



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MACHALA

**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA
SALUD**

CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE:**

INGENIERO EN ALIMENTOS

TEMA:

**“OBTENCIÓN DE ALCOHOL ETÍLICO A PARTIR DEL
ALMIDÓN DE BANANO (*Cavendish gigante*) EN LA
PROVINCIA DE EL ORO, EL GUABO, 2014”.**

AUTOR:

Segundo Víctor Espinoza Alvarado

TUTOR:

Dr. Víctor Hugo González Carrasco, Mg. Sc.

MACHALA – EL ORO – ECUADOR

2015

CERTIFICADO DE REVISIÓN

El presente trabajo de investigación titulado “**OBTENCIÓN DE ALCOHOL ETÍLICO A PARTIR DEL ALMIDÓN DE BANANO (*Cavendish gigante*) EN LA PROVINCIA DE EL ORO, EL GUABO, 2014**”, fue realizado por el autor Sr. **Segundo Víctor Espinoza Alvarado**, egresado de la carrera de Ingeniería en Alimentos, ha sido dirigido y revisado con sugerencia a las normas de proyectos de investigación, por lo que autorizo su presentación.

Dr. Víctor Hugo González Carrasco

TUTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTORÍA

Yo, **SEGUNDO VÍCTOR ESPINOZA ALVARADO** con cédula de identidad 070495184-7, egresado de la Carrera de Ingeniería en Alimentos de la Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud de la Universidad Técnica de Machala responsable del presente trabajo de titulación, titulada “OBTENCIÓN DE ALCOHOL ETÍLICO A PARTIR DEL ALMIDÓN DE BANANO (*Cavendish gigante*) EN LA PROVINCIA DE EL ORO, EL GUABO, 2014”, certifico que la responsabilidad de la investigación, resultados y conclusiones expuestos en el presente trabajo pertenecen exclusivamente a mi autoría, una vez que ha sido aprobada por mi tribunal de sustentación de trabajo de titulación autorizando su presentación.

Deslindo a la Universidad Técnica de Machala de cualquier delito de plagio y cedo mis derechos de autor a esta Institución de Educación Superior, para que ella proceda a darle el uso que crea conveniente.

Egdo. Segundo Víctor Espinoza Alvarado.

CI: 070495184-7

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD

Yo, **SEGUNDO VICTOR ESPINOZA ALVARADO** certifico que la responsabilidad de la investigación, los resultados y conclusiones del presente trabajo de investigación titulado “**OBTENCIÓN DE ALCOHOL ETÍLICO A PARTIR DEL ALMIDÓN DE BANANO (*Cavendish gigante*) EN LA PROVINCIA DE EL ORO, EL GUABO, 2014**”, pertenecen exclusivamente al autor.

Egdo. Segundo Víctor Espinoza Alvarado.

CI: 070495184-7

DEDICATORIA

En primer lugar quiero dedicar este trabajo a Dios, por darme la sabiduría, conocimiento y revelación necesaria para culminar con éxitos mi estudio de pre-grado, ser mi fortaleza en mis momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizaje, experiencia, felicidad y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

A Luis Aguirre y mi madre Sonia Alvarado, que ha sabido formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores, los cuales han sido la base principal en todos estos años de estudio, gracias a ustedes que han contribuido incondicionalmente para lograr cumplir uno de mis objetivos propuestos en mi vida.

A mis hermanos Paola, Carlos, Erick, Luis y Susana por estar siempre presentes, por su apoyo y confianza en todo lo necesario, son el pilar fundamental en mi vida, espero siempre contar con su valioso e incondicional apoyo.

A mis sobrinos Steven, Amelia, Kimberly, Stick e Isaías, que de una u otra manera aportaron con su presencia y cariño para concluir una etapa importante de mi vida.

Víctor Espinoza

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecerle a Dios por darme salud, fuerza, sabiduría, protección, bendición y conocimiento necesario, durante todos los años de estudio, ya que gracias a Dios he podido superar obstáculos y dificultades, para llegar hasta donde he llegado, por hacer realidad este sueño anhelado.

A Luis Aguirre y a mi madre Sonia Alvarado que me han enseñado a no desfallecer, sino hacer constante y perseverante a no rendirme ante nada y que no hay cosas imposibles, solo hombres incapaces, los límites no existen los límites los pone uno mismo, solo hay que dar el primer paso he intentarlo, a través de sus sabios consejos, su apoyo incondicional y por depositar su confianza en mí.

A mis hermanos Paola, Carlos, Erick, Luis y Susana por acompañarme durante este arduo camino y compartir conmigo tristezas y alegrías.

A mi Tutor de tesis, Dr. Víctor Hugo González Carrasco por sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación ha logrado que pueda terminar mis estudios. Gracias Dr. por todo, gracias por su amistad.

De igual manera al Ing. José Humberto Ayala Armijos por toda la colaboración brindada durante la realización de este proyecto, por su conocimiento, observaciones, sus consejos y su amistad.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida universitaria a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias por formar parte de este logro obtenido, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones.

ÍNDICE

CONTENIDO	PAGINAS
CERTIFICADO DE REVISIÓN	ii
CESIÓN DE DERECHOS DE AUTORÍA	iii
CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
ÍNDICE	7
ÍNDICE DE FIGURAS	11
ÍNDICE DE TABLAS	12
RESUMEN	13
ABSTRACT.....	14
INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN	2
OBJETIVOS	3
General	3
Específicos	3
Preguntas de Investigación.....	3
VARIABLES	4

VARIABLES INDEPENDIENTES	4
VARIABLES DEPENDIENTES.....	4
HIPOTESIS	4
Hipótesis nula.....	4
Hipótesis alternativa.....	4
1. MARCO TEÓRICO	5
1.1. EL BANANO.....	5
1.1.1. Valor nutritivo del banano	7
1.1.2. Composición química del banano.....	7
1.1.3. Usos del banano	8
1.1.4. Beneficios del consumo de banano verde.....	8
1.2. EL ALMIDÓN	9
1.2.1. Composición química.	9
1.3. EL ALMIDÓN DE BANANO.....	9
1.3.1. Estructura de almidón de banano.....	11
1.3.2. Composición del almidón de banano.....	12
1.4. HIDRÓLISIS.....	13
1.4.1. Hidrolisis Acida o por vía química	14
1.4.2. Hidrolisis enzimática o por vía biológica	16
1.5. FERMENTACIÓN	17

1.5.1.	Fermentación alcohólica	17
1.5.2.	Microorganismos Utilizados en la Obtención de Etanol	20
1.5.2.1.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
1.5.2.2.	<i>Morfología</i>	21
1.5.2.3.	<i>Metabolismo</i>	21
1.5.3.	Alfa-amilasa.....	22
1.5.4.	Glucoamilasa	23
1.6.	SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA (SSF)	23
1.7.	MATERIAS PRIMAS UTILIZADAS EN LA FERMENTACIÓN	24
1.7.1.	Solución o caldo nutritivo	24
1.7.2.	Relación carbono/nitrógeno	25
1.7.3.	Características principales de los cultivos microbianos utilizados en la fermentación alcohólica.....	25
1.7.3.1.	<i>Tolerancia al etanol</i>	26
1.7.3.2.	<i>Tolerancia a la alta temperatura</i>	26
1.7.3.3.	<i>Tolerancia a la alta concentración de azúcares</i>	26
1.8.	PROCESOS TECNOLÓGICOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL..	27
2.	METODOLOGÍA.....	28
2.1.	LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN	28
2.1.1.	Universo y muestra.....	28

2.1.2.	Ubicación geográfica.....	28
2.1.3.	Ubicación Astronómica.....	28
2.1.3.1.	<i>Limites</i>	29
2.1.3.2.	<i>Extensión</i>	29
2.1.3.3.	<i>División Política</i>	30
2.2.	METODOLOGÍA Y PROCEDIMIENTO.....	31
2.2.1.	Tipo de investigación.....	31
2.2.2.	Diseño de investigación.....	31
2.3.	CONDICIONES DE LA HIDRÓLISIS.....	32
2.3.1.	Hidrólisis Enzimática del almidón de Banano.....	32
2.3.2.	Protocolo de Hidrólisis Enzimática del almidón de banano.....	32
2.4.	MÉTODOS ANALÍTICOS UTILIZADOS.....	33
2.4.1.	Obtención de la curva de calibración (Glucosa).....	33
2.4.2.	Determinación de azúcares reductores.....	34
2.4.2.1.	<i>Desarrollo de la reacción del DNS</i>	35
2.4.3.	Determinación del pH.....	35
2.4.4.	Determinación del Oxígeno Disuelto.....	35
2.5.	RECURSOS EMPLEADOS.....	35
2.5.1.	Recursos Humanos.....	35
2.5.2.	Recursos Físicos.....	36

2.5.2.1.	<i>Equipos</i>	36
2.5.2.2.	<i>Materiales de Laboratorio</i>	36
2.5.2.3.	<i>Reactivos</i>	37
2.5.2.4.	<i>Varios</i>	37
3.	RESULTADOS	47
3.1.	CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICAS DEL BANANO VERDE (<i>Cavendish gigante</i>).	47
3.2.	CONVERSIÓN MEDIANTE HIDROLISIS ENZIMÁTICA DEL ALMIDÓN DEL BANANO VERDE A GLUCOSA.....	48
3.2.1.	Actividad Enzimática.....	49
3.2.2.	Análisis Estadístico de la Concentración de Glucosa Obtenida en la Hidrolisis del Almidón	50
3.2.2.1.	<i>Prueba de TUKEY</i>	51
3.3.	FERMENTACIÓN DE LA GLUCOSA OBTENIDA EN EL PROCESO DE HIDROLISIS DEL ALMIDÓN	52
3.4.	DETERMINACIÓN DE LOS GRADOS ALCOHÓLICOS DE LOS TRES TRATAMIENTOS ESTUDIADOS.....	53
3.4.1.	Pruebas de Hipótesis	54
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	55
4.1.	CONCLUSIONES	55
4.2.	RECOMENDACIONES	56
5.	BIBLIOGRAFÍA.....	57

ANEXOS	62
--------------	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Destino de Exportación del Banano	6
Figura 2. Síntesis del Almidón.....	9
Figura 3. Cadena de Amilosa y Amilopectina.....	12
Figura 4. Localización geográfica del cantón El Guabo.....	29
Figura 5. Límites del Cantón El Guabo	30
Figura 6. Curva de calibración (Glucosa).....	34
Figura 7. Diagrama de Flujo de Proceso para la Obtención del Almidón de Banano. .	38
Figura 8. Diagrama de Flujo de Proceso de la Hidrolisis del Almidón de Banano.	40
Figura 9. Diagrama De Flujo de Proceso de la Fermentación Alcohólica del Almidón de Banano.	44
Figura 10. Características físico químicas del banano verde.....	48
Figura 11. Bioconversión de almidón a glucosa.....	49
Figura 12. Actividad de las Enzimas utilizadas en la presente investigación.....	50
Figura 13. Cambios de solidos solubles (°Brix)	52
Figura 14. Cambios de pH registrados durante la fermentación	53
Figura 15. ° Brix vs °GL.....	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Superficie, Producción y Rendimientos Provinciales	6
Tabla 2. Análisis de banano verde: pulpa y cascara (% base húmeda).....	8
Tabla 3. Propiedades a diferentes etapas de maduración.....	13
Tabla 4. Condiciones de operación en las etapas de licuefacción y sacarificación	16
Tabla 5. Tipos de Fermentación.....	17
Tabla 6. Enzimas de uso alimentario	19
Tabla 7. Caracterización físico químicas del banano verde.....	47
Tabla 8. Análisis de varianza (ANOVA) del experimento	51
Tabla 9. Prueba de TUKEY	51

RESUMEN

El presente trabajo de investigación describe la tecnología utilizada para la obtención de alcohol etílico a partir del almidón de banano, así como también las variables para poder determinar con que tratamiento se logra obtener mayor cantidad de alcohol etílico después de la fermentación. Las variables estudiadas fueron: el porcentaje de almidón en la suspensión y el tiempo de hidrólisis con la enzima; se seleccionó estas dos variables porque afectan directamente a la cantidad de azúcares formados (°Brix), los cuales son utilizados por las levaduras para convertirlos en alcohol etílico y gas carbónico. Los factores de estudio son grados alcohólicos, °Brix y pH. La obtención de alcohol etílico consistió en tres etapas. La primera fue la obtención del almidón de banano verde, consiguiendo un rendimiento promedio de 3,1 %. En la segunda etapa con el almidón obtenido se preparó una suspensión para someterla a hidrólisis con la enzima alfa amilasa y glucoamilasa, para convertir el almidón en glucosa. En la tercera etapa se desarrolla la fermentación, durante 30 días; todos los tratamientos permanecieron en fermentación el mismo tiempo, para así poder apreciar las variaciones que se produce por el diferente porcentaje de almidón y tiempo de hidrólisis. Mediante el análisis estadístico de los resultados se determinó que el mejor tratamiento corresponde a la utilización de una suspensión de almidón y un tiempo de hidrólisis con *Glucoamilasa* de 1,5 h, con los cuales se obtuvo la mayor concentración de glucosa 13 % y posterior fermentación para obtener 7,11 °GL. En conclusión es posible la obtención de etanol a partir de la hidrolisis enzimática del almidón a glucosa.

Palabras Claves: Banano, almidón, hidrolisis, fermentación, alcohol etílico.

ABSTRACT

This research describes the technology used for the production of ethyl alcohol from starch banana, as well as variables to determine which treatment is achieved further amount of ethyl alcohol after fermentation. The variables studied were: the percentage of starch in the suspension and time of hydrolysis with the enzyme; these two variables were selected because they directly affect the amount of formed sugars ($^{\circ}$ Brix), which are used by the yeast to convert into ethyl alcohol and carbon dioxide. Study factors are alcoholic, $^{\circ}$ Brix and pH. Ethyl alcohol obtaining consisted of three stages. The first was the production of starch from green bananas, achieving an average yield of 3.1 %. In the second stage with the starch obtained suspension was prepared for subjecting to hydrolysis with the enzyme alpha amylase and glucoamylase, to convert starch into glucose. In the third stage the fermentation takes place, for 30 days; all treatments fermentation remained the same time, in order to appreciate the variations produced by the different percentage of starch and hydrolysis time. By statistical analysis of the results it was determined that the best treatment corresponds to the use of a suspension of starch and glucoamylase hydrolysis time of 1.5 h, with which the glucose concentration increased 13% and subsequent fermentation was obtained for 7.11 $^{\circ}$ GL. In conclusion ethanol production is possible from the enzymatic hydrolysis of starch to glucose.

Keywords: Banana, starch, hydrolysis, fermentation, ethyl alcohol.

INTRODUCCIÓN

En la provincia de El Oro, no existe estudio sobre la obtención de alcohol etílico a partir del almidón de banano, por esta razón, la presente investigación plantea el aprovechamiento de la fruta no apta para exportación (calibre del banano, longitud de los dedos y por manchas en la cascara), a la cual se lo conoce como rechazo ya que no cumple con los parámetros de calidad como lo son: falta de tamaño, grosor, pigmentación de la cascara, el cual es utilizado en alimentación de animales, humanos y en muchas ocasiones se lo desecha en lugares inadecuados para el efecto, generando o produciendo olores desagradables, insectos y roedores, por lo cual se propone la utilización del banano en estado verde en la obtención de alcohol etílico mediante la hidrólisis enzimática del almidón y su posterior fermentación de los azúcares a etanol.

El almidón es obtenido mediante hidrólisis por acción de la amilasa, esta puede ser alfa amilasa o beta amilasa, en el caso de la primera la hidrólisis produce principalmente dextrina y en menor proporción la alfa maltosa. La beta maltosa produce alfa maltosa totalmente debido a que actúa desde el extremo no reductor de la cadena, catalizando la hidrólisis del segundo enlace α -1,4, rompiendo dos unidades de glucosa (maltosa) a la vez (Abadía, 1995).

Con este antecedente si la investigación tiene resultados esperados, el principal beneficiario es el sector agrícola (pequeños y medianos productores), puesto que presentará un gran impacto económico debido a que los agricultores podrían vender todo su excedente de banano después de su cosecha a las industrias, sin tener que desperdiciar el banano que no está en condiciones de ser exportado, lo cual como efecto adyacente, permite contribuir a la conservación del ambiente.

