cuchillo

### 3.2.2. REACTIVOS

- Glucosa pura
- Tartrato doble sodio y potasio
- 3,5 ácido Dinitrosalicílico
- NaOH pureza 98.8%
- NaOH soluciones de 0.5% - 1% - 1.5%,
- HNO<sub>3</sub> soluciones 0.1M y 1 M
- Enzima comercial Celulasa *Trichoderma reesei*
- Raquis de banano

### 3.2.3. EQUIPO

- Balanza Analítica RADWAG 10mg – 220g
- pH metro Starter 5000
- Estufa memmert VN6400
- Mufla

- Baño termostático Tecnal
- Termo Reactor de Vidrio 1000ml
- Espectrofotómetro UV- DR6000 marca HACH
- Refractómetro de alcohol % v/v

### 3.3. MÉTODOS

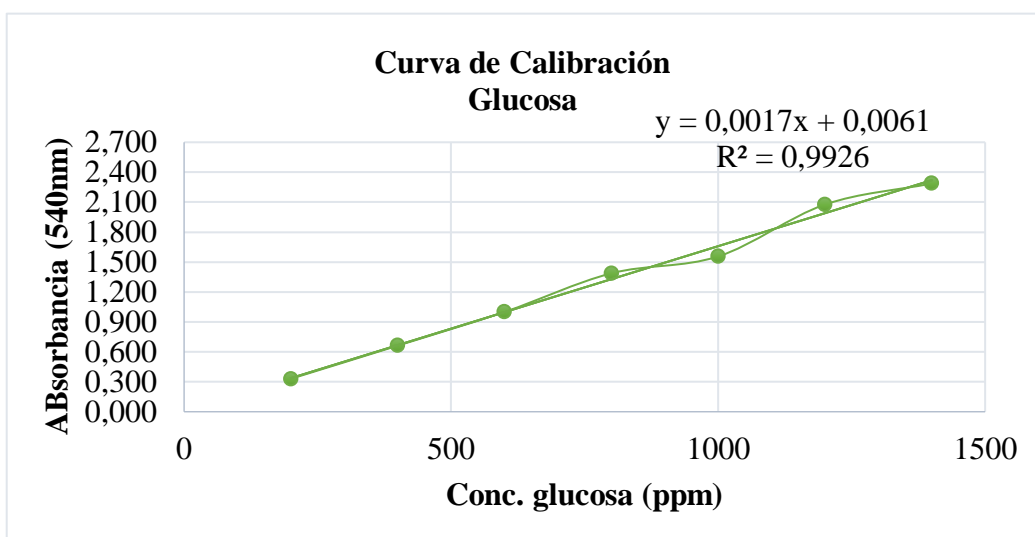
#### 3.3.1. DESARROLLO DE ACTIVACIÓN DEL REACTIVO DE 3,5 DINITROSALICÍLICO.

En tubos de ensayos de 10ml se aplica 1000 ppm de muestra y 1000 ppm del reactivo DNS. Luego los tubos de ensayo pasan por baño maría a 100 °C por 5 minutos. Dejar enfriar de 23 a 26 °C y se adiciona 4ml de agua destilada.<sup>38</sup> Se procede a agitar y luego realizar la lectura en el espectrofotómetro UV DR6000 a 540 nm <sup>39</sup>.

#### 3.3.2. CURVA DE CALIBRACIÓN - PATRÓN DE GLUCOSA.

Preparación de la solución glucosa a diferentes concentraciones, tomando siete puntos representativos desde 200 ppm hasta 1400 ppm, Para la reacción se aplica DNS según el desarrollo de activación del reactivo DNS.

**Figura 1.** Curva de calibración de glucosa para muestras de raquis. **Fuente:** Autores.



### 3.4. TÉCNICA

- ESPECTOFOTOMETRIA UV-VISIBLE

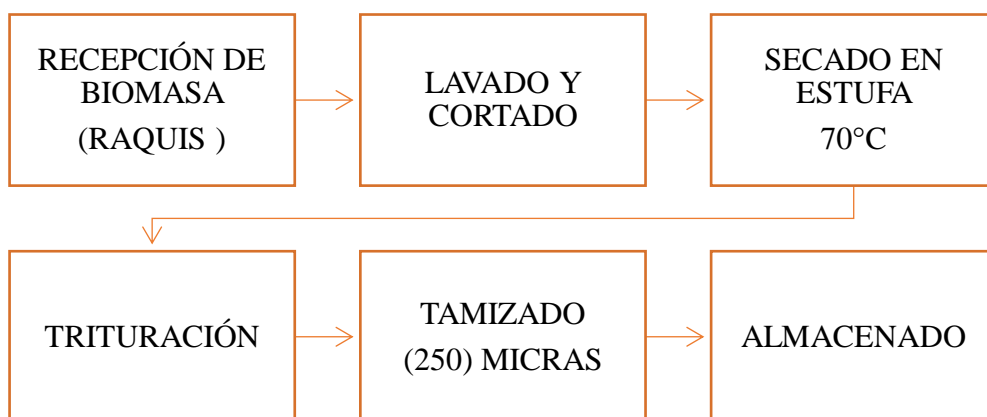
### 3.5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

#### 3.5.1. TOMAS DE MUESTRAS DE BIOMASA

Recolección de las muestras se efectuó en la zona “La Peaña” vía a Pasaje, provincia de El Oro, se realiza un tratamiento preliminar, para eliminar partículas extrañas o impurezas u otros agregados del campo que alteren el proceso de análisis.