JUSTIFICACIÓN

En el presente trabajo de investigación se evidenciará, en forma clara, la posibilidad de obtener otro subproducto del banano como lo es el alcohol etílico, por esta razón el proyecto es de mucha importancia ya que se daría a conocer una nueva alternativa para el aprovechamiento de la materia prima para obtención de alcohol etílico.

El propósito nos señala iniciar una verdadera línea de investigación en torno a la producción de banano y sus posibilidades de generar nuevos productos.

Existen algunos trabajos relacionados a la elaboración de alcohol etílico y bebidas alcohólicas pero la originalidad de este proyecto es que hay otras materias primas que pueden ser utilizadas para la obtención de alcohol etílico como lo es en este caso, el cual se va a utilizar almidón de banano.

Los beneficios que podría tener la industria son desarrollar nuevos productos, los cuales serían atractivos para el consumidor y abriría nuevos mercados implantando nuevas líneas de producción y a la vez promoviendo la creación de una fuente de trabajo.

Este proyecto es factible ya que presenta un gran impacto económico y ambiental, debido a que los agricultores podrían vender todo su excedente de la cosecha a las industrias sin tener que desperdiciar el banano que no cumpla los parámetros de calidad para ser exportado, o realizar productos artesanalmente con lo que van a tener un mayor ingreso.

OBJETIVOS

General

Obtener de alcohol etílico a partir del almidón de banano (*Cavendish gigante*) en la provincia de El Oro, el Guabo, 2014.

Específicos

- Caracterizar los parámetros físicos químicos del banano verde (*Cavendish gigante*).
- Determinar la actividad enzimática de tres tipos e enzimas.
- Obtener el alcohol etílico mediante hidrolisis enzimática y aplicación de la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*).
- Determinar el grado alcohólico del fermentado obtenido.

Preguntas de Investigación

¿Cuáles son los parámetros físicos-químicos del banano verde?

¿Cuál es la enzima con mayor actividad?

¿Cuáles son las condiciones óptimas para que se lleve a cabo la hidrolisis enzimática fermentación del hidrolizado?

¿Cuál es el grado alcohólico del etanol obtenido?

VARIABLES

Variables independientes

- % de almidón en la suspensión

Variables dependientes

- Grados alcohólicos

HIPOTESIS

Hipótesis nula

Aplicando hidrólisis enzimática del almidón del banano para la obtención de glucosa, **no** es posible la fermentación del hidrolizado mediante la utilización de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, para la obtención de etanol.

Hipótesis alternativa

Aplicando hidrólisis enzimática del almidón del banano para la obtención de glucosa, **es** posible la fermentación del hidrolizado mediante la utilización de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, para la obtención de etanol.

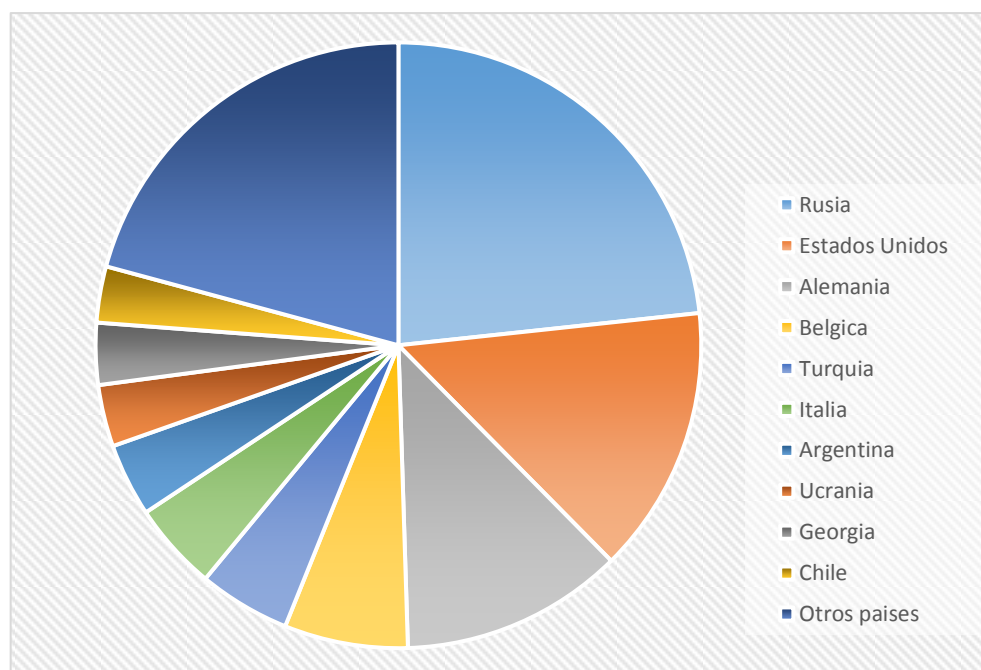
1. MARCO TEÓRICO

1.1. EL BANANO

El banano es una fruta originaria de Asia la cual actualmente tiene gran capacidad de producción en países Sur y Centro Americanos. Los principales países productores de banano son Ecuador, Costa Rica, Filipinas y Colombia. Siendo Ecuador un país líder en las exportaciones de banano en el mundo, logrando un nivel de participación de alrededor de 30 % frente al total de los países exportadores y con una exportación de 4,254.00 toneladas mensuales. Lo cual convierte al banano en fuente básica del desarrollo económico en el país (Magap, 2014). El maíz, el trigo y la papa son las principales fuentes de almidón usadas para propósitos industriales en el mundo (especialmente para las industrias de azúcar y alcohol). Siendo el banano un recurso de fácil acceso en nuestro país, el almidón obtenido a partir de éste lo convierte en una alternativa más para ser usada en la industria. A pesar de que el banano es usado para la exportación, hay una parte de éste que no reúne los requisitos mínimos para ser empacado y exportado, convirtiéndose en fruta de desecho. El banano de desecho con el cual se trabaja en este proyecto, presenta defectos graves o moderados (cicatrices, daño por insectos, dedos cortos, dedos deformes, lesiones por procesos, etc.) y se obtiene del saneamiento en la selección de las calidades mercadeables. La mayoría de esta fruta es destinada para el consumo fresco en los mercados locales y como fuente de materia prima en la industria. El porcentaje de la fruta desechada por la selección depende de operaciones de cultivo, cuidados de la cosecha, condición ecológica imperante, y exigencias del mercado. Este porcentaje puede variar entre un 5 y 10 por ciento del total de fruta procesada (PROECUADOR, 2013).

Siendo la variedad de mayor consumo a nivel mundial (FAO, 2012). Puede ser consumido directamente sin ningún tratamiento, su sabor es dulce, intenso y perfumado, tiene una forma algo curvada y alargada. Su peso varía entre 100 y 120 gramos por unidad. En estado maduro su pulpa es de color marfil y la piel es fina y amarilla, sin embargo cuando se vende en el mercado su piel es verde y luego se vuelve amarilla con la maduración (FOASTAT, 2012).

Figura 1. Destino de Exportación del Banano



Fuente: (FOASTAT, 2012)

A continuación en la tabla 1 se muestra la superficie las plantaciones de banano en las provincias del litoral ecuatoriano.

Tabla 1. Superficie, Producción y Rendimientos Provinciales

PROVINCIAS	Superficie Sembrada (ha)	Superficie Cosechada (ha)	Producción (tm)	Rendimiento (tm/ha)
Los Ríos	63,866	62,536	2,753,724	44,03
El Oro	63,883	62,828	2,269,901	39,37
Guayas	41,775	40,264	1,585,131	36,13
Otros	52,250	45,268	403,486	8,91
Total Nacional	221,775	210,894	7,012,244	33,25

Fuente: (Magap, 2014)

1.1.1. Valor nutritivo del banano

El banano (*Musa sapientum*) se clasifica como un alimento energético alto en humedad, compuesto principalmente de agua, hidratos de carbono y una poca cantidad de proteínas, minerales y grasas.

1.1.2. Composición química del banano

Los componentes químicos de cualquier fruta fluctúan de acuerdo con su variedad, estado de maduración y condiciones ambientales en que se desarrolle. Dado que el banano verde de rechazo producido en Urabá es el objeto de estudio en este caso, es imprescindible conocer su composición química, para contar con información confiable que permita estudiar con certeza el comportamiento químico y biológico de los procesos de producción de etanol a partir de esta fruta.

En este sentido, Fuente especificada no válida. Realizaron análisis a la pulpa y cáscara de bananos verdes producidos en Mindanao (Filipinas) y encontraron que la primera contiene alrededor de 20 % de almidón y la segunda 3,6 % en base húmeda (tabla 2). Por su parte, (Núñez, 2014), encontraron que los niveles de almidón en banano verde son del orden del 20 %, y van disminuyendo hasta 1-2 % en banano completamente maduro, al mismo tiempo los azúcares solubles aumentan de 1 % a 20 %. En este caso la fuente no especificó la correspondencia de estos valores con el objeto, bien sea pulpa, cáscara o ambas; no obstante, a partir de los datos de la tabla 2, se presume que los análisis se hicieron sobre la pulpa.

Tabla 2. Análisis de banano verde: pulpa y cascara (% base húmeda)

Componentes	Pulpa	Cascara	Banano sin pelar
Porción en peso	57,0	43,0	-
Humedad	73,3	91,0	81,0
Azucares reductores	0,16	0,24	0,19
Sacarosa	2,1	2,0	2,06
Polisacáridos fácilmente hidrolizables	26,6	6,64	17,9
Almidón	20,3	3,64	13,1

Fuente: (Iizuka, 1985).

1.1.3. Usos del banano

El banano por ser una fruta completa se la utiliza para diferentes fines:

- Producción de alcohol etílico
- Producción de alcohol carburante
- Harina obtenida del banano verde con cáscara
- Para la elaboración de balanceado para cerdos y aves de corral
- Obtención de jarabe glucosado

1.1.4. Beneficios del consumo de banano verde

Nutricionalmente el banano verde es:

- Buena fuente de fibra
- Vitaminas como C, A, B6 y B9 (ácido fólico).
- Minerales como potasio, fósforo, magnesio, calcio, zinc y hierro.
- Contiene un almidón que pueden ayudar a controlar la glucemia, gestionar el peso y disminuir los niveles de colesterol de la sangre (Núñez, 2014).

1.2. EL ALMIDÓN

El almidón es el principal carbohidrato de reserva, que se encuentra distribuido en los vegetales (granos de cereales, guisantes y tubérculos) que lo sintetizan durante la fotosíntesis en el cual, la luz solar provee la energía para convertir CO₂ y el H₂O en glucosa más oxígeno.

Se halla en forma de gránulos de forma y tamaño característicos de la planta de la cual se obtiene.

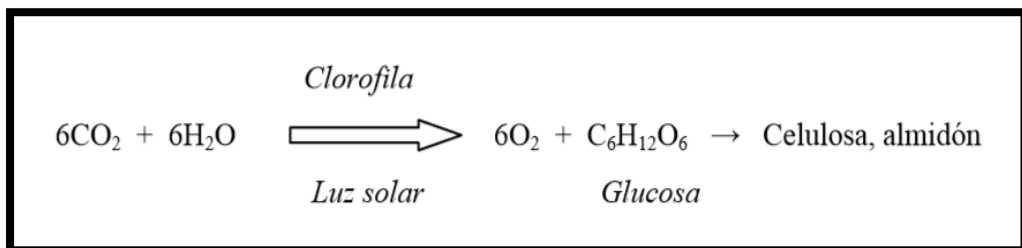


Figura 2. Síntesis del Almidón

Fuente: (Perez, 2002)

1.2.1. Composición química.

“Los gránulos de almidón no son homogéneos sino que están compuestos generalmente alrededor del 20 % de una fracción soluble en agua llamada amilosa, y el 80 % de una insoluble, conocida como amilopectina”. La amilosa es el componente que contribuye a la característica de retrogradación, mientras que la amilopectina es la fracción no gelatificante que contribuye a la viscosidad dando consistencia a los alimentos debido a su alta solubilidad (Morrison & Boyd, 1998).

1.3. EL ALMIDÓN DE BANANO

El almidón es un carbohidrato que posee dos polisacáridos, la amilosa y la amilopectina. El primero se forma de largas cadenas lineales de entre 200 y 2500 unidades de glucosa y pesos moleculares de hasta un millón. Las cadenas lineales se forman de enlaces α -(1,4). Por su parte la amilopectina contiene ramificaciones, con la forma molecular similar a un árbol cuyas ramas se unen por enlaces α -(1,6) localizados cada 15-25

unidades lineales de glucosa. El peso molecular de la amilopectina es muy alto ya que algunas fracciones llegan a alcanzar hasta 200 millones de daltones.

Generalmente los almidones tienen entre 17-27 % de amilosa. Los jarabes de glucosa son producto de la hidrólisis del almidón y todos estos son mezclas de polímeros de D-glucosa. Los jarabes de glucosa se usan de acuerdo a sus diversas concentraciones en varias industrias tales como: panadería, confitería, procesado de frutas, alimentos compuestos, bebidas alcohólicas, misceláneos, bebidas frías, etc. Fuente especificada no válida.. Las reacciones para obtener jarabe de glucosa a partir del almidón pueden ser: Hidrólisis ácida o hidrólisis enzimática. La hidrólisis enzimática en los últimos años ha desplazado a la hidrólisis ácida, debido a que se dispone de nuevas enzimas. La mayor parte de procesos que realizan hidrólisis de almidón usan proceso enzimático. Esto se debe a las ventajas que ofrece el mismo, como lo es el control de la formación de productos no deseables. Entre las enzimas que se usan para la hidrólisis del almidón se tienen la α -amilasa (α 1,4-D- Glucano-hidrolasa) que hidroliza los enlaces glucosídicos α -1,4 de los polisacáridos que poseen 3 o más unidades de D-glucosa. El ataque se hace en forma no selectiva tipo endógeno sobre varios puntos de la cadena simultáneamente, generando polímeros de 3 o más unidades de glucosa (Badui, 2006). La amiloglucosidasa es una exohidrolasa (ataca la última unión glucosídica del extremo no reductor) también conocida como glucoamilasa, que hidroliza los enlaces glucosídicos α -1,4 y α -1,6 de la amilosa y la amilopectina. En el Ecuador, según datos del Banco Central, no existe una producción nacional capaz de satisfacer la demanda requerida de glucosa, forzándose a importar ésta de diversas partes del mundo. En consecuencia la investigación de nuevos recursos para la extracción de derivados del almidón, como lo es el jarabe de glucosa, es una necesidad prioritaria. Por las razones antes expuestas el presente trabajo tiene como objetivo la utilización de los excedentes de exportación del banano (*Musa Cavendish*) para la obtención de un producto de valor agregado como es el alcohol etílico o etanol.

Dado que el banano verde con cáscara tiene alto contenido de almidón y celulosa, se le considera como una materia prima potencial para la industria del bioetanol. El proceso tradicional de producción de alcohol a partir de almidones y celulosa contempla procesos químicos o biológicos (hidrólisis) para su conversión a jarabes azucarados, que

una vez acondicionados se someten a la acción de levaduras que efectúan la fermentación alcohólica.

El etanol resultante es una mezcla de alcohol y agua (generalmente 5-15 % v/v de etanol), estado que impide su utilización directa en motores de combustión, dado que en esas condiciones no es miscible con la gasolina; por lo tanto, esta mezcla se lleva a procesos de destilación y deshidratación hasta obtener alcohol combustible (99,5 % v/v), también denominado alcohol anhidro (Cobana & Antezana, 2007).

El hidrato de carbono que más predomina en el banano, es el almidón. El almidón es el principal polisacárido de reserva de las plantas. Está formado por una fracción lineal (amilosa) y por una ramificada (amilopectina), ambas compuestas por moléculas de D-glucosa. El almidón se encuentra en una gran variedad de tejidos, incluyendo hojas, tubérculos, frutas y semillas (FONACYT, 2010).

1.3.1. Estructura de almidón de banano

En la amilosa las unidades de D-glucosa se presentan como anillos de píranos unidos en α -1,4, la unidad de disacárido que se repite es la maltosa. Ver Gráfico 3. Es un polímero de cadena lineal o recta. El peso molecular de la amilosa varía según su clase botánica, el cuidado puesto en su aislamiento y el método utilizado. La amilopectina, con mayor peso molecular, es un polímero de unidades de D-glucosa de cadenas ramificadas de longitud mediana (24 a 30 unidades por ramificación) con enlaces glucosídicos en la cadena principal del tipo α -1,4 y con enlaces en los puntos de ramificación del tipo α -1,6 formando de esta manera una estructura ramificada.