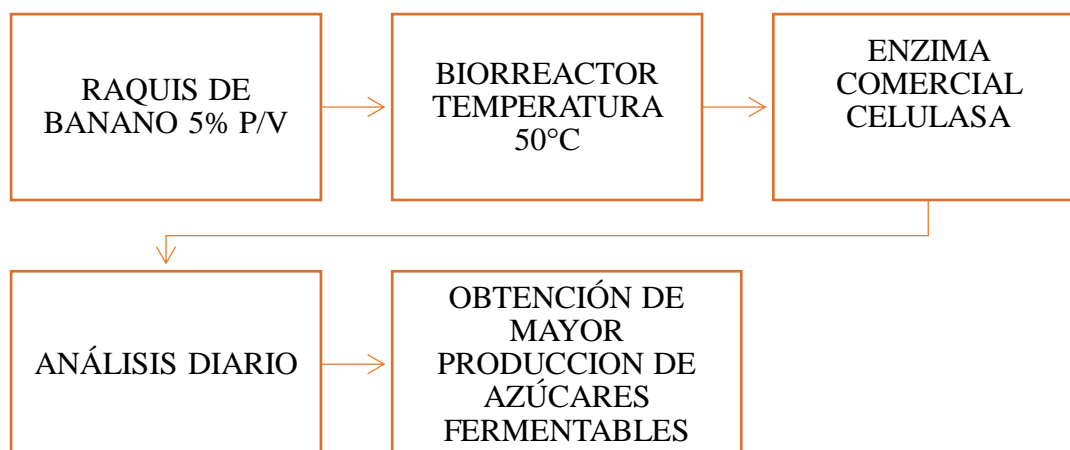
#### 3.5.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

**Diagrama de flujo 1.** Proceso para obtención de raquis de banano seco y triturado.



Recepción de muestras de racimo de banano, previamente lavado para luego cortar el raquis en longitud aproximada. 0.5 a 2 centímetros para llevar a estufa a 70°C hasta perder humedad y luego se reduce el tamaño de partícula para proceder con el tamizado a 250 micras, se almacena en recipiente plásticos hasta su utilidad.

**Diagrama de flujo 2.** Proceso de hidrólisis enzimática del raquis de banano.



Para solución de raquis se preparó al 5% p/v y se acondiciona el biorreactor a 50 °C se ajusta el pH 4.8 – 6 para añadir el 1ml de inoculo de enzima comercial celulasa *Trichoderma Ressei* con estos parámetros permite una óptima condición en la hidrólisis del raquis de banano, se procede a analizar por 4 días aplicando el método de DNS en el espectrofotómetro UV-Visible DR-6000 hasta obtener la mayor producción de azúcares fermentables para acoplarlo a una fermentación y obtener etanol.

**Tabla 4.** Diseño experimental.

Experimento	Sustrato (%)	Enzima (ml)	pH	Temperatura(°C)	Tamaño partícula (micras)
A1	5	1ml	4.5-5.5	50	250
A2					
A3					

**Fuente:** Autores.

### 3.5.3. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

El determinar humedad permite conocer la composición de retención de agua en la muestra de raquis de banano, para la determinación se pesó 5g de muestra y la cápsula de porcelanato para obtener su diferencial en peso, pasa a mufla a 105 (+/-)1°C en un tiempo

de 3h, se deja enfriar la muestra en un desecador y se pesa varias veces hasta el peso constante, y se calcula mediante la fórmula de humedad <sup>27</sup>.

PCM<sub>i</sub>= peso cápsula con muestra inicial

$$\text{Ec. 1: } \% H = \frac{PCM_i - PCM_f}{PM_i} \times 100$$

- % H= Humedad
- PCM<sub>i</sub>= peso cápsula con muestra inicial
- PCM<sub>f</sub>= peso cápsula con muestra final
- PM<sub>i</sub>= peso muestra inicial

#### **3.5.4. TRATAMIENTO DE SECADO**

En este tratamiento las muestras de raquis de banano fueron cortadas en rodajas y en trozos de aproximadamente 2 - 4 mm, posteriormente fue sometido a pruebas de secado de estufa a temperatura de 70 (+/-) 0.5 °C, el peso lo relacionamos con el tiempo hasta peso constante <sup>40</sup>. La biomasa seca en condiciones ideales fue sometida a un proceso de hidrolizado enzimático para cuantificar la producción de azúcares fermentables.

#### **3.5.5. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA**

Para el proceso fermentativo de los azúcares obtenido por el proceso de hidrólisis enzimática, el hidrolizado mediante un tratamiento de esterilización con autoclave a 121°C por 15min, permitiendo inactivar cualquier microorganismo que afecta la fermentación. Seguido se pesa 1g de levadura seca (*Saccharomyces cerevisiae*) en 50 ml del hidrolizado esterilizado para su activación por tiempo estimado de 15 a 20 minutos, luego se añade la activación de levadura al jugo hidrolizado se acondicionado el biorreactor para que puede liberar el CO<sub>2</sub> producto de la acción fermentativa de glucosa a etanol mediante una trampa de agua, la acción comenzará luego de 4 a 5 h, posterior se



procederá a tomar muestra hasta obtener la producción de etanol % v/v en un tiempo de 48 horas <sup>23</sup>.

## CAPÍTULO IV

### 4. RESULTADOS

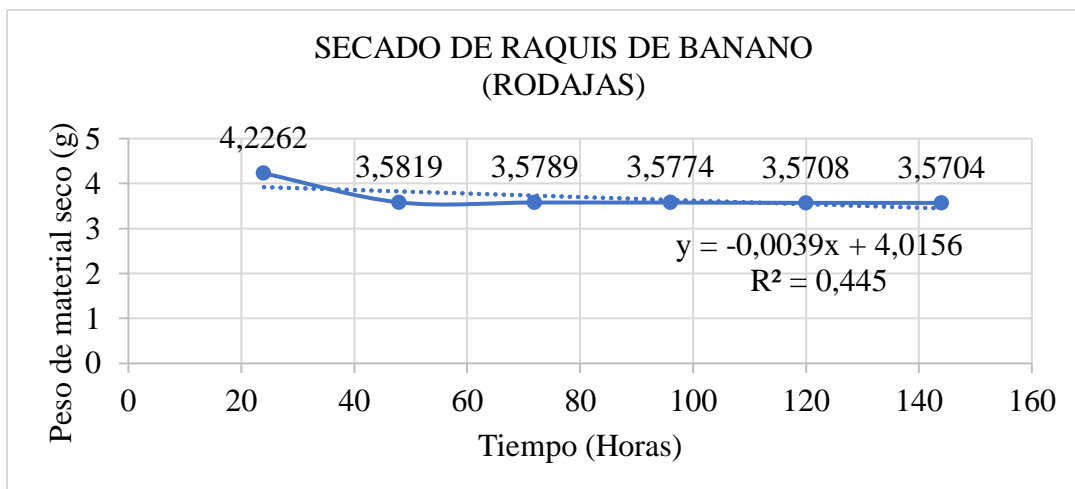
#### 4.1. Humedad y curva de secado del raquis de banano.

Los resultados mediante un análisis por triplicado de humedad en el raquis de banano aplicando el método termogravimétrico en mufla a 105 (+/-) 0.5 °C con tamaño de muestra fresca representativa 5 g aproximado por un tiempo de 3h, permitiendo obtener un 93% de humedad en la muestra.

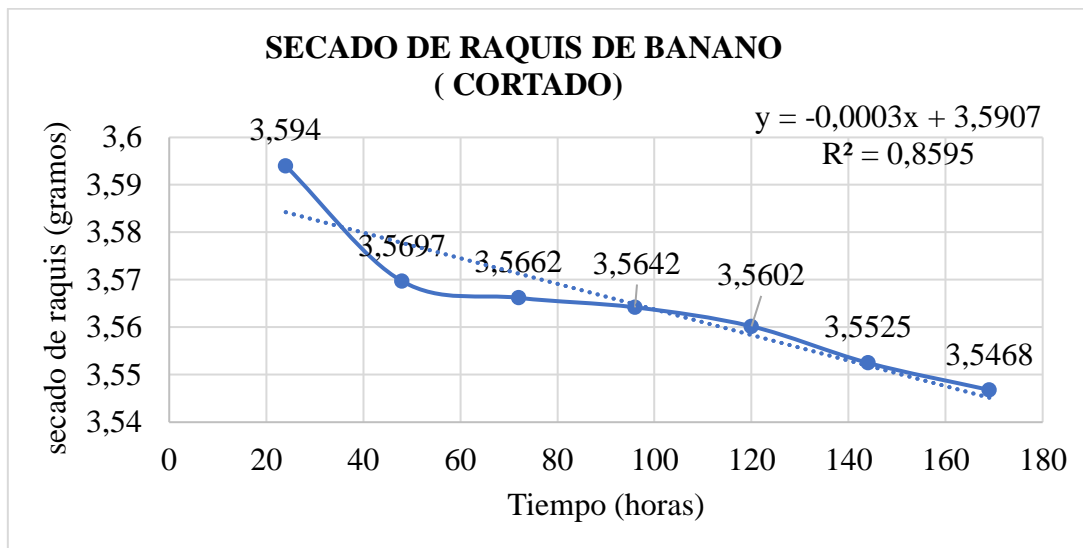
Mediante un proceso de secado en estufa a 70°C por un tiempo de 6 días, permitió obtener una curva de secado mediante diferentes tratamientos físicos a la muestra (raquis de banano); **figura 2**, tiempo de 120 h = 3.5708 g equivalente al 6.96% de raquis de banano seco; **figura 3**, presenta a los 120 h = 3.5602 g equivalente al 7.07 % de raquis de banano seco. Cabe indicar que la temperatura óptima de secado es 70°C, a diferentes temperatura demorara el tiempo de secado como menciona (OtazuIosu, 2010) <sup>41</sup>.

$$\text{Fórmula: Ec.2. Secado (g)} = \frac{(P.\text{cap}+PM)_o - (P.\text{cap}+PM)_f}{PM_o} \quad \text{Ec.3. \% Secado} = \frac{\text{Secado (g)} * 100}{PM_o}$$

**Figura 2.** Comportamiento del secado de raquis de banano en rodajas de dimensiones de 1 cm de longitud. **Fuente:** Autores.