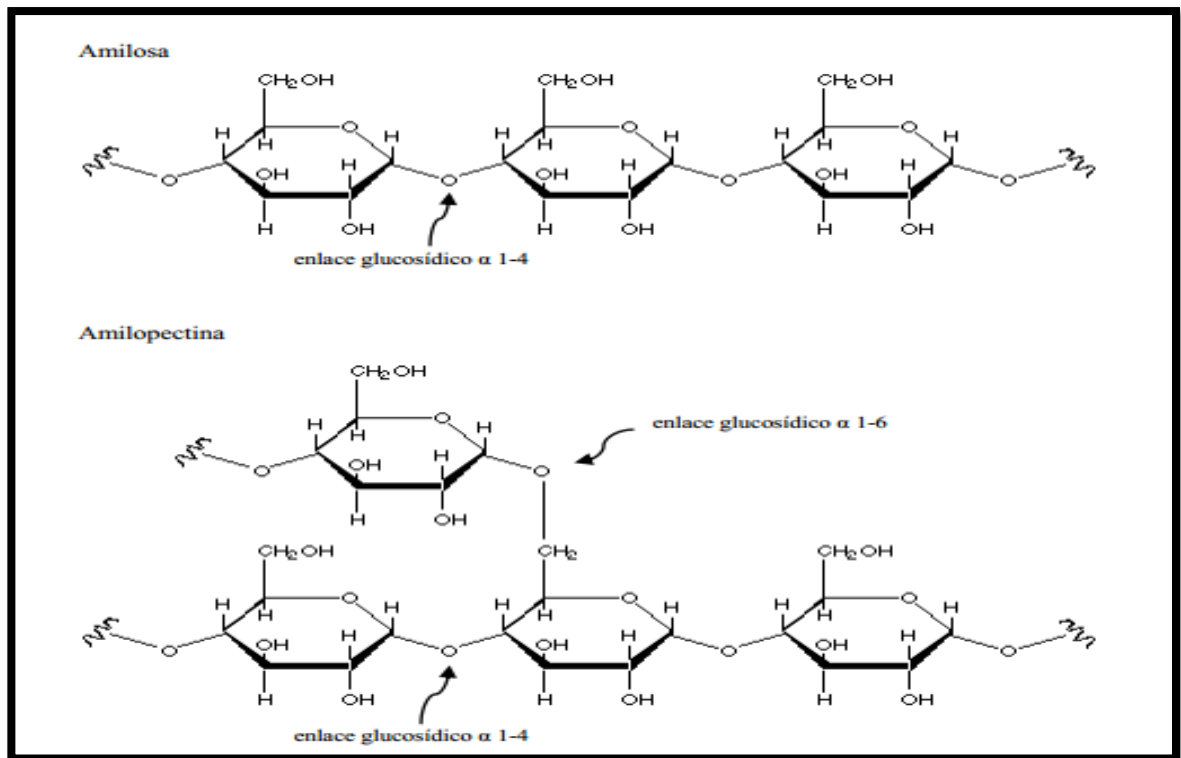


Figura 3. Cadena de Amilosa y Amilopectina

Fuente: (Perez, 2002)

1.3.2. Composición del almidón de banano

Está formado por, una mezcla de dos polisacáridos estructuralmente diferentes, amilosa y amilopectina. La amilosa es una molécula lineal formada por, 250 a 300 unidades de alfa-D-glucopiranososa enlazadas por uniones α -1,4. Mientras que la amilopectina es ramificada, constituida por 1000 a 3000 unidades de glucosa conectadas, por uniones alfa-1,4 y α -1,6, ésta última en los puntos de ramificación. A partir de este hidrato de carbono se obtienen distintos derivados, como la glucosa, las dextrinas y los almidones modificados, todos ellos son ampliamente utilizados en la industria farmacéutica, textil, y alimentaria (Perez, 2002). En una dieta saludable, la mayor parte de energía es conseguida a partir del almidón y las unidades de glucosa en las cuales se hidroliza. Según la FAO, se calcula que anualmente se extraen 60 millones de toneladas de almidón de una gran variedad de cultivos; cereales, raíces, tubérculos, frutos, etc. El banano se destaca por, su gran riqueza en hidratos de carbono de hasta un 21 % (Perez, 2006).

Al aislar diferentes muestras de almidón de banano en estado verde, se encontró que el contenido de almidón en base seca, en la fruta era de hasta 70 % (Bayas, 1999).

A continuación en la tabla 3 se presenta la composición del banano *Musa Cavendish*.

Tabla 3. Propiedades a diferentes etapas de maduración

Etapas	Color Cascara	Almidón (%)	Tamaño del granulo (um)	Azucares reductores (%)	Sacarosa (%)	T° de Gelatinización (°C)
1	Verde	61,7	6-60	0,2	1,2	74-81
2	Verde	58,6	9-66	1,3	6,0	75-80
3	Verde/traza de amarillo	42,4	18-60	10,8	18,4	77-81
4	Mas verde que amarillo	39,8	18-60	11,5	21,4	75-78
5	Mas amarillo que verde	37,6	18-75	12,4	27,9	76-81
6	Amarillo con puntas verdes	9,7	20-80	15,0	53,1	76-80
7	Amarillo	6,3	18-60	31,2	51,9	76-83
8	Amarillo/ pocos puntos marrón	3,3	15-61	33,8	52,0	79-83
9	Amarillo/ muchos puntos marrón	2,6	-	33,6	53,2	-

Fuente: (Magap, 2014).

1.4. HIDRÓLISIS

Es una reacción en la que se rompe un enlace covalente entre dos subunidades por medio de la adición del equivalente a una molécula de agua; se agrega un átomo de hidrógeno a una subunidad y un grupo hidroxilo a la otra.

La hidrólisis de un enlace glicosídico se lleva a cabo mediante la disociación de una molécula de agua del medio. El hidrógeno del agua se une al oxígeno del extremo de

una de las moléculas de azúcar; el OH se une al carbono libre del otro residuo de azúcar. El resultado de esta reacción, es la liberación de un monosacárido y el resto de la molécula que puede ser un monosacárido si se trataba de un disacárido o bien del polisacárido restante si se trataba de un polisacárido más complejo (Vásquez, 2007).

Comprende tres etapas sucesivas cuando se trata de materiales amiláceos: gelatinización, licuefacción y sacarificación. La primera consiste en un calentamiento progresivo de la suspensión de almidón para romper puentes de hidrógeno de las regiones cristalinas y conseguir un hinchamiento de los gránulos de almidón por absorción de agua, estado en el que se tornan susceptibles al ataque mecánico, químico y biológico. En la licuefacción se efectúa una hidrólisis parcial para disminuir el grado de polimerización y obtener equivalentes de dextrosa entre 10 y 12 unidades. Finalmente, en la sacarificación, se completa la hidrólisis en aras de obtener alcohol etílico (Bayas, 1999).

1.4.1. Hidrolisis Acida o por vía química

El proceso se ejecuta en un medio ácido (HCl o H₂SO₄), con altas temperaturas y, en algunas ocasiones, altas presiones.

Uno de los problemas técnicos que presenta dicho proceso es la alta viscosidad aportada por la pulpa y la cáscara, que afectaba la eficiencia del molino de martillos en la etapa de corte y maceración, dado que las fibras de las cáscaras se adherían a las cuchillas causando obstrucción en el proceso (Cornejo, 1993), No obstante, la autora recibió testimonio de un ingeniero químico que participó en el grupo de trabajo de la planta experimental, según el cual dicho problema no fue causado por la viscosidad del sustrato, sino por su deficiente homogeneización en la etapa de maceración, debido a fallas de diseño y montaje del molino requerido para preparar correctamente la pulpa, la cáscara y el vástago, pues aquéllas no se separaban del vástago en las pruebas que se efectuaron.

La alta viscosidad de la mezcla acondicionada también genera problemas de contacto entre el sustrato y el agente químico o biológico usado para sacarificar, lo que causa bajos rendimientos en el proceso. En efecto, múltiples autores recomiendan buscar

alternativas efectivas para disminuir el tamaño de partícula del sustrato (Dobislaw, 1959).

(Chico, 2004) Plantearon un método para evitar la formación de esa sustancia oscura y viscosa que se atribuye principalmente a la acción de las enzimas mono-oxidasas y difenoloxidasas presentes en el banano que catalizan su oxidación y a las pectinas, los polisacáridos que cementan los tejidos vegetales primarios. Su propuesta consistió en calentar los bananos verdes (sin pelar) a 70 °C por 30 min, antes de macerarlos, y agregar enzimas pectinolíticas justo en el proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF por sus siglas en inglés).

El precalentamiento previene el color oscuro de la mezcla y gelatiniza el almidón y las enzimas pectinolíticas causan licuefacción, lo que genera una mezcla con baja viscosidad.

(Vaca, 1981) Estudiaron las condiciones de gelatinización del banano para hidrólisis ácida y encontraron que la adición de ácido previamente a la sacarificación favorece la homogeneización de la mezcla, garantizando disminución en la viscosidad y contacto efectivo entre el ácido y el sustrato. La eficiencia del proceso fue de 89,97 %, en contraste con 65 y 67 % obtenidas por (Cornejo, 1993), respectivamente, en las que no se consideró la etapa de gelatinización.

Vale la pena aclarar que los ensayos de Fuente especificada no válida. Se realizaron a presión atmosférica, y los de (Hernandez, 2007) a 5 atm. Los procesos bajo presión mayor a la atmosférica implican mayores costos por equipos, pero menor consumo de ácido; no se encontraron evaluaciones comparativas de costos; sin embargo, se presume que los primeros son mayores que los segundos y que, por lo tanto, podría ser más económico tener montajes a presión atmosférica.

(Chico, 2004), Realizaron pre ensayos para observar el comportamiento del pH, temperatura (T°) y tiempo de hidrólisis (t), y así determinar las condiciones de experimentación; éstas fueron: pH: 0,8- 1,6; T°: 80-94 °C; y a un tiempo de 600 min. El análisis estadístico reportó un modelo ajustado de primer orden que muestra una tendencia en la que el efecto del pH es mayor que el de la temperatura sobre el porcentaje de conversión de almidones a glucosa (la celulosa queda intacta). En este

caso, disminuir aún más el pH favorecería la conversión; empero, causaría corrosión de equipos y gasto excesivo de ácido, pues en los pre ensayos comprobaron que el gasto de éste se incrementa ostensiblemente cuando se desea disminuir el pH a menos de 1. Aumentar la temperatura en condiciones atmosféricas no es posible, dado que el punto de ebullición de la mezcla se presenta en 95 °C, de acuerdo con los pre-ensayos, así que para aumentar la temperatura es imprescindible cambiar las condiciones de presión. Adicionalmente, los autores evaluaron la posibilidad de mejorar la eficiencia, implementando un sistema de agitación; los ensayos practicados reportaron eficiencias del 94,25 % en 300 minutos.

1.4.2. Hidrolisis enzimática o por vía biológica

La hidrolisis enzimática es el proceso que tiene por objeto la transformación del almidón de las materias primas amiláceas en azúcares. Dicha transformación es catalizada por enzimas, cuya función es romper las moléculas de almidón.

Con enzimas termoestables se lleva a cabo el método convencional realizando primero la licuefacción de almidón, luego la conversión del almidón en glucosa o sacarificación. Mediante la licuefacción, se liberan los gránulos de almidón, pues a consecuencia del calor, éste absorbe agua y se hincha, ocasionando la ruptura de la pared celular, y el almidón se gelatiniza. Al final de este proceso, que tiene una duración de 30 minutos, la masa se licua por la acción conjunta del calor y del fraccionamiento de la alfa amilasa adicionada. En el proceso de sacarificación, mediante la acción de la enzima Glucoamilasa, se da el fraccionamiento de las cadenas de azúcares largos (dextrinas, triosas y maltosa) hasta obtener glucosa.

Las condiciones de operación de las dos enzimas (alfa-amilasa y Glucoamilasa) utilizadas, se presentan en el siguiente cuadro:

Tabla 4. Condiciones de operación en las etapas de licuefacción y sacarificación

HIDRÓLISIS		
Condición	Licuefacción	Sacarificación
T, °C	85-95	55
pH	6,0 -6,5	5,5

Fuente: (Novozymes, 2015).

1.5. FERMENTACIÓN

La fermentación es un proceso biológico en total ausencia de oxígeno, originado por la actividad de algunos microorganismos que procesan los hidratos de carbono (por regla general azúcares, como por ejemplo la glucosa, la fructosa, la sacarosa, el almidón, etc.) para obtener como producto final, un alcohol, el etanol (Díaz, 2010) .

Tabla 5. Tipos de Fermentación

TIPO DE FERMENTACION	MICROORGANISMO	PRODUCTO FINAL
Fermentación Láctica	Streptococcus, lactobacillus y bacillus	Ácido láctico
Fermentación Alcohólica	Saccharomyces	Etanol y CO ₂
Fermentación Propionica	Anaerobios	Ácido propionico, ácido acético, CO ₂ y H ₂
Fermentación Formica	Enterobacterias	Ácido láctico, ácido fórmico y butanodiol.
Fermentación Butírica	Clostridium	Acido butírico y butanol
Fermentación Mixta	Escherichia Salmonella	Ácido láctico Ácido acético

Fuente: (Díaz, 2010).

1.5.1. Fermentación alcohólica

El alcohol etílico es el componente principal de la bebidas alcohólicas, el sabor especial de la bebida no se debe al alcohol etílico, sino a otras sustancias características de las fuentes específicas o añadidas de liberadamente (Morrison & Boyd, 1998).

Para la producción de etanol a partir de material amiláceo, es necesario realizar pre-tratamientos que faciliten la conversión de los polisacáridos de la materia prima a

monómeros de azúcares para el proceso de fermentación. Estos tratamientos sobre la biomasa son el objeto de estudio de esta investigación.

La partición de polisacáridos en carbohidratos de menor tamaño se denomina hidrólisis y se realizó este proceso por vía enzimática para material amiláceo del fruto de la planta del banano (García, 2008).

La fermentación alcohólica es la transformación de sustratos azucarados por la acción de microorganismos, que durante su ciclo de vida consumen el sustrato y fabrican etanol y otros compuestos bioquímicos, como resultado de su metabolismo (Lucas, 1994).

La levadura utilizada tradicionalmente en la fermentación alcohólica ha sido la *Saccharomyces cerevisiae*, sin embargo, los avances en biotecnología han permitido reconocer otros microorganismos con facultades similares o mejoradas, v.g. la *Zymomonas mobilis*.

1.5.1.1. Factores que influyen en la fermentación alcohólica

Existen diversos factores tanto físicos como químicos que inciden positiva o negativamente en el transcurso de la fermentación alcohólica, ya sea actuando sobre el desarrollo de las levaduras, ya sea incidiendo directamente sobre la propia fermentación alcohólica. (Nahum, 2008). Los más relevantes son los siguientes:

La temperatura.- A mayor temperatura la fermentación alcohólica transcurre más rápidamente, sin embargo es menos pura. Se produce menos etanol y más cantidad de compuestos secundarios que a menudo no conllevan mejora de la calidad del vino. Por otro lado las levaduras tienen en los 30 °C su temperatura óptima de desarrollo. Por encima de los 35 °C la actividad decrece rápidamente y en torno a 45 °C mueren.

El oxígeno.- Aunque la fermentación alcohólica es un proceso anaeróbico las levaduras mantienen una leve respiración utilizando para ello el oxígeno combinado a moléculas del mosto.

Los nutrientes.- Por un lado están los azúcares, que son fuente de carbono y de energía para las levaduras y que deben encontrarse en concentración superior a 20 g/L para que la fermentación alcohólica transcurra a su velocidad máxima.

Por otro están las sustancias nitrogenadas, las sales y los factores de crecimiento (vitaminas) que normalmente se hallan en el mosto en concentración suficiente para el desarrollo de las levaduras. Sin embargo en casos de vendimias atacadas de podredumbre en las que los mohos han consumido parte de estos nutrientes, puede ser necesario adicionar al mosto complejos vitamínicos y sales de amonio.

Los compuestos químicos de acción negativa.- Por un lado la acumulación de los propios productos de la fermentación alcohólica pueden ralentizarla. Por otro lado, esos mismos compuestos junto a otros presentes en el mosto de forma natural (taninos) o artificial (pesticidas, SO₂, etc.) pueden actuar como inhibidores del crecimiento de las levaduras.

Tabla 6. Enzimas de uso alimentario

Enzima	Fuente principal	Reacción catalizada	Aplicaciones
Amilasa	<i>Aspergillus</i>	Almidón azúcar	Cervecería, producción de jarabes
Pectinasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sacarosa glucosa + fructosa	Preparación de zumos de frutas concentrados
Cuajo	<i>Endothia, Mucor</i>	Coagulación de la caseína	Producción de queso (ayuda a que se forme la cuajada)
Proteasas	<i>Bacillus, Aspergillus</i>	Hidrólisis de proteínas	Ablandamiento de carnes
Diacetil reductasa	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Eliminación de grupos diacetil	Prevención de ciertos olores en cervezas y zumos
Lactasa	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Lactosa galactosa + glucosa	Digestión de la lactosa en la (para personas intolerantes a la lactosa). Prevención de cristalización de la lactosa en helados
Naringinasa de	<i>Aspergillus niger</i>	Eliminación de la	Eliminar el sabor

frutas		naringina	amargo del zumo de naranja
Oxidasa de la glucosa leche	<i>Aspergillus niger</i>	Glucosa ácido glucónico	Prevención de pardeamiento de huevos deshidratados
Isomerasa de la glucosa	<i>Bacillus, Arthorbacter</i>	Glucosa fructosa	Preparación de jarabes muy dulces

Fuente: (Chaplin, 2004).

1.5.2. Microorganismos Utilizados en la Obtención de Etanol

Tradicionalmente se han empleado las levaduras de las especies *Saccharomyces cerevisiae* y *S. saccharum*; en cambio, en cambio en otros casos a veces proponen el uso de ciertas bacterias, como *Zymomonas spp* que son especies mejoradas.

Las levaduras son microorganismos que se encuentran dentro de los hongos. Como tales, son incapaces de emplear la fotosíntesis para su alimentación; no poseen flagelo por lo que las células individuales son inmóviles entre sí. Son capaces de transformar los hidratos de carbono en alcohol con desprendimiento de anhídrido carbónico. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* permite una conversión aproximada del 85 % al cabo de 32 horas y del 90 % al cabo de 75 horas en la producción de etanol. Este microorganismo tiene un porcentaje en peso de carbono del 45 %, de oxígeno del 30,6 %, de hidrógeno del 6,8 %, y de nitrógeno del 9 % (Abadía, 1995).

1.5.2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Es una de las más importantes en enología ya que es la responsable de la fermentación de la mayor parte de los azúcares del mosto. Su poder alcoholígeno es elevado (17 °GL) y es bastante resistente al SO₂ (250 mg/L).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo ascomiceto que ha sido ampliamente estudiado dada su importancia en la industria panadera y vitivinícola, así como por su capacidad de producir etanol. Este microorganismo muestra cinco fases de crecimiento bien definidas cuando es cultivado en medios líquidos con glucosa como fuente de carbono: la fase logarítmica, el cambio diáuxico, la fase postdiáuxica y la fase

estacionaria. La fase logarítmica es un periodo de adaptación en el cual la célula se prepara para dividirse. Durante la fase logarítmica las células alcanzan su máxima velocidad de duplicación y llevan a cabo un metabolismo fermentativo del que se produce etanol.

Al disminuir la concentración de glucosa, las células atraviesan por el cambio diáuxico, un periodo breve de tiempo en el cual no hay división, y la célula cambia de un metabolismo fermentativo a uno respiratorio. En la fase postdiáuxica las células usan como fuente de carbono el etanol producido durante la fase logarítmica e incrementan su resistencia al estrés gradualmente; en tanto que la fase estacionaria se presenta cuando los nutrientes del medio se han agotado y no hay división celular (Latorre, 2008).

1.5.2.2. Morfología

La *Saccharomyces cerevisiae* se clasifica de la siguiente manera (Latorre, 2008):

Reino: Fungí

Filo: Ascomycota

Clase: *Hemiascomycetes*

Orden: *Saccharomycetales*

Familia: *Saccharomycetaceae*

Género: *Saccharomyces*

Especie: *S. cerevisiae*

1.5.2.3. Metabolismo

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* desarrolla dos tipos de metabolismo que son metabolismo oxidativo y metabolismo fermentativo. Pero solo produce etanol en condiciones de crecimiento anaerobio (fermentativo). Por consiguiente, y en general, al preparar un cultivo industrial debemos saber (metabolismo oxidativo) en qué

condiciones metabólicas se produce lo que nos interesa fabricar (metabolismo fermentativo), controlar la fermentación para que se produzca en esas condiciones deseados (Latorre, 2008).

1.5.3. Alfa-amilasa

La α -amilasa, también conocida como α -1,4 glucanohidrolasa; EC 3.2.1.1 es una glucanasa endoactiva que catalizan la hidrólisis al azar de los enlaces α -(1,4) glicosídicos de la región central de las cadenas de amilosa y amilopectina excepto en las proximidades de los puntos de ramificación. (Chaplin, 2004), reportó que la velocidad de hidrólisis es más lenta en los enlaces cercanos a los puntos de ramificación. La hidrólisis de la amilopectina por esta enzima produce glucosa, maltosa y una serie de dextrinas que contienen enlaces ramificados conformados por 4 o más residuos de moléculas de glucosa que presentan enlaces α -1,6 provenientes de las uniones glucosídicas de la estructura original. Los productos obtenidos en mayor concentración son maltosa, maltotriosa y maltopentosa, hidrolizando completamente la maltohexosa (Chaplin, 2004). El peso molecular reportado para la α -amilasa proveniente de *Bacillus Licheniformis* se encuentra alrededor de los 60 kDa. El alfa-amilasa actúa entre 67,5 - 72,5 °C y pH de 5,7.

La acción de la enzima alfa-amilasa radica en desdoblar el almidón en moléculas más pequeñas llamadas dextrinas. Este rompimiento gradual da origen a los siguientes compuestos, en su orden:

Dextrinas: moléculas compuestas por 6 a 100 unidades de dextrosa.

Amilodextrinas: compuesta, aproximadamente, por 50 unidades de dextrosa.

Eritrodextrinas: compuesta, aproximadamente, por 30 unidades de dextrosa.

Acrodextrinas: hasta 20 unidades de dextrosa.

Megalosacáridos: azúcares de 10 -20 unidades de dextrosa.

Oligosacáridos: azúcares de 4-9 unidades de dextrosa.

Maltotetrosa: cuatro unidades de dextrosa.

Maltotriosa: tres unidades de dextrosa.

1.5.4. Glucoamilasa

La glucoamilasa es una enzima hidrolítica del grupo de las amilasas, también conocida como amiloglicosidasa, su nombre sistemático es 1,4-alfa-D-glucano glucohidrolasa. Es una de las enzimas más estudiadas debido a su influencia directa en la degradación del almidón, uno de los productos alimentarios más explotados a nivel mundial.

Mejorar la actividad hidrolítica de la glucoamilasa y su capacidad desramificante sobre los enlaces α -1,6 de la molécula del almidón por técnicas de mutagénesis dirigida y aleatoria. Para ello se construyen diferentes plásmidos.

Las cadenas de almidón están compuestas por dos grandes sub-cadenas, amilosa y amilopectina. La función de la glucoamilasa es actuar en la reacción de hidrólisis en cadenas de polisacáridos rompiendo los enlaces 1,4-alfa-D-glucosa que se encuentran de manera residual en las cadenas después de haber sido digeridas por alfa y beta amilasas. El principal producto final de la acción de la glucoamilasa sobre el almidón es glucosa, lo que la diferencia de la alfa y beta amilasas.

Su actividad es máxima entre pH 4 - 5,5 y temperatura alrededor de 55 – 65 °C, es producida extracelularmente por numerosos tipos de hongos y algunas bacterias, aunque la principal fuente de esta enzima son los hongos filamentosos donde destaca el género *Aspergillus*. También se han utilizado algunos cultivos de bacterias (*Bacillus coagulans* y *Lactobacillus brevis*) y levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* y *Sacharomycopsis figuligera*) aunque la baja producción dificulta su comercialización.

1.6. SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA (SSF)

El proceso de fermentación y sacarificación simultánea (SSF) por sus iniciales en inglés, fue diseñado por la compañía Gulf Oil Company, y se trata de la hidrólisis enzimática de la celulosa llevada a cabo en presencia de microorganismos

fermentadores (Malgoire JY, Bertout S, Renaud F, Bastide JM, Mallié M, 2005). Este proceso se realiza en un solo contenedor y las condiciones son adaptadas para maximizar el buen desempeño de las enzimas y de los microorganismos. Las enzimas funcionan idealmente en condiciones ácidas (pH 4-5) y altas temperaturas (40-50 °C).

Las condiciones óptimas de los microorganismos fermentadores son de pH neutro (pH 5,2-7) y temperaturas moderadas (30-40 °C). Este proceso ha generado hasta 40 g de etanol por cada litro de medio, usando bagazo de caña como materia prima. La efectividad de este proceso se basa en que las enzimas celulolíticas no son inhibidas por los monómeros de glucosa ya que estos son consumidos inmediatamente por los microorganismos (Chico, 2004).

1.6.1. Efectos internos y externos

El comportamiento de un microorganismo en crecimiento es el resultado de la interacción que se produce entre el microorganismo y el medio ambiente en el reactor, y que en rigor es el resultado de los llamados efectores intra y extracelulares.

Los efectores internos están representados por la dotación genética intrínseca del organismo considerado y por sus mecanismos de regulación metabólica. Estos últimos pueden ser modificados por alteraciones del medio ambiente o más precisamente por los efectores externos mientras que la existencia de un gen depende de la especie del microorganismo considerado. Un gen está o no está, sólo su expresión puede modificarse. Con el fin de mejorarla productividad de un proceso de fermentación las cepas empleadas pueden someterse a tratamiento físico o químico de mutación que al alterar algún sector del genoma logran aumentar la producción de un metabolito aunque también pueden disminuirla o incluso suprimirla (Halasz & Laszlity, 1991).

1.7. MATERIAS PRIMAS UTILIZADAS EN LA FERMENTACIÓN

1.7.1. Solución o caldo nutritivo

Suelen usarse diversas materias primas como solución nutritiva, lo importante es que contengan los elementos indispensables para conservar la vida de los microorganismos; ellos son los carbohidratos, nitrógeno y sales adecuadas propias para cada organismo. Estas materias primas se clasifican en:

- **Materias amiláceas:** tales como los cereales que contienen almidón, tubérculos y raíces.
- **Materias azucaradas:** como los mostos y jugos de diferentes frutas, como la caña de azúcar, remolacha y subproductos de la industria azucarera como melazas y mieles.

En la práctica que se realizará en el laboratorio se empleará la melaza de caña como sustrato. Cuando la cristalización de las sustancias de la industria azucarera es ya imposible, se separan los cristales y el líquido oscuro que fluye con un contenido aproximadamente 50 % de azúcar, se denomina melaza.

La composición de las melazas de caña de azúcar varía de un lugar a otro, de acuerdo a la conformación y elementos constituyentes del suelo de cultivo. Por ejemplo se tiene el análisis:

- Sacarosa: 40–45 %
- Azúcares Reductores: 10–15 %
- No azúcar: 10–12 %
- Sustancias minerales: 7–10 %
- Nitrógeno Total: 0,3 %

1.7.2. Relación carbono/nitrógeno

El contenido de nitrógeno, al igual que el contenido de la fuente de energía o carbono, son de mucha importancia en la fermentación. El nitrógeno es necesario para la generación de proteínas constituyentes de las células, es decir de la levadura. Este nitrógeno es adicionado al medio de cultivo como urea cuando el etanol que se va a producir no es de consumo humano; de lo contrario, se recomienda utilizar di fosfato de amonio (DAP) como fuente de nitrógeno (Chico, 2004).

1.7.3. Características principales de los cultivos microbianos utilizados en la fermentación alcohólica

Diferentes investigadores han realizado evaluaciones de cepas alcoholeras de levadura atendiendo a varios aspectos tales como:

- Tolerancia al etanol,
- Tolerancia a las altas temperaturas
- Tolerancia a altas concentraciones de azúcar,
- Rendimiento alcohólico,
- Eficiencia en la fermentación y productividad

1.7.3.1. Tolerancia al etanol

La tolerancia al etanol es un elemento importante en la selección de una cepa de levadura, pues de su capacidad de mantenerse activa en condiciones crecientes de concentración alcohólica en el medio dependerá el rendimiento del proceso.

Estudios en cuanto a la tolerancia al etanol, usando concentraciones de etanol desde 0 a 12 % (v/v), reportan resultados en porcentaje alcohólico y eficiencia en la fermentación superiores a 7 °GL y 80 % respectivamente. Las levaduras utilizadas fueron de la especie *S. cerevisiae*.

1.7.3.2. Tolerancia a la alta temperatura

Muchas levaduras son sensibles a la temperatura; si ésta se eleva, la productividad puede disminuir; los sistemas de enfriamiento son caros, por lo que hay una razón económica para desarrollar cepas termo tolerantes, que trabajen a temperaturas por encima de 40 °C sin pérdidas en la eficiencia, y que a la vez mantengan la estabilidad genética.

1.7.3.3. Tolerancia a la alta concentración de azúcares

Trabajar con altas concentraciones de azúcares produce mayor eficiencia y productividad del proceso fermentativo. Se reporta que la cepa de levadura *S. cerevisiae*, aislada del jugo de caña, posee alta tolerancia a la concentración de azúcares y a la temperatura, con elevada producción de bioetanol.

Se han realizado experiencias con cepas osmofílicas de *S. cerevisiae*, en la fermentación del mosto a 26 °Brix y se han alcanzado concentraciones de alcohol del orden de 11,4 % v/v (Díaz, 2010).

1.8. PROCESOS TECNOLÓGICOS PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL

El proceso para la producción de etanol por vía fermentativa tiene dos etapas fundamentales: la fermentación y la destilación.

La fermentación es la etapa principal del proceso, no solo porque en ella se produce el etanol, sino porque se reproduce la masa fundamental de levadura y además por formarse aquí los productos secundarios.

En la etapa fermentativa se emplean diferentes tipos de nutrientes. Como por ejemplo los más utilizados en Cuba son urea y sulfato de amonio como suministradores de nitrógeno; como aportador de fósforo se emplea el fosfato dibásico o simplemente fosfato de amonio. (Cornejo, 1993).

2. METODOLOGÍA

2.1. LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN

La investigación se la realizó la Universidad Técnica de Ambato, en el Laboratorio de Investigaciones.

Latitud 3°17'07.19" Longitud 79°54'46.17"

2.1.1. Universo y muestra

El universo de la presente investigación fue obtenida de la hacienda “LA LUCHA” ubicada en el sitio Sabalucal del cantón el Guabo provincia de El Oro, de aquí se recolecto la muestra objeto del estudio. El tipo de muestreo realizado fue aleatorio simple.

2.1.2. Ubicación geográfica.

El Guabo, cantón de la Provincia de El Oro. Se encuentra al noroeste de la Provincia de el Oro, su fecha de cantonización es el 7 de Septiembre de 1978, Su clima es moderado cálido con temperaturas que oscilan entre los 22 °C a los 30 °C, Tiene una extensión de 498 Km², Una población de 50.009 habitantes.