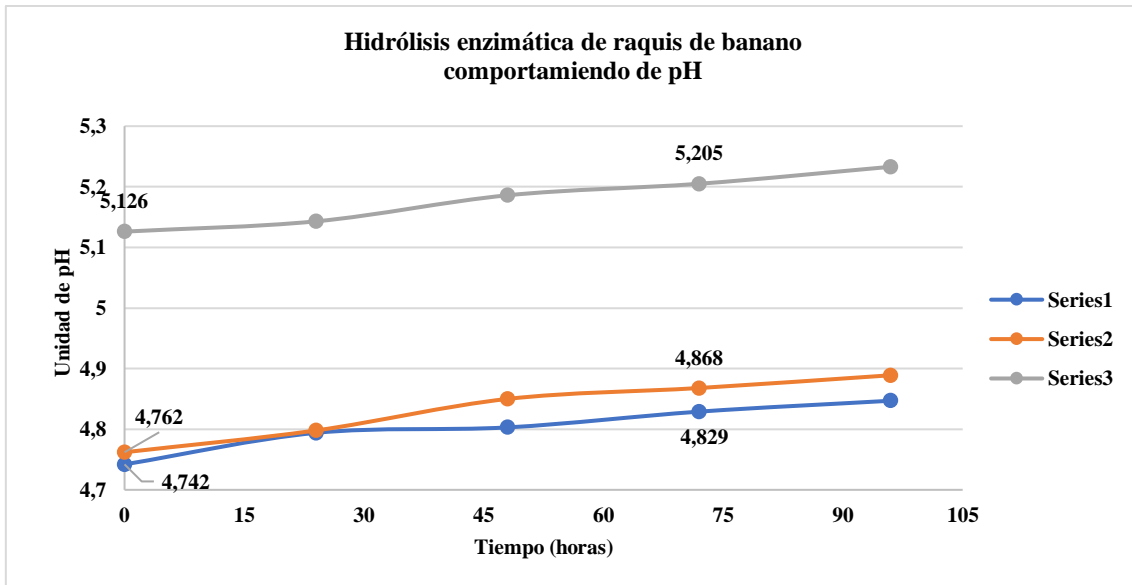
**Figura 3.** Comportamiento del Secado de raquis de banano cortado en pequeñas proporciones de 2-4 mm de longitud. **Fuente:** Autores.



#### 4.2. Comportamiento de pH en la producción de azúcares fermentables.

Como se observa en la **figura 4**, el aumento del pH a través del tiempo de hidrólisis con *Trichoderma reesei* en el raquis de banano 5% p/v a temperatura constante de 50 °C. El pH inicial está dentro del intervalo propuesto 4.5 - 5.5, a los posteriores días va en aumento acondicionado por la enzima a las 72 h del proceso se obtiene la mejor producción de azúcares fermentables y el pH es óptimo para el trabajo ejercido por la enzima.

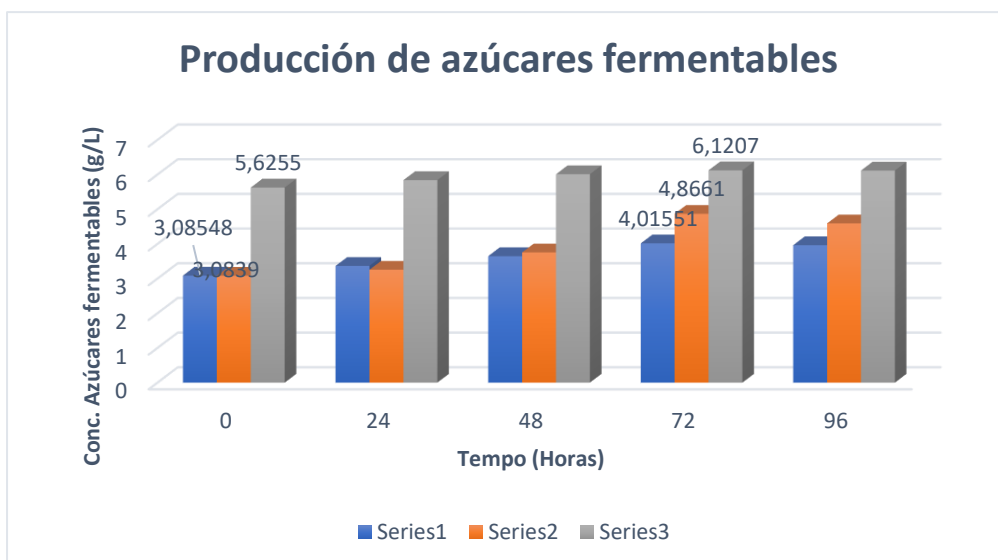
**Figura 4.** Comportamiento de pH durante el tiempo de hidrólisis enzimática a temperatura constante. Series1= A1; Series2 = A2; Series3 = A3. **Fuente:** Autores.



### 4.3. Producción de azúcares fermentables en raquis de banano

**Figura 5**, se observa la producción de azúcares fermentables en el raquis de banano luego de una hidrólisis enzimática observando el aumento de concentración en cada experimento A1: 4.0155g/L; A2= 4.8661g/L; A3=6.1207g/L, dando a los 3 días (72h) la mayor producción de azúcares fermentables en los tratamientos.

**Figura 5.** Azúcares fermentables de raquis de banano al 5% p/v y comportamiento mediante hidrólisis enzimática a través del tiempo con inóculo de 1000ppm de *Trichoderma reesei*. Series1 = A1; Series2 = A2; Series3 = A3.