2.1.3. Ubicación Astronómica.

- 509 km a Quito
- 158 Km a Guayaquil
- 228 km a Loja
- 18 km a Machala

Figura 4. Localización geográfica del cantón El Guabo



Fuente: (GADG, 2014)

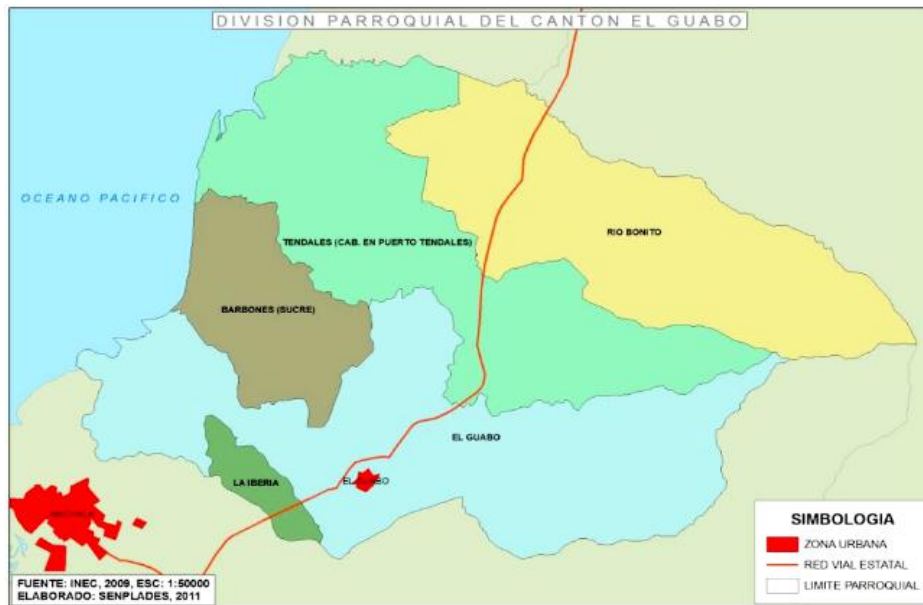
2.1.3.1. Límites

- Norte: Con la Provincia del Guayas (Cantón Naranjal).
- Sur: Con los cantones Machala y Pasaje.
- Este: Con la Provincia del Azuay (Cantón Camilo Ponce Enríquez) y Cantón Pasaje.
- Oeste: Con el Océano Pacífico (Golfo de Guayaquil).

2.1.3.2. Extensión

El cantón El Guabo comprende una superficie de extensión: 498 km² y está ubicada a 4 m sobre el nivel del mar.

Figura 5. Límites del Cantón El Guabo



Fuente: (GADG, 2014)

2.1.3.3. División Política

El Cantón El Guabo está dividido políticamente en cinco parroquias urbanas y por tres rurales:

- **Parroquias urbanas:**
 1. El Guabo (cabecera cantonal)

- **Parroquia rural:**
 1. Barbones
 2. La Iberia
 3. Tendaes

4. Río Bonito.

2.2. METODOLOGÍA Y PROCEDIMIENTO

2.2.1. Tipo de investigación

La investigación es un trabajo descriptivo, exploratorio y experimental.

2.2.2. Diseño de investigación

El diseño de la investigación es de carácter descriptivo (describe situaciones porque observamos y definimos el tratamiento que resulte estadísticamente significativo en la obtención de glucosa a partir de almidón de banano) experimental (Se realizó dos fermentaciones, correspondientes a un diseño experimental completamente al azar, resultantes de considerar dos factores [concentración de sustrato y concentración del inóculo y tres niveles para cada factor]).

El modelo estadístico es un experimento completamente al azar en condiciones de temperatura ambiente de la ciudad de Machala (28 – 30 °C), en donde por cada factor se multiplicó los tres niveles evaluados dando así un total de 9 tratamientos. Cada tratamiento tuvo tres repeticiones dando un total de veintisiete hidrolizados de almidón de banano.

Se prepararon medios de cultivo (almidón de banano y agua potable) a concentración de 20 % en Erlenmeyer de 1000 mL, luego se esterilizaron a 121 °C por 15 min, se trasvasaron en birreactores de 1000 ml de capacidad y se inóculo con la *Saccharomyces cerevisiae* en concentraciones de (0,2-0.4 y 0,6 g/L), inicialmente se varió la concentración del inóculo, manteniendo la concentración inicial de sustrato en un valor constante de 15 % posteriormente se varió la concentración de sustrato manteniendo la del inóculo. Esto dio como resultado que se realizara 9 tratamientos.

El pH se mantuvo entre 2 – 8,5 que es el rango de acción de la *Saccharomyces cerevisiae*. La agitación se realizó a 110 rpm por 30 minutos empleando un agitador magnético a temperatura ambiente 22 a 30 °C.

Después de la hora 12 se tomaron muestras del medio cada 12 horas. Las muestras tomadas fueron inmediatamente centrifugadas, el líquido sobrenadante se utilizó para determinar la concentración de glucosa.

La recuperación de la glucosa se la realizó mediante la filtración del hidrolizado en tela lienzo previamente esterilizada. En el proceso de fermentación de la glucosa resultante de la hidrólisis enzimática del almidón de banano, se aplicó la tecnología existente la que consiste en agregar de 1,5 y 3 gramos de levadura liofilizada a 1 litro de hidrolizado a temperatura ambiente por 24 horas tiempo suficiente para la bioconversión de glucosa en etanol, para lo cual se realizó el control de los °Brix del hidrolizado y el incremento de los grados de alcohol del mismo. La etapa de hidrólisis enzimática provoca la ruptura de los polímeros de la amilopectina, obteniéndose los monómeros respectivos. La hidrólisis completa del almidón da exclusivamente el monómero D-glucosa (Latorre, 2008).

2.3. CONDICIONES DE LA HIDRÓLISIS

2.3.1. Hidrólisis Enzimática del almidón de Banano.

Las muestras de del almidón de banano fueron sometidas a fraccionamiento mecánico de diferentes tamaños de partículas, se seleccionó y acondicionó en concentración de sustrato de 20 % (p/v), se sometieron a esterilización en un autoclave marca BOECO (modelo 25 X-1) a 121 °C por 15 minutos. Luego de 1,5 horas de hidrólisis se determinó la concentración de glucosa total (glucosa) por espectrofotometría UV visible con una longitud de onda de 540 nm.

2.3.2. Protocolo de Hidrólisis Enzimática del almidón de banano

La hidrólisis se realizó utilizando como medio de cultivo el almidón de banano humectada con agua en porcentaje de 20 % (p/p). Para el efecto se preparó un vaso de precipitación con 250 de capacidad, se le adiciono 80 ml de agua potable, se llevó esto a un agitador electromagnético marca IKA (MODELO C-MAG HS 7) y se le agrego 10

gramos de almidón de banano periódicamente, hasta que se disuelva completamente, una vez disuelto se le agrego la enzima *Termamyl* (α -amilasa termoestable). Luego el vaso fue llevado a calentamiento en aceite comestible a una temperatura de 90-95 °C, se hizo esto con el fin de que la enzima se active y empiece a degradar el almidón en glucosa, una vez solubilizado el almidón se lo retiro del baño de aceite y se lo dejo enfriar a temperatura ambiente (20 °C).

El hidrolizado contenido en el Beaker se lo paso en dos tubos de centrifuga con pesos iguales, a uno se lo centrifugo luego de centrifugarlo se separó los sólidos insolubles de los sólidos solubles, los sólidos insolubles que quedaron en el tubo fueron llevados a una estufa a 40 °C por 24 horas, para luego ser pesados y verificar que cantidad de sólidos insolubles se estaban quedando por ml de hidrolizado.

Los dos tubos con hidrolizado de banano, uno centrifugado y el otro sin centrifugar, se les procedió a inocular con levadura activa seca de la marca comercial Levapan (*Saccharomyces cerevisiae*) para su fermentación por 24 horas y medir la concentración de etanol por cromatografía de gases.

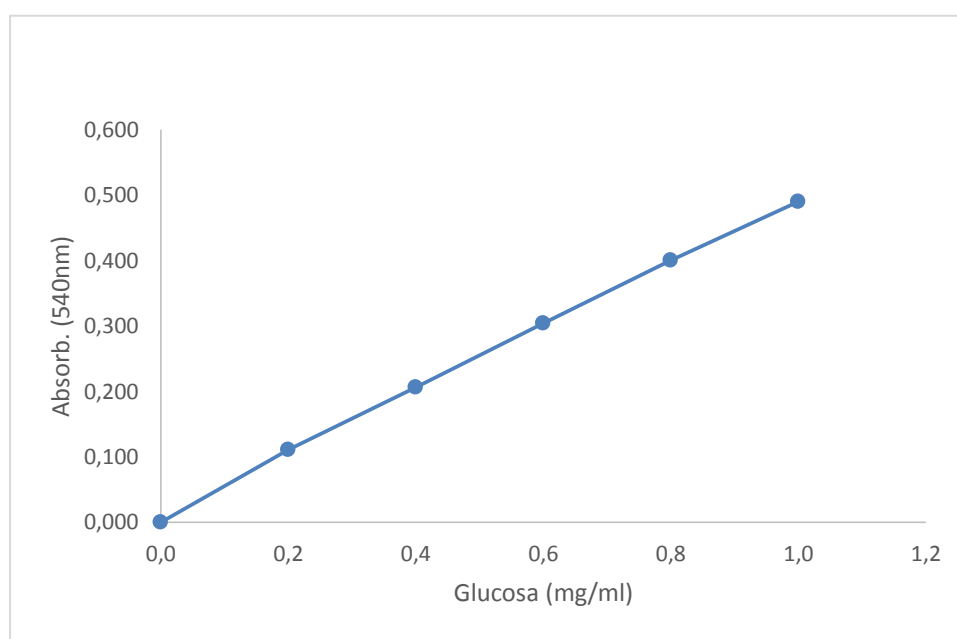
2.4. MÉTODOS ANALÍTICOS UTILIZADOS

2.4.1. Obtención de la curva de calibración (Glucosa)

Se etiquetó seis tubos de ensayo (15 mL) con letras de la A, B, C, D y E. En cada tubo etiquetado, luego se pipeteó los volúmenes de solución estándar de glucosa y agua destilada en 5 distintas concentraciones.

1. Etiquetar y llenar seis tubos de muestra tal y como se especifica en la tabla 6
2. Calentar los tubos de medida y sus contenidos en agua hirviendo durante 5 min. El reactivo DNS reacciona con los azúcares presentes, generando un producto rojo-marrón.
3. Enfriar los tubos de medida, añadir 6 ml de agua destilada a cada tubo y agitar bien.
4. Usando espectrofotometría UV visible (540 nm), medir la absorbancia de cada solución.

Figura 6. Curva de calibración (Glucosa)



Fuente: Espinoza, 2015.

2.4.2. Determinación de azúcares reductores

La determinación de azúcares reductores totales (glucosa) fue llevada a cabo mediante el método de ácido 3,5 – dinitrosalicílico por espectrofotometría UV visible con glucosa como estándar (Miller 1995, A.O.A.C.13.28).

Para la cuantificación de los azúcares reductores se realizó una curva de calibración con glucosa calculándose la recta de mejor ajuste por el método de los cuadrados cuya ecuación es $y = 0,1928 X - 0,020459$, y el coeficiente de correlación de $R^2 = 0,989$ (A.O.A.C. 920, 44).

2.4.2.1. Desarrollo de la reacción del DNS

En tubos de cristal de 10 mL se adicionan 0,5 mL de muestra y 0,5 mL del reactivo de DNS. Los tubos se colocan en baño de agua a 100 °C por 5 min. Se enfrían hasta temperatura ambiente y se le añade 5 mL de agua destilada. Se agita y se realiza la lectura a 540 nm en espectrofotómetro (Bello, Carrera, & Díaz, 2006).

2.4.3. Determinación del pH

La determinación del pH se la realizara filtrando el hidrolizado e introduciendo el electrodo del equipo Multiparámetro (pH/ISE/CONDUCTIVIDAD/DO) TIPO OAKTON A329 digital (A.O.A.C. 32,016).

2.4.4. Determinación del Oxígeno Disuelto

La determinación del oxígeno disuelto se la realizó tomando una alícuota de 100 mL de hidrolizado e introduciendo el electrodo del equipo Multiparámetro (pH/ISE/CONDUCTIVIDAD/DO) TIPO ORION STAR A329 digital (A.O.A.C. 20.013).

2.4.5. Determinación de Etanol

Las concentraciones de etanol en el fermentado del hidrolizado se analizaron utilizando el Cromatógrafo de gases FULI 9790 II, patrones etanol con tiempo de retención de 1,300 min respectivamente, utilizando una columna FULI Carbohydrates Ca, con agua como eluyente, temperatura de 90 °C, volumen de muestra de 10 µL, flujo de 0,5 mL/min, presión en la columna de 1,070 ± 0,10 psi y sistema de detección de índice de refracción (A.O.A.C. 9.107).

2.5. RECURSOS EMPLEADOS

2.5.1. Recursos Humanos

El investigador

Tutor

Ayudantes

2.5.2. Recursos Físicos

Para la obtención de etanol se utilizaron los siguientes materiales: almidón de banano (*Cavendish gigante*), la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y agua purificada.

2.5.2.1. Equipos

- Espectrofotómetro HACH DR 3900
- Gas Chromatograph FULI 9790 II
- Multiparámetro (pH/ISE/CONDUCTIVIDAD/DO) TIPO ORION STAR A329 digital.
- Balanza Analítica marca ZHIMADZU
- Cubetas o blísteres 10 mL
- Micro pipetas 1000 µL
- Matraces aforados de 100 mL
- Tubos de medida de 10 mL
- Balanza semi analítica marca ZHIMADZU
- Baño de agua marca Boeco
- Estufa marca Boeco
- Termobalanza
- Agitador magnético marca Boeco
- Molino de bolas de fabricación nacional
- Bioreactores experimentales de 1000 mL

2.5.2.2. Materiales de Laboratorio

- Vasos de precipitación de 500mL
- Tubos de ensayo con tapa
- Cápsulas de porcelana 120 mm
- Crisoles 30 mm
- Embudo de filtrado rápido de 60 mm
- Desecador

- Pipetas graduadas de 10 mL
- Pipetas volumétricas 10 mL
- Bureta de 25 mL
- Matraz Erlenmeyer de 250 y 500 mL
- Papel filtro Whatman # 40

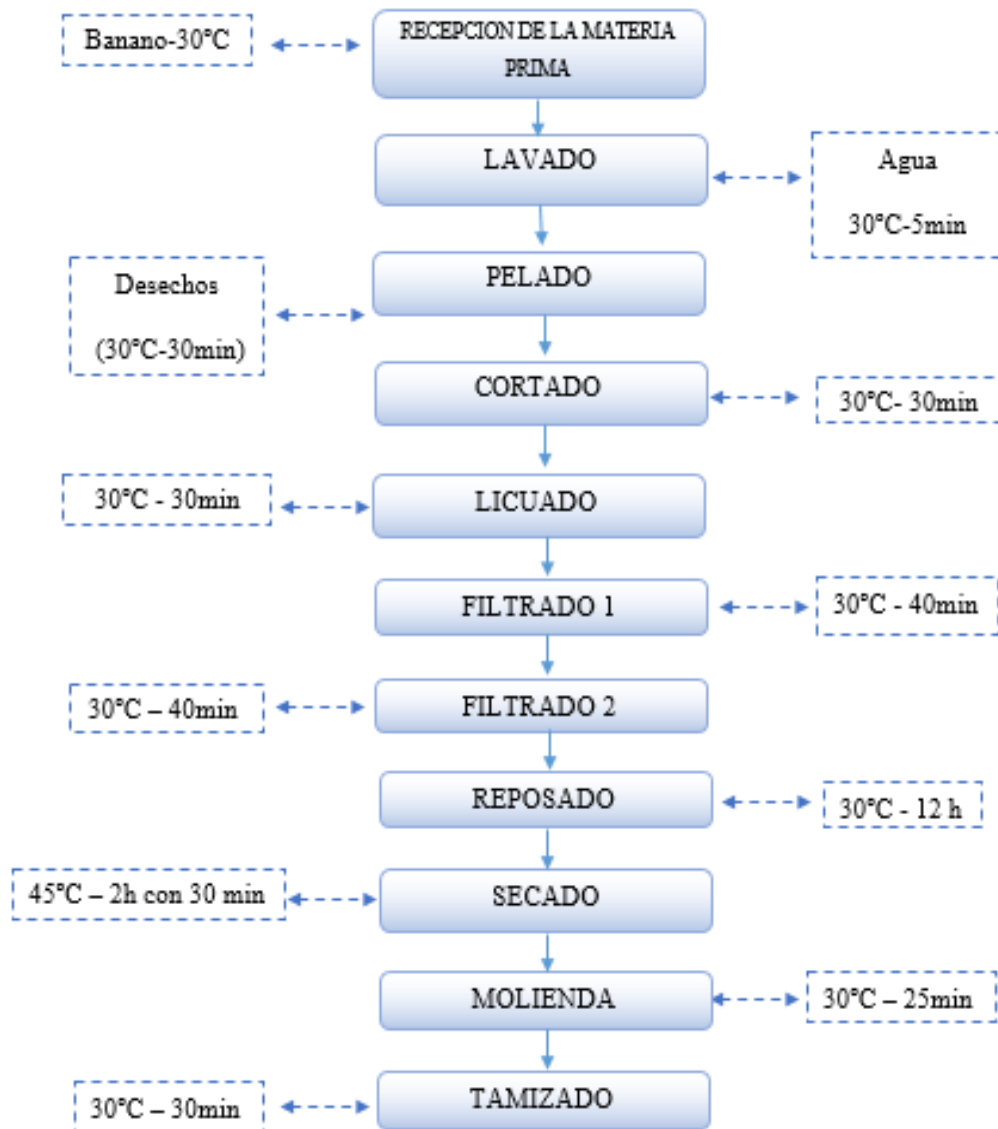
2.5.2.3. Reactivos

- Levadura liofilizada: *Saccharomyces cerevisiae*
- Muestras de hidrolizado de banano
- Reactivo DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico)
- Solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4) (aproximadamente 2 moles/l)
- Solución de hidróxido de sodio (NaOH) (10 % en peso)
- Tartrato de sodio y potasio ($NaK(CH_2OH)_2(COO)_2 \cdot 4H_2O$)
- Glucosa en polvo ($C_6H_{12}O_6$)
- Dicromato de potasio grado analítico ($K_2 Cr_2O_7$)
- Solución estándar de etanol
- Agua des ionizada

2.5.2.4. Varios

- Hojas de papel bond A4
- Computador Laptop Hp
- Impresora EPSON LX – 300
- Hojas de papel bond
- Bolígrafos
- Lápiz

Figura 7. Diagrama de Flujo de Proceso para la Obtención del Almidón de Banano.



Fuente: (Cobana & Antezana, 2007)

Descripción del diagrama de flujo de proceso:

Recepción

La materia prima (banano) es adquirida en la cantidad necesaria del sitio Sabalucal de la finca orgánica “La Lucha”, verificando visualmente que sea la calidad adecuada.

Lavado

Con agua clorada 100 ppm de concentración.

Pelado

Se retiró la corteza protectora del banano manualmente.

Cortado

Se picó el banano en trozos pequeños.

Liculado

Se licuó el banano con agua en una relación (1:2).

Filtrado 1

Se filtró con una malla plástica en donde se retiene el bagazo del banano.

Filtrado 2

Se filtró con un lienzo en donde se retiene la proteína, los macro y micro nutrientes y solo pasa el almidón.

Reposado

El filtrado reposó por aproximadamente 6h, cumplido este tiempo se desecha el sobrenadante, se vuelve a adicionar agua, se revuelve y se dejó reposar por 6h, mas y a continuación se desecha el sobrenadante.

Secado

El sedimento obtenido del reposado o decantado se la seco a 55 °C por 2 horas con 48 minutos.

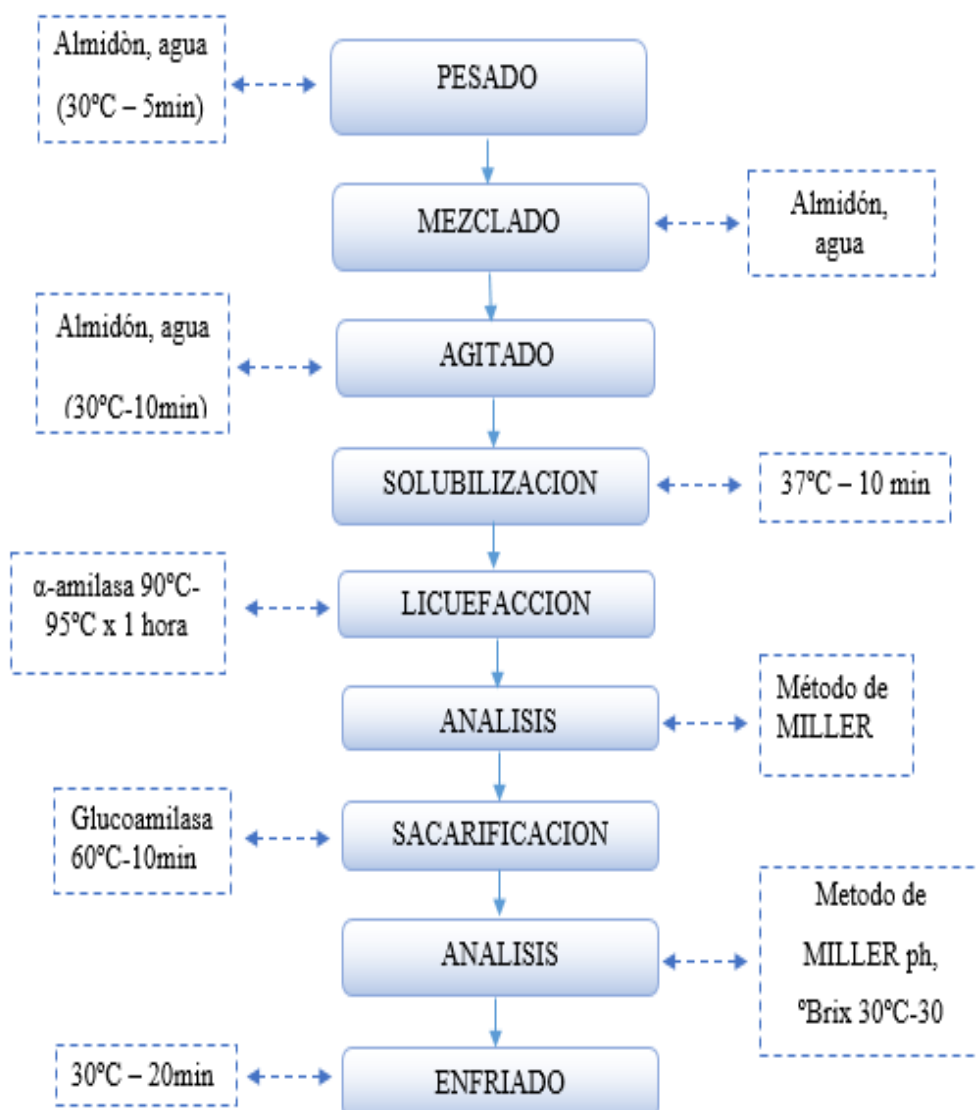
Molienda

El almidón seco laminado se muele manualmente con un mortero y una capsula de porcelana, hasta pulverizarla.

Tamizado

Se tamizo el almidón con una malla 135 µm.

Figura 8. Diagrama de Flujo de Proceso de la Hidrolisis del Almidón de Banano.



Fuente: (Hernandez, 2007).

Descripción del Diagrama de Flujo de Proceso:

Pesado

Se pesó 10 g de almidón y 40 mL de agua.

Mezclado

Se mezcló en un agitador electromagnético el agua con el almidón hasta que se disuelva completamente.

Agitado

Se agito la mezcla en el agitador electromagnético por 10 min.

Solubilización

Luego se lleva la mezcla agua-almidón a calentamiento para la Solubilización del mismo 37 °C-10 min.

Licuefacción

Una vez solubilizado el almidón se le adiciona la enzima α -amilasa a temperatura de 90-95 °C por 1 hora.

Análisis

Luego se procedió a realizar la prueba de MILLER que consiste en hacer diluciones para cuantificar la cantidad de glucosa.

Sacarificación

Se le adiciono la enzima glucoamilasa a 60 °C mediante este proceso el almidón y materias celulósicas se hidrolizan y convierten en azúcares fermentables.

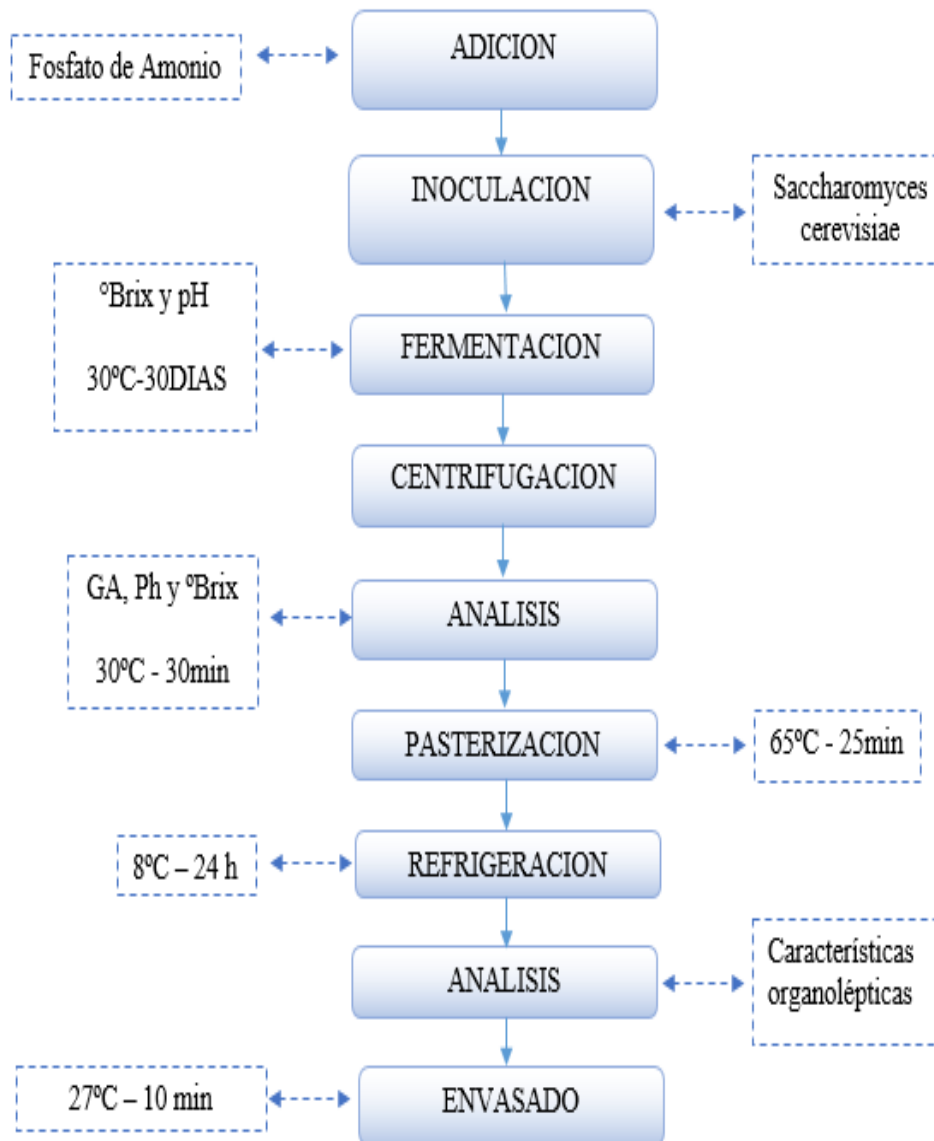
Análisis

Luego se procedió a realizar la prueba de MILLER que consiste en hacer diluciones para cuantificar la cantidad de glucosa.

Enfriado

Una vez obtenido el hidrolizado del almidón de banano se deja enfriar a temperatura ambiente.

Figura 9. Diagrama De Flujo de Proceso de la Fermentación Alcohólica del Almidón de Banano.



Descripción del Diagrama de Flujo de Proceso:

Adición

Se midieron el ° Brix y el pH al hidrolizado del almidón de banano y se le adiciono fosfato de amonio, el mismo que se emplea como nutriente para enriquecer el mosto.

Inoculación

Se activó la levadura disolviéndola en agua caliente a 37 °C con un poco de azúcar entre 2-3 g y esperar hasta que esta se active.

Fermentación

Colocar el almidón hidrolizado y la levadura activada en un recipiente sellado herméticamente y con una trampa de agua, se fermento por 30 días, se midió los °Brix y pH durante el lapso de fermentación.

Centrifugación

Una vez culminada la fermentación, se procedió a realizar una centrifugación para desechar los sólidos insolubles (almidón que no se hidrolizo).

Análisis

Al centrifugado se le midió los grados alcohólicos, °Brix y pH.

Pasterización

Se le procedió a dar un tratamiento térmico de pasteurización a 65 °C por 25 minutos.

Refrigeración

Se dejó en refrigeración a una temperatura de 8 °C por 24 horas.

Análisis Sensorial

Se realizó un análisis sensorial para evaluar las propiedades organolépticas.

Envasado

Se envasó en botellas previamente esterilizadas ya sean de plástico o de vidrio.

3. RESULTADOS

3.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICAS DEL BANANO VERDE (*Cavendish gigante*).

La caracterización de la materia prima se la realizo con la finalidad de conocer la cantidad de almidón que posee el banano verde y poder tener una aproximación de los azúcares fermentables que se dispone para la fermentación alcohólico. A continuación en la tabla 7 y en la figura 10 se muestra la composición fisicoquímica del banano verde.

Tabla 7. Caracterización físico químicas del banano verde.

COMPONENTES	A1	A2	A3	Total	Promedio	Sd (±)
Humedad	72	74	76	222	74	2
Hidratos de C	21,5	20,3	21,8	63,6	21,2	0,79
Fibra	0,75	0,65	0,95	2,35	0,78	0,15
Proteínas	3	2,95	2,9	8,85	3	0,05
Cenizas	0,9	0,87	0,96	2,73	0,91	0,04
Grasa	0,12	0,10	0,11	0,33	0,11	0,01

Fuente: Laboratorio LACONAL (Ambato, 2015)