#### 4.4. Cinética de hidrólisis enzimática del raquis de banano

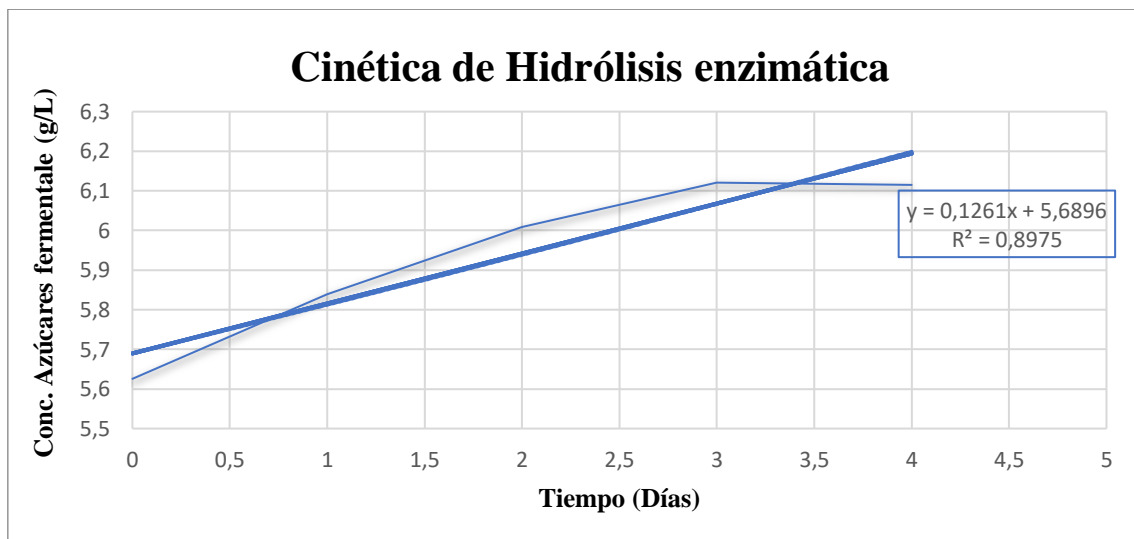
La cinética de la hidrólisis con *Trichoderma reesei* permitirá demostrar la conversión biológica de celulasas a glucosas, por lo que se aplicó un modelo cinético de monod, la

ecuación siguiente lo demuestra: **Ec.4.**  $V_o = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot S}{K_m + S}$

$$\text{Ec.5.} \quad \frac{dy}{dx} = \ln\left(\frac{C_o}{c}\right) K \exp t \quad (42)$$

a continuación, en comportamiento de la cinética enzimática:

**Figura 6.** Cinética de hidrólisis enzimática de raquis de banano al 5% p/v en concentraciones de g/L.



El valor de la cinética  $K=0.1261 \text{ g/L} \cdot \text{h}$  de la hidrólisis enzimática de raquis de banano es comparable con  $K=0.169 \text{ g/L} \cdot \text{h}$ , obtenido del estudio cinético de la sacarificación de cáscara de banano<sup>23</sup>, y la  $K=0.846$ , reportada por el estudio de hidrólisis de celulosa sintética<sup>42</sup>.

## 5. CONCLUSIONES

Mediante la investigación se logró la producción de azúcares fermentables mediante la hidrólisis enzimática utilizando la celulasa comercial *Trichoderma reesei* y por consiguiente la bioconversión a etanol mediante la transformación fermentativa de los azúcares, otorgando un valor del 4.8 % v/v de etanol a 48 h del proceso de inicio.

Mediante la determinación de la humedad y la curva secado demostrado en el proceso de eliminación de agua del raquis de banano obteniendo un 93% de humedad y que mediante un tratamiento de cortado reduciendo el tamaño de partícula del raquis se obtiene una mejor curva de secado de la muestra.

Mediante la producción de azúcares fermentables aplicando la hidrólisis enzimática se determinó el pH de la muestra permitiendo obtener unos valores dentro de los parámetros establecidos de pH entre 4.5 - 5.5 demostrando estar dentro óptimo del funcionamiento de la enzima celulasa *Trichoderma reesei*.

Se cuantificó la producción de azúcares fermentables mediante la hidrólisis enzimática de una solución al 5% de raquis de banano, realizando los análisis por triplicado con un valor promedio de  $A_1= 4.02\text{g/L}$ ,  $A_2= 4.87\text{g/L}$ ,  $A_3= 6.1207\text{g/L}$ , y con una cinética de  $K= 0.1261$  afirma que la enzima tiene afinidad con el sustrato.