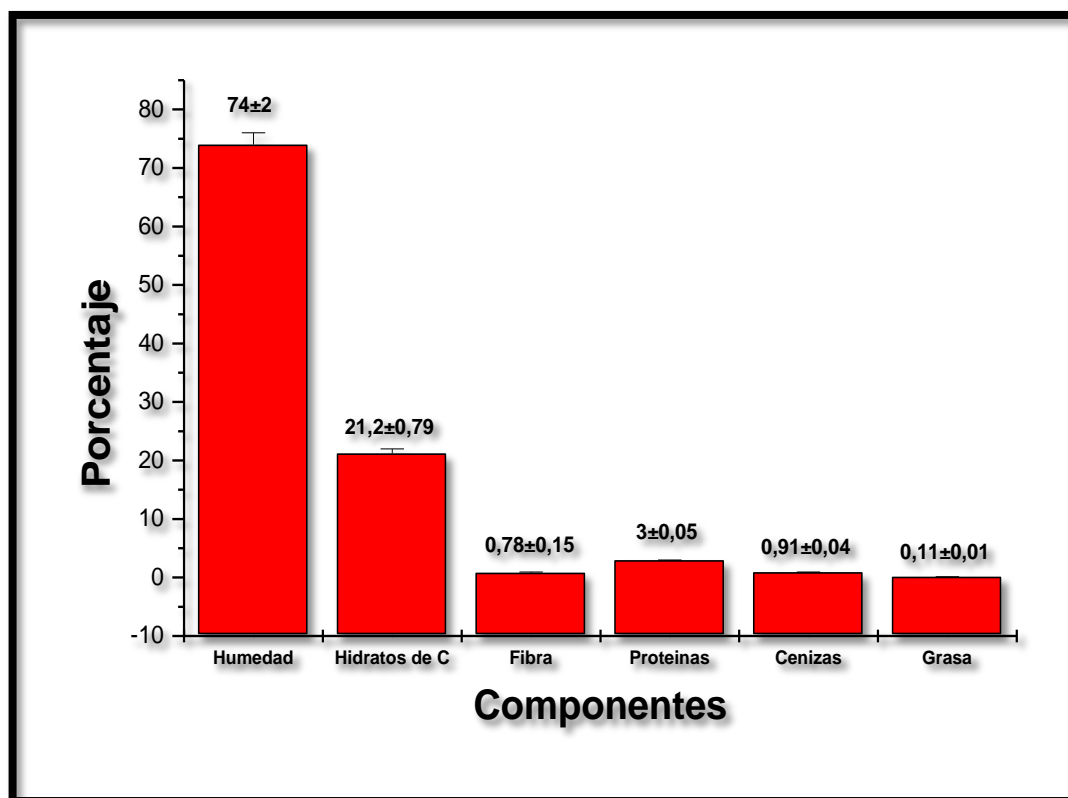


Figura 10. Características físico químicas del banano verde

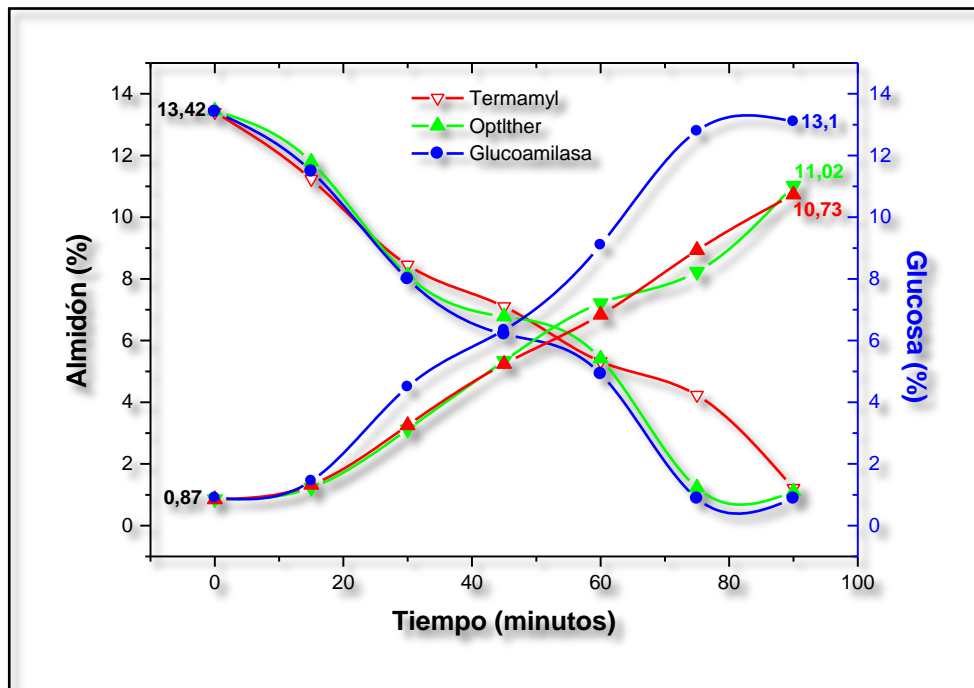
Fuente: Espinoza, 2015

Como se puede apreciar en la figura 10, se dispone de un 21,2 % de hidratos de carbono (Celulosa, hemicelulosa, azúcares reductores y almidón) los cuales pueden ser hidrolizados a azúcares fermentables para la producción de etanol.

3.2. CONVERSIÓN MEDIANTE HIDROLISIS ENZIMÁTICA DEL ALMIDÓN DEL BANANO VERDE A GLUCOSA

La hidrólisis del almidón presente en el banano verde se la realizó con la finalidad de obtener glucosa fermentable mediante tres tipos de enzimas (Termamyl, Optitherma y glucoamilasa). A continuación en la figura 11 se muestra el comportamiento de bioconversión del almidón a glucosa.

Figura 11. Bioconversión de almidón a glucosa



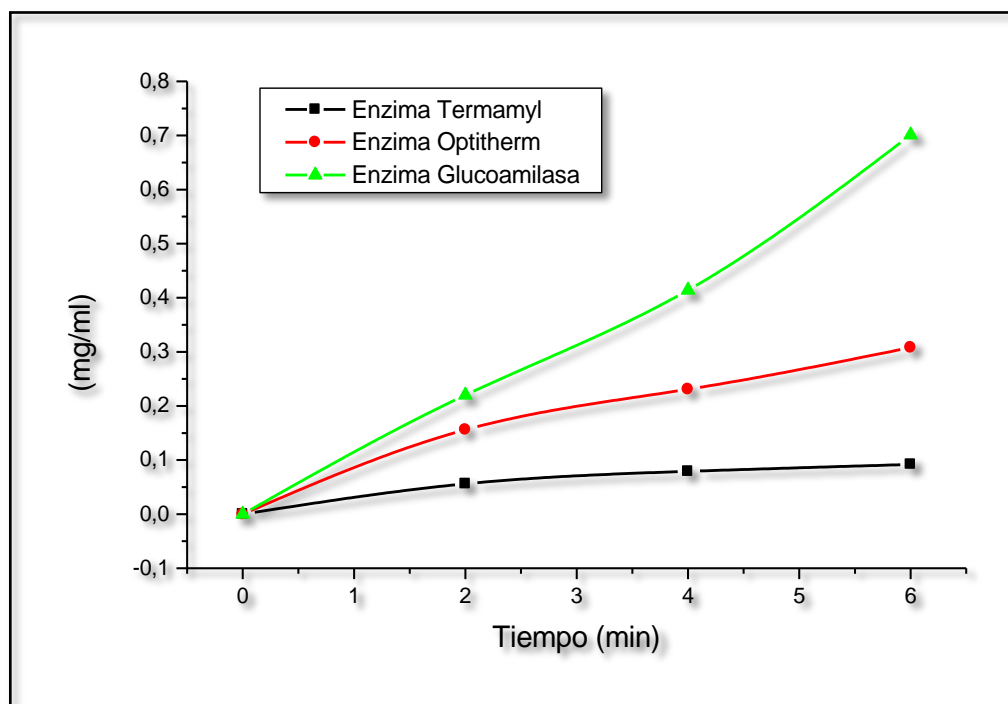
Fuente: Espinoza, 2015.

En la figura 11 podemos ver que el proceso de hidrólisis del almidón se inicia desde una concentración promedio de 13,42 % que fue el resultado de licuar banano verde y agua en una relación de 2:1 respectivamente, transcurrido 90 minutos de hidrolisis enzimática se obtuvieron concentraciones 13,1 % de glucosa en el hidrolizado con la enzima glucoamilasa, 11,02 % de glucosa con *Optitherma* y 10,73 % en el hidrolizado con *Termamyl*.

3.2.1. Actividad Enzimática

En este trabajo de investigación se estudió la actividad de tres tipos de enzimas como fueron: *Termamyl*, *Optitherma* y *Glucoamilasa*.

Figura 12. Actividad de las Enzimas utilizadas en la presente investigación



Fuente: Espinoza, 2015.

Como se muestra en la figura 12, la enzima con mayor actividad es la enzima *Optitherma*, que es la cantidad de enzima que libera o produce la liberación de $1\mu\text{mol}$ de carbohidratos reductores expresados como maltosa en el caso de las enzimas *Optitherma* y la *Termamyl* y en el caso de la enzima *Glucoamilasa* se expresa como glucosa por minuto a $27\text{ }^\circ\text{C}$ y pH 6,0 en las enzimas *Optitherma* y *Termamyl* y pH de 4,5 en la *Glucoamilasa*.

3.2.2. Análisis Estadístico de la Concentración de Glucosa Obtenida en la Hidrolisis del Almidón

El análisis de varianza se lo realizo para determinar si existe diferencia significativa ($p < 0,05$) en la producción de glucosa mediante la utilización de tres tipos de enzimas (*Termamyl*, *Optitherma* y *Glucoamilasa*). A continuación en la tabla 8 se muestra el análisis de varianza de la producción de glucosa utilizando las tres enzimas antes mencionadas.

Tabla 8. Análisis de varianza (ANOVA) del experimento

Fuente	Media	Varianza	N
Termamyl	11,23	0,03	3
Optitherma	10,64	0,01	3
Glucoamilasa	13,1	0,01	3

F = 241,27
p = 1,85231E⁻⁶

Fuente: Espinoza, 2015.

Como podemos apreciar en la tabla 8 si existe diferencia significativa en la producción de glucosa, mediante la utilización de tres tipos de enzimas utilizadas, la enzima que alcanza la mayor media en la producción de glucosa es la glucoamilasa con un 13,1 %.

3.2.2.1. Prueba de TUKEY

Prueba de Comparación Múltiple de Tukey (*Glucosa - Enzimas*).

Método: 95,0 % Tukey HSD (diferencia mínima significativa).

Tabla 9. Prueba de TUKEY

Contrate	Diferencia	+/- Limites
Glucoamilasa - Optither	*2,45	0,35
Glucoamilasa - Termamyl	*1,87	0,35
Optither - Termamyl	*-0,58	0,35

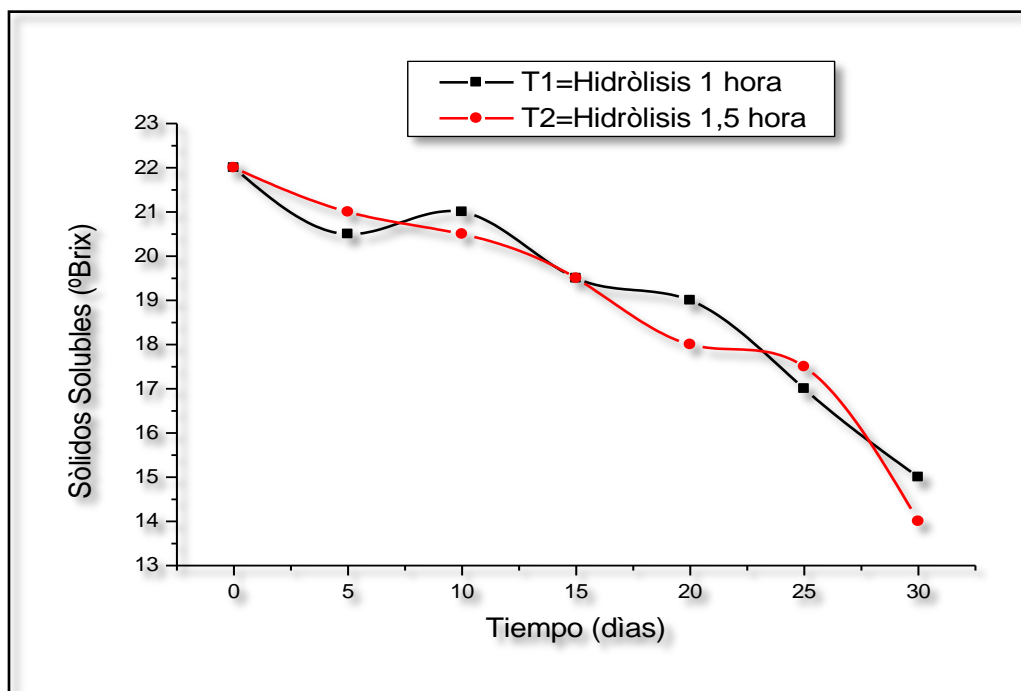
* Si existe diferencia significativa ($p < 0,05$).

Este método fue utilizado para discriminar las medias que tiene diferencia mínima significativa (HSD). Con este método, existe un riesgo de 5,0 % de llamar a uno o más pares significativamente diferente.

3.3. FERMENTACIÓN DE LA GLUCOSA OBTENIDA EN EL PROCESO DE HIDROLISIS DEL ALMIDÓN

Una vez hidrolizado el almidón se procedió a fermentar, se le ajusta el pH del jarabe glucosado, luego se inocula la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en una concentración de 0,5 g/L, se sella herméticamente y se le coloca la trampa de agua, se lo deja fermentar por un lapso de 30 días. A continuación en la figura 13 se muestra la disminución del °Brix del mosto.

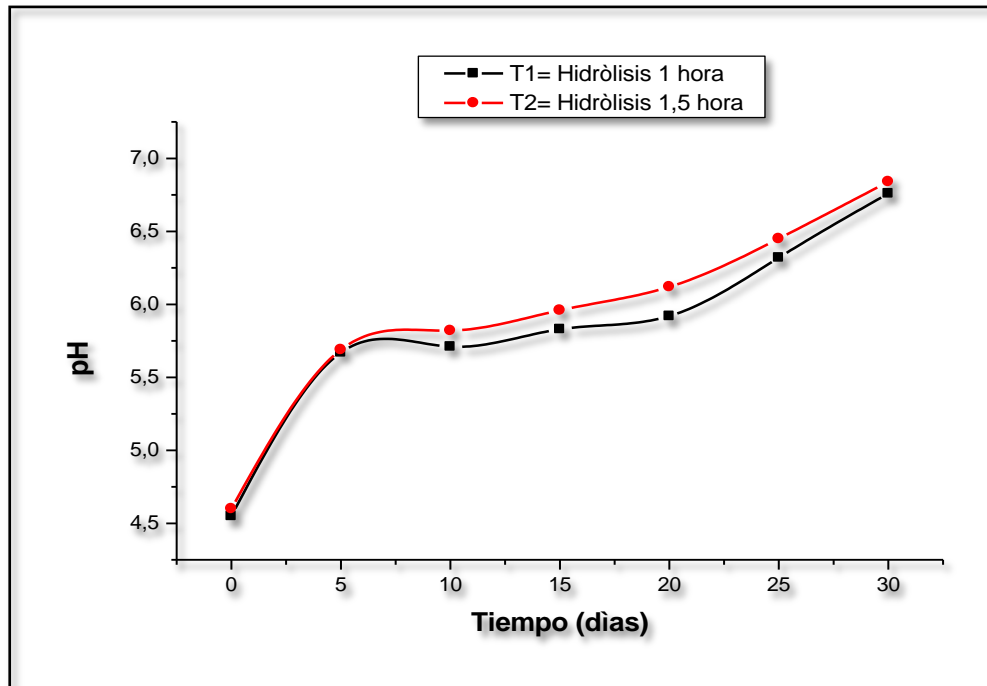
Figura 13. Cambios de solidos solubles (°Brix)



Fuente: Espinoza, 2015.

La figura 13 nos muestra como empieza a descender la concentración de °Brix desde el primer día de fermentación, lo cual indica que se está llevando a cabo la bioconversión de glucosa a etanol. A continuación en la figura 14 se muestra el comportamiento del pH durante los 30 días de fermentación alcohólica.

Figura 14. Cambios de pH registrados durante la fermentación



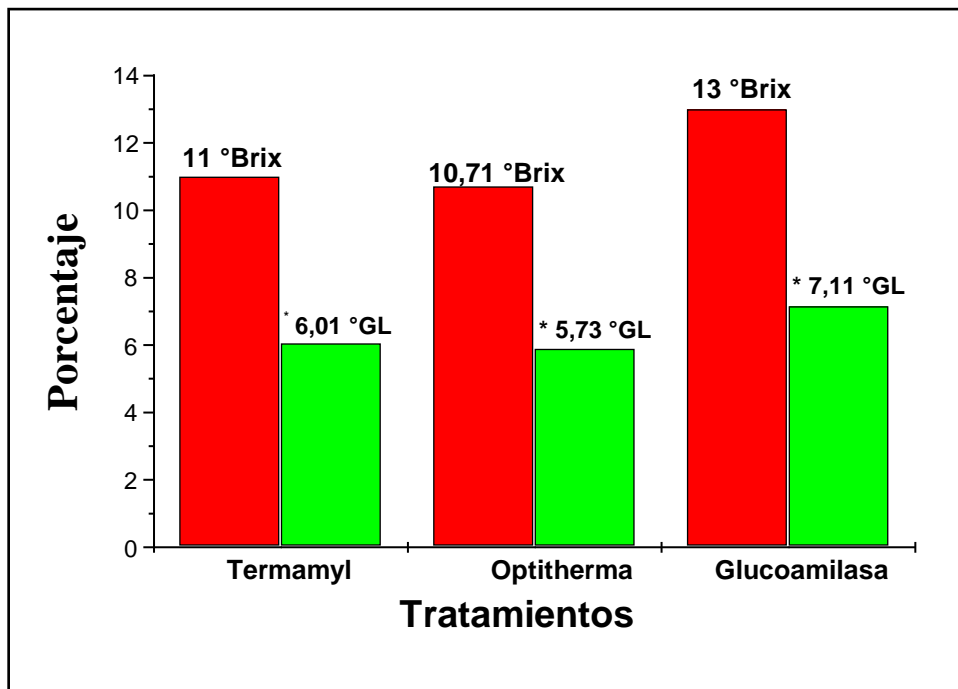
Fuente: Espinoza, 2015.

Como podemos apreciar en la figura 14 el pH del fermentado se incrementa conforme avanza el tiempo de fermentación lo cual evidencia la formación de etanol en el medio.