## **6. RECOMENDACIÓN**

- Esterilizar los materiales y el biorreactor correctamente para prevenir contaminantes microbiológicos que afectan a la muestra y los resultados de la hidrólisis y la fermentación.
- Acondicionar debidamente el pH y temperatura a la enzima y hongo para una producción óptima en los resultados de glucosa y bioetanol.
- Reducir el tamaño de partícula obtendrá mejores beneficios de sustrato con la enzima, obteniendo mejor rendimiento en glucosa.
- La concentración de azúcares en la muestra varía dependiendo del lugar de recolección.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Correa Álvarez, P. F.; González González, D.; Pacheco Alemán, J. G. ENERGÍAS RENOVABLES Y MEDIO AMBIENTE: SU REGULACIÓN JURÍDICA EN ECUADOR. *Rev. Univ. y Soc.* **2016**, 8 (3), 179–183.
- (2) Abril, M. Optimización de La Reacción de Hidrólisis Ácida de Los Residuos de La Planta de Banano, Para Mayor Rendimiento a Glucosa. *Repos. Inst. Univ. Cuenca* **2016**, 82.
- (3) Valenzuela, M. ENZIMÁTICA DEL EXCEDENTE ORGÁNICO DEL BANANO USANDO EL HONGO TRAMETES VERSICOLOR PARA LA OBTENCIÓN DE ETANOL. *Repos. Inst. Univ. Cent. del Ecuador* **2012**, 7, 1–25.
- (4) Aguilar, D. Determinación Del Potencial Energético de La Biomasa Residual de Cultivos de Banano En El Cantón Machala, El Oro, Ecuador. *Univ. Politec. Sales.* **2019**, 1–45.
- (5) Giraldo Cano, N.; Montoya Martínez, N. Caracterización de Residuos de Banano (Pseudotallo y Hojas) Mediante Análisis Termogravimétrico Para Uso Potencial Como Biocombustible Sólido. **2015**, 94.
- (6) Fang, H.; Xia, L. Cellulase Production by Recombinant *Trichoderma Reesei* and Its Application in Enzymatic Hydrolysis of Agricultural Residues. *Fuel* **2015**, 143, 211–216. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.11.056>.
- (7) L. Ayala, M. Martínez, A. García, E.J. Delgado, Y. Caro, J. L. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL RAQUIS DE RACIMOS DE PLÁTANO (*Musa Paradisiaca*) Y ACEPTABILIDAD COMO ALIMENTO PARA CERDOS EN CEBA. *Africa's potential Ecol. Intensif. Agric.* **2013**, 53 (9), 1689–1699.



- (8) Mohapatra, D.; Mishra, S.; Sutar, N. Banana and Its By-Product Utilisation: An Overview. *J. Sci. Ind. Res. (India)*. **2010**, *69* (5), 323–329.
- (9) Vargas, A.; Watler, W.; Morales, M.; Vignola, R. PRÁCTICAS EFECTIVAS PARA LA REDUCCIÓN DE IMPACTOS POR EVENTOS CLIMÁTICOS EN EL CULTIVO DE BANANO EN COSTA RICA. *Catie* **2017**, *2* (21), 1–56.
- (10) Ministerio de Comercio Exterior del Ecuador. Informe Sector Bananero Ecuatoriano. *Minist. Comer. Exter.* **2017**, *53* (9), 1689–1699.
- (11) García, R. M.; López, L. M.; Minuche, J. L. Plan of Solid Waste Environmental Management At the Banana Com-. *Rev. Cient. la Univ. Cienfuegos* **2016**, *9* (3), 100–105.
- (12) Granda R., D.; Mejía G., A. I.; Jiménez T., G. Utilización de Residuos de Plátano Para La Producción de Metabolitos Secundarios Por Fermentación En Estado Sólido Con El Hongo *Lentinus Crinitus*. *Util. RESIDUOS PLÁTANO PARA LA Prod. Metab. Secund. POR Ferment. EN ESTADO SÓLIDO CON EL HONGO Lentinus crinitus Util. PLANTAIN WASTE Prod. Second. Metab. BY SOLID SUBSTRATE Ferment. USI* **2005**, *12* (2), 13–20.
- (13) Schwarz, W. H. The Cellulases and Their Application in Degrading Agro-Industrial Waste. *Rev. Colomb. Biotecnol.* **2012**, *4* (1), 6–13.
- (14) Alcal, D. D.; Morell, G.; Cujilema-quitio, M. C.; Le, G.; Baryolo-gonz, L.; Ramos, L. B. Producción Enzimática de Biodiesel Con Biomasa Lignocelulósica. *Tecnol. Química* **2018**, *38* (1), 138–152.
- (15) Espinoza, K. C.; Gamboa, C. A. G.; Matara, J. C.; Torres, L.; Barragán, J. A.; Rodríguez, C. N. Extracción de Azúcares Reductores Totales ART Por Métodos

- Físicos y Químicos de Planta de Zea Mays (Poaceae) “Maíz Amarillo Duro.” *Arnaldoa* **2017**, *24* (1), 289–300. <https://doi.org/10.22497/arnaldoa.241.24112>.
- (16) Cuervo, L.; Folch, J.; Quiroz, R. Lignocelulosa Como Fuente de Azúcares Para La Producción de Etanol. *Bio Tecnol.* **2009**, *13* (3), 11–25.
- (17) Marcelo, E.; Aplicaciones, E. Y.; Despolimerización, M. D. E.; La, P. *Lignin, Structure and Applications Depolymerization Methods for Obtaining Aromatic Derivatives of Industrial Interest*; 2013; Vol. 4.
- (18) Maria, A.; Carvajal, M. APROVECHAMIENTO DE LOS RESIDUOS DEL PSEUDOTALLO DEL BANANO COMUN (Musa Sp AAA) Y DEL BOCADILLO (Musa Sp AA) PARA LA EXTRACCION DE FIBRAS TEXTILES. ANGELICA. *Repos. Inst. Univ. Tecnológica Pereira.* **2012**.
- (19) Palacios B, M. G. Caracterización Química de La Biomasa Procedente de Las Hojas, Pseudotallo, Raquis y Pseudopeciolo de La Planta de Banano y Su Relación Con El Poder Calorífico. *Repos. Inst. Univ. Cuenca* **2016**.
- (20) Sánchez, A.; Gutiérrez, A.; Muñoz, J.; Rivera, C. A. Producción de Bioetanol a Partir de Subproductos Agroindustriales Lignocelulósicos Bioethanol Production from Agroindustrial Lignocellulosic Byproducts. 61–91.
- (21) López, F.\*; García, J.C.; Feria, M.J.; Zamudio, M.A.M.; Pérez, A. Biorrefinería de Materiales Lignocelulósicos: Eucalyptus Globulus. *Bol. del CIDEU* **2010**, *8* (9), 75–82.
- (22) Cortes, W. G. Materiales Lignocelulósicos Como Fuente de Biocombustibles y Productos Químicos. *TecnoESUFA Rev. Tecnol. aeronáutica* **2011**, *16*, 41–46.
- (23) Ocaña, B.; Decker, R.; Cardenas, G. V. Cinética de Sacarificación y Fermentación