3.4. DETERMINACIÓN DE LOS GRADOS ALCOHÓLICOS DE LOS TRES TRATAMIENTOS ESTUDIADOS

Al incorporar levadura de cerveza (*Saccharomyces cereviceae*) en el medio de cultivo donde existe altas concentraciones de glucosa, el medio a fermentarse y producir etanol, biomasa y dióxido de carbono. A continuación en la figura 15 se muestra la concentración inicial de °Brix y la concentración finas de etanol en °GL.

Figura 15. ° Brix vs °GL



Fuente: Espinoza, 2015.

Como se puede apreciar en la figura 15 si existió diferencia significativa ($p < 0,05$) en la producción de glucosa en los tres tratamientos estudiados, el tratamiento de hidrolizado con *Glucoamilasa* fue el que alcanzó el mayor porcentaje de alcohol (7,11 %).

3.4.1. Pruebas de Hipótesis

Computarizada estadístico chi-cuadrado = 32,0

P-valor = 0,000186283

Rechazar la hipótesis nula para alfa = 0,05.

Hipótesis nula: $\sigma = 0,5$

Hipótesis alternativa: $\sigma < 0,5$.

La hipótesis nula es rechazada en el 95,0% nivel de confianza. El intervalo de confianza muestra que los valores de sigma con el apoyo de los datos caen entre 0,675457 y 1,91577, se acepta la hipótesis alternativa.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES

- Se determinó que el banano verde es una fuente significativa de almidón, posee en promedio un 21,2 % de hidratos de carbono (celulosa, hemicelulosa, azúcares reductores y almidón) los cuales pueden ser hidrolizados a azúcares fermentables para la producción de etanol.
- El proceso de hidrólisis enzimática se inicia desde una concentración promedio de 13,42 % de almidón, con un tiempo de retención hídrica de 90 minutos, tiempo necesario para hidrolizar todo el almidón presente en la solución a glucosa. Se determinó en los tres tratamientos que existe diferencia significativa ($p < 0,05$) en la producción de glucosa, mediante la utilización de tres tipos de enzimas. La enzima que alcanza 13,1 % en la producción de glucosa es la *Glucoamilasa*.
- La enzima con mayor actividad es la enzima *Optitherma*, que es la cantidad de enzima que libera o produce la liberación de 1 μ mol de hidratos de carbono reductores expresados como maltosa en el caso de las enzimas *Optitherma* y la *Termamyl* y en el caso de la enzima *Glucoamilasa* se expresa como glucosa por minuto a 27 °C y pH 6,0 en las enzimas *Optitherma* y *Termamyl* y pH de 4,5 en la *Glucoamilasa*.
- Desde el inicio de la fermentación alcohólica empezó a descender la concentración de °Brix, lo cual indicó que se está llevando a cabo la bioconversión de glucosa a etanol. En los tres tratamientos si existió diferencia significativa ($p < 0,05$) en la producción de glucosa en los tres tratamientos estudiados, el tratamiento de hidrolizado con *Glucoamilasa* fue el que alcanzo el mayor porcentaje de alcohol 7,11 °GL.

- La prueba de hipótesis con una desviación estándar de 1,00 el estadístico Chi-cuadrado es igual a 32,0. Dado que el P-valor para el prueba es menor que 0,05 la hipótesis nula es rechazada en el 95,0 % de nivel de confianza. El intervalo de confianza muestra que los valores de sigma con el apoyo de los datos caen entre 0,675457 y 1,91577. Se acepta la hipótesis alternativa: Aplicando hidrólisis enzimática del almidón del banano verde para la obtención de glucosa, *es* posible la fermentación del hidrolizado mediante la utilización de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, para la obtención de etanol.

4.2. RECOMENDACIONES

- Se recomienda que para la obtención del almidón se lo realice en un lugar limpio y seco, porque mientras más puro es el almidón más rápido se solubiliza y se hidroliza.
- Se recomienda utilizar una levadura con mayor resistencia a los grados alcohólicos, como la *Saccharomyces bayanus* y enzimas que no sean muy resistentes a las altas temperaturas.
- Controlar estrictamente la temperatura de hidrolisis, debido a que si no lo hacemos correctamente es almidón se pueden romper sus puentes de H¹ y por consiguiente provocar el inicio de la gelificación.
- Mantener controlada la temperatura de fermentación ya que las levaduras tienen su óptimo de intensidad fermentativa.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Abadía, P. (1995). Producción de almidón de banano por el método enzimático.
- Ariza, B. y Gonzalez, L. . (1997). *Producción de Proteína Unicelular a partir de levaduras y melaza de caña de azúcar como sustrato*. Bogotá.
- Bayas, J. e. (1999). Obtención de jarabe de glucosa a partir del almidón de maíz. Tesis 226 de la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos.
- Bello, D., Carrera, E., & Díaz, Y. (2006). Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, 46.
- Carlile MJ. (2001). *The Fungi*. 2ª ed. Academic Press, San Diego, p 70.
- Chaplin, M. (2004). "The use of enzymes in starch hydrolysis". <http://www1.lsbu.ac.uk/biology/enztech/starch.html>.
- Chico, D. y. (2004). Obtención de una bebida alcohólica a partir del almidón del sustrato de papa (solanum tuberosum, tratada con alfa amilasa. Tesis 320 Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos.
- Clarke, M. A., Roberts, E. J., & Godshall, M. A. (1986). Non-starch, soluble polysaccharides of sugar cane. Proc. South. Afr. Sug. Technol. Assoc. (SASTA) 60:58-61.
- Cobana, R., & Antezana. (2007). *Proceso de extracción de almidón*. Bolivia: Química volumen 24.

- Conabio. (2009). *Catálogo taxonómico de especies de México. 1. In Capital Nat. México. CONABIO, Mexico City.*
- Cornejo, L. y. (1993). Obtencion de una bebida alcoholica de oca. Tesis 145 de la Facultad de Ciencias e Ingenieria en A limentos.
- Cowan, C. P. (1983). *.Flora de Tabasco. Listados Floríst. México 1: 1–123.*
- Darke, R. (1999). *Color Encycl. Ornam. Grasses 1–325. Timber Press, Portland.*
- Diaz, S. (2010). Fermentacion Alcoholica. <http://poica2010c.wordpress.com/2010/04/>.
- Dobislaw, E. (1959). *Metodos Industriales para la fabricacion de bebidas alcoholicas. Editorial Reverte, Barcelona, 246.*
- FAO. (2012). <http://www.fao.org/docrep/007/y5102s/y5102s04.htm>. *La economía mundial del banano 1985-2002.*
- FOASTAT. (2012). <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. *Produccion de banano.*
- FONACYT. (2010). Evaluacion de la extraccion del almidon de banano verde.
- GADG. (2014).
- Garcia, M. (2008). Fermentacion Alcoholica. <http://quimicageneral6.blogspot.com>.
- Halasz, A., & Laszlitly, R. (1991). *Use of Yeast biomass in food production.* Boston.
- Hernandez, A. y. (2007). Produccion de jarabe de glucosa a partir de almidon de tiquisque. 30.
- Hiriano S. Upper C. (2000). *Bacterial in the leaf ecosystem with emphasis on Pseudomonas syringae-a pathogen, ice nucleus, and epihyte. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Vo 64 No. 3. 624-653.*
- Hiscox, G. (1988). *Gran enciclopedia practica de recetas industriales y formulas domesticas.* Gustavo Gili, 514p.

- Iizuka. (1985). *Analisis y experimentacion con banano*.
- Kendrick B. (2000). *The Fifth Kingdom. 3º ed. Focus Publishing, Newburyport, p 112*.
- Latorre, G. L. (2008). Análisis Estructural y Modificación Funcional de la Glucoamilasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Departamento de Bioquímica y Biología molecular. *The industrial Enzimologist*.
- Lucas, J. (1994). Fermentacion Alcoholic. <http://javierdelucas.es/fermentacion.htm>.
- Magap. (2014). <http://sinagap.agricultura.gob.ec/>.
- Malgoire JY, Bertout S, Renaud F, Bastide JM, Mallié M. (2005). *Typing of Saccharomyces cerevisiae clinical strains by using microsatellite sequence polymorphism». J. Clin. Microbiol. 43 (3): pp. 1133–7. doi:10.1128/JCM.43.3.1133-1137.2005. PMID 15750073*.
- Malgoire, J. Y., Bertout, S., Renaud, F., Bastide, J. M., & Mallié, M. (2005). Typing of *Saccharomyces cerevisiae* Clinical Strains by Using Microsatellite Sequence Polymorphism. *Journal Clin Microbiol*, Pág. 1.
- McFarland L, Bernasconi P. (1993). *Saccharomyces boulardii: a review of an innovative biotherapeutic agent». Microb Ecol Health Dis 6: pp. 157–71. doi:10.3109/08910609309141323*.
- Meade, G. P. y Chen, J. P. (1977). *Sugar cane handbook. 10 ed. Willey-Interscience*.
- Morrison, R., & Boyd, R. (1998). *Química Orgánica. Quinta edición*. Mexico: Editorial Pearson.
- Nahum. (2008). Hidrolisis acida y enzimatica del almidon. <http://www.scribd.com/doc/19046859/hidrolisis-acida-y-enzimatica-del-almidon>.
- Naturland, A. (2000). *Agricultura Orgánica en el Tropico y Subtropico*.
- Novozymes. (2015). *Product sheet enzyme business*. www.novozymes.com.

- Núñez, R. F. (2014). Extracción y caracterización del almidón de banano verde y de su residuo de pulpa. Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana, 2014.
- Ospina, A. y Palacios, M. . (1994). *Efecto del cultivo de levaduras sobre la carga orgánica de los efluentes de SUCROMILES S.A.* Cali.
- Perez, B. (2002). *Propiedades químicas y funcionales del almidon modificado de banano*, <http://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2002/mar-abr/art-4.pdf>.
- Perez, B. (2006). *Sacan harina curativa del banano*, <http://www.planetaazul.com.mx/site/>.
- PROECUADOR. (2013). http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/09/PROEC_AS2013_BANANO.pdf.
- Ruíz, F. S. (1995). *El cultivo de la caña de azucar* (Vol. I). San Jose, Costa Rica: Universidad Estatal a Distancia San jose.
- Sarmiento A., Herrera J. . (2003). *Obtención y caracterización de un banco de levaduras con potencial aplicación probiótica. Trabajo de grado (Microbiología Industrial). Pontificia Universidad Javeriana. Bogota. P 103.*
- Vaca, E. y. (1981). Obtencion de alcohol etilico a partir de la melaza.
- Vásquez, E. (2007). *Departamento de Agricultura*. <http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/hidrolisis%20polisacaridos.html>
>: Quito.
- Villa, J. (03 de 01 de 2014). *Salud y Buenos Alimentos*. Obtenido de Salud y Buenos Alimentos:
<http://www.saludybuenosalimentos.es/alimentos/index.php?s1=Verduras%2FHortalizas&s2=Tallos&s3=Ca%F1a+de+Az%FAcar>
- Villamil Y., Zapata Y. (1999). *Caracterización de levaduras fermentadoras aisladas de frutas en descomposición con potencial aplicación productora de etanol.*

*Trabajo de Grado (Microbiología Industrial). Pontificia Universidad Javeriana.
Bogota.*

Yepez, Y. (1995). *Selección de una cepa de Saccharomyces cerevisiae con alta productividad de etanol y que tolere mayores niveles de azúcar que los usados en la Planta Alcoquímica Sucromiles S.A. Bogotá.*

ANEXOS

Anexo 1. Humedad



Anexo 2. Azucres Totales



Anexo 3. pH



Anexo 4. Cenizas



Anexo 5. Fibra Cruda



Anexo 6. Banano con cascara



Anexo 7. Banano sin cáscara



Anexo 8. Secado del almidón



Anexo 9. Almidón seco



Anexo 10. Molienda del almidón



Anexo 11. Tamizado del almidón



Anexo 12. Tamiz de 315 μm



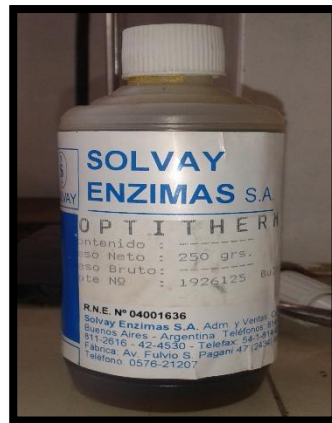
Anexo 13. Almidón de Banano



Anexo 14. Reactivo 3,5 DNS



Anexo 15. Enzimas



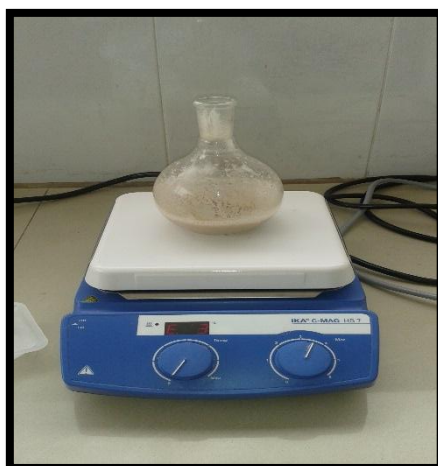
Anexo 16. Humedad del almidón



Anexo 17. Método de MILLER



Anexo 18. Solubilización del almidón



Anexo 19. Espectrofotómetro UV



Anexo 20. Medición de pH






UNIVERSIDAD TECNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERIA EN ALIMENTOS
LABORATORIO DE CONTROL Y ANALISIS DE ALIMENTOS



Dir: Av. Los Chasquis y Río Payamino, Huachi, Ambato Ecuador Telefonos: 2400987 Correo: laconal@hotmail.com

"Laboratorio de ensayo acreditado por el OAE con acreditación N°: OAE LE C 10-008"

CERTIFICADO DE ANALISIS DE LABORATORIO

Certificado No:15-075						R01-5.10 06
Solicitud No: 15-075						Pág.:1 de 1
Fecha de recepción: 27 marzo 2015			Fecha de ejecución de ensayos: 30 marzo - 01 abril 2015			
Información del cliente:						
Empresa: Finca "La Lucha"			C.I./RUC: 0704951847			
Representante: Segundo Victor Espinoza Alvarado			Tlf: 0985407017			
Dirección: Cda. Alcides Pasantes			Email: segundovictorespinoza@hotmail.com			
Ciudad: Machala						
Descripción de las muestras:						
Producto: Banano Verde			Peso: 1100			
Marca comercial: Fair Class Bio			Tipo de envase: Funda plastica			
Lote: n/a			No de muestras: una			
F. Elb.: n/a			F. Exp.: n/a			
Conservación: Ambiente: x Refrigeración: Congelación:			Almac. en Lab: n/a			
Cierres seguridad: Ninguno: x Intactos: Rotos:			Muestreo por el cliente: 25 marzo 2015			
RESULTADOS OBTENIDOS						
Muestras	Código del laboratorio	Código cliente	Ensayos solicitados	Métodos utilizados	Unidades	Resultados
Banano Verde	7515179	Cavendish Gigante	*Azúcares Totales	Método interno	%	1.51
			*Fibra cruda	INEN 522	%	0.470
			*Fibra dietética total	AOAC 985.29. Ed 19, 2012	%	0.374
			Cenizas	PE01-5.4-FQ. AOAC Ed 19, 2012 923.03	%	0.880
			Humedad	PE02-5.4-FQ. AOAC Ed 19, 2012 925.10	%	62.3
			*pH	INEN 521	Unidades de pH	5.76
			Grasa	PE13-5.4-FQ. AOAC Ed 19, 2012 2003.06	%	0.024
Conds. Ambientales: 19.2°C; 51%HR						
Nota: Los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de la acreditación del OAE						
			DIRECTOR DE CALIDAD			
			Ing. Gladys Risueño Directora de Calidad			
Autorización para transferencia electrónica de resultados: No						GR

Nota: Los resultados consignados se refieren exclusivamente a la muestra recibida. El Laboratorio no es responsable por el uso incorrecto de este certificado.
No es un documento negociable. Sólo se permite su reproducción sin fines de lucro y haciendo referencia a la fuente.

"La información que se está enviando es confidencial, exclusivamente para su destinatario, y no puede ser vinculante. Si usted no es el destinatario de esta información recomendamos eliminarla inmediatamente. La distribución o copia del mismo está prohibida y será sancionada según el proceso legal pertinente".