Para Producción de Bioetanol a Partir de Cáscara de Banano Maduro Mediante Pretratamiento de Secado. **2019**.

- (24) Rodríguez, I. G.; Piñeros, Y. C. PRODUCTION OF ENZYMATIC COMPLEX IN SOLID STATE FERMENTATION BY *Trichoderma* Sp. USING PALM OIL EMPTY FRUIT BUNCH (EFB) AS SUBSTRATE. *Vitae, Revista la Fac. Química Farm.* **2007**, 35–42.
- (25) Calvo-Flores, F. G. Lignin: A Renewable Raw Material. *Encycl. Renew. Sustain. Mater.* **2020**, 102–118. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803581-8.11517-6>.
- (26) Luo, S.; Cao, J.; McDonald, A. G. Esterification of Industrial Lignin and Its Effect on the Resulting Poly(3-Hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyvalerate) or Polypropylene Blends. *Ind. Crops Prod.* **2017**, 97, 281–291. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.12.024>.
- (27) Tirado, D. F.; Montero, P. M.; Acevedo, D. Estudio Comparativo de Métodos Empleados Para La Determinación de Humedad de Varias Matrices Alimentarias. *Inf. Tecnol.* **2015**, 26 (2), 3–10. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642015000200002>.
- (28) Verdecía, J. M.; Serrat, M. General Technological Aspects for the Conversion to Ethanol of the Lignocellulosic Biomass. *Tecnol. Química* **2010**, 28 (3), 63–70.
- (29) Ovando-chacón, S. L.; Waliszewski, K. N. PREPARATIVOS DE CELULASAS COMERCIALES Y APLICACIONES EN PROCESOS EXTRACTIVOS Commercial Cellulases Preparations and Their Applications in Extractives Processes. *Microbiology* **2005**, 21 (42), 111–120.
- (30) Jazmín Hernández-Melchor, D.; Ferrera-Cerrato, R.; Alarcón, A. *Trichoderma*:

- IMPORTANCIA AGRÍCOLA, BIOTECNOLÓGICA, Y SISTEMAS DE FERMENTACIÓN PARA PRODUCIR BIOMASA Y ENZIMAS DE INTERÉS INDUSTRIAL. *Chil. J. Agric. Anim. Sci., ex Agro-Ciencia* **2019**, 35 (1), 98–112.
- (31) Peña, S. V. LA BIOMASA, IMPORTANCIA, CARACTERÍSTICAS Y FORMAS DE PREPARACIÓN. *Univ. Politécnica Madrid* **2016**, No. November.
- (32) Yoandy Ferrer,M.; León,M.; Michelena,G; Dustet, J.C.;Duque, A.; Ibañez, My-Lai.; Tortoló, K. Selección de Hongos Aislados de Bagazo de Caña Con Actividad Celulasa Sobre Celulosa Cristalina Para Posibles Aplicaciones Industriales. *ICIDCA. Sobre los Deriv. la Caña Azúcar* **2011**, 45 (1), 3–12.
- (33) Ayala, H.; Romero, H. Hidrólisis Enzimática de La Cascarilla de Arroz Utilizando *Trichoderma Reesei*. **2013**, 839–845.
- (34) Bonilla, H. R.; Gómez, O. T.; Dávila, K. D. Hidrólisis Enzimática de Residuos Agroindustriales Del Banano Para La Obtención de Jarabe Glucosado Aplicando Tres Pretratamientos. *Ind. Data* **2015**.
- (35) ONU-ENERGIA. BIOENERGIA SOSTENIBLE: Un Marco Para Las Tomas de Decisiones. **2007**.
- (36) Vázquez H.J, Dacosta, O. *Ingeniería, Investigación y Tecnología.*; Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional Autónoma de México, 2007; Vol. 8.
- (37) Vargas Corredor, Y. A.; Pérez Pérez, L. I. Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales En El Mejoramiento de La Calidad Del Ambiente. *Rev. Fac. Ciencias Básicas* **2018**, V (1), 59–72. <https://doi.org/10.18359/rfcb.3108>.
- (38) Bello GIL, Daniel; Carrera B., Emilia; Diaz M., Y. Determinación de Azúcares Reductores Totales En Jugos Mezclados de Caña de Azúcar Utilizando El Método

- Del Ácido 3,5 Dinitrosalicílico. *Icida* **2006**, *40*, 45–50.
- (39) Guevara Bravo, C. A.; Arenas, H. A.; Peláez Jaramillo, C. A. Hidrólisis Endo-Enzimática Y Producción De Etanol a Partir Del Banano De Rechazo. *Bioteología en el Sect. Agropecu. y Agroindustrial* **2015**, *13* (2), 86. [https://doi.org/10.18684/bsaa\(13\)86-93](https://doi.org/10.18684/bsaa(13)86-93).
- (40) Suárez-Hernández, L.; Barrera-Zapata, R.; Forero-Sandoval, A. F. Evaluation of Alternative Drying Techniques for the Earthworm Four Processing. *Corpoica Cienc. y Technol. Agropecu.* **2016**, *17* (1), 55–71. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol17\\_num1\\_art:461](https://doi.org/10.21930/rcta.vol17_num1_art:461).
- (41) Otazu, I. Influencia de La Temperatura y Tiempo de Secado En La Calidad de Las Hojas. **2010**, 35.
- (42) 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* (1), 83–88.

## 8. ANEXOS

### Anexo 1. Recolección de muestra

Fuente: Autores.



### Anexo 2. Preparación de muestra para el secado.

Fuente: Autores.



**Anexo 3.** Secado de raquis de banano.

**Fuente:** Autores.



**Anexo 4.** Raquis seco – Trituración de raquis seco.

**Fuente:** Autores.



## Anexo 5. Raquis Seco - Reducción de Tamaño – Tamices

**Fuente:** Autores.



## Anexo 6. Enzima comercial.

**Fuente:** Autores.





**Anexo 7. Baño termostático- controlador – Biorreactor.**

**Fuente:** Autores.



**Anexo 8. Mufla.**

**Fuente:** Autores.



**Anexo 9.** Medición de alcohol mediante un alcoholímetro

**Fuente:** Autores.



**Anexo 10.** Tratamiento de muestra a baño María para análisis

**Fuente:** Autores.



**Anexo 11. Espectrofotómetro UV- DR 6000.**

**Fuente:** Autores.



**Anexo 12. Balance Analítica.**

**Fuente:** Autores.



### Anexo 13. Equipo para determinar pH.

Fuente: Autores.





### Anexo 14. Registro de asistencia – Laboratorio de química analítica cuantitativa

Fuente: Autores.

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MACHALA UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD Calidad, pertinencia y calidad		REGISTRO DE ASISTENCIA DEL PERSONAL AL LABORATORIO		Código: 03 DLAB/JACGS		
	CARRERA (S)	Ingeniería Química, Ingeniería en Alimentos, Bioquímica y Farmacia		Versión:1		
	LABORATORIO	Química Analítica Cuantitativa				
FECHA	NOMBRE	CARGO	HORA ENTRADA	HORA SALIDA	C.I.	FIRMA
29/03/2021	GIANCARLO STEVEN Mendoza Guzmán	TESISTA	09:00	16:00	0704869498	
29/03/2021	Carlos Luis Torres Jungel	TESISTA	09:00	16:00	0750216736	
30/03/2021	GIANCARLO STEVEN Mendoza Guzmán	TESISTA	09:00	14:00	0704869498	
30/03/2021	Carlos Luis Torres Jungel	TESISTA	09:00	14:00	0750216736	
14/04/2021	GIANCARLO STEVEN Mendoza Guzmán	TESISTA	09:00	16:00	0704869498	
14/04/2021	Carlos Luis Torres Jungel	TESISTA	09:00	16:00	0750216736	
20/04/2021	GIANCARLO STEVEN Mendoza Guzmán	TESISTA	08:30	16:00	0704869498	
20/04/2021	Carlos Luis Torres Jungel	TESISTA	08:30	16:00	0750216736	

Anexo 15. Registro de actividades experimentales de trabajo de titulación.

Fuente: Autores.

 UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MACHALA UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD Calidad, Pertinencia y Calidez REGISTRO DE ACTIVIDADES EXPERIMENTALES DEL TRABAJO DE TITULACIÓN		Código: 07 DLAB/UACQS				
CARRERA		Versión:1				
LABORATORIO	INVESTIGACIONES					
Datos Usuario	Fecha	11-11/Noviembre/2021	Hora Inicio	08:30	Hora Finalización	16:00
	Docente	Ing. Estefanía Molina	Estudiante		Investigador	
	Nombre	Eduardo Méndez - Carlos TORRES				
	Carrera	Ing. Químico	Curso		Paralelo	
Datos de la Actividad	Trabajo Autónomo		Asignatura			
	Investigación		N° de Oficio			
	Refuerzo de prácticas		N° de Oficio			
	Recuperación de práctica		N° de Oficio			
	Vinculación con la comunidad		N° de Oficio			
	Eventos Varios		N° de Oficio			
Detalle de la Actividad: Preparación de Muestras (RAM) De Bacterias Preparación de Solución Patrol Glucosa						
Firmas de responsabilidades	N°	Nombre del Usuario	Cédula	Firma		
	1	Giancarlo Steven Huidobro Gutierrez	0704862488			
	2	Carlos Luis Torres Jimenez	0730216756			
	3					
	4					
5						
Requerimientos	Materiales		Reactivos y Sustancias		Equipos	
	TANQUES 20ml - 40ml Gud. Ho Tubo de ensayo PASTA PASTA 1000ml PASTA 200ml		2x Dimetilglicol (DMG) GLUCOSA PURA AGUA DESTILADA		ESTUFA Espectrofotómetro UV-Visible DR6000 Balanza analítica	
Observaciones: Sin observaciones						
Firma: Ing. Estefanía Molina Gorozabel Responsable del Laboratorio			Firma:  Docente Responsable			