

## Obtención de Enzimas Celulasas por Fermentación Sólida de Hongos para ser Utilizadas en el Proceso de Obtención de Bioalcohol de Residuos del Cultivo de Banano

D. Paredes Medina<sup>1</sup>, M. Álvarez Núñez<sup>2</sup>, M. Silva Ordoñez<sup>3</sup>

<sup>1,2 y 3</sup> Universidad Técnica de Ambato, Ingeniería en Alimentos, Unidad Operativa de Investigación de Tecnología de Alimentos (UOITA), Campus Académico Huachi-Av, Los Chasquis y Río Payamino, Ambato, Ecuador  
daysi\_pame@hotmail.com, marioferalv@hotmail.com, mpsilva206@hotmail.com

### Resumen

*En Ecuador se genera gran cantidad de residuos lignocelulósicos como resultado del cultivo de banano (ricos en celulosa, hemicelulosa y lignina), los cuales pueden ser empleados en fermentación sólida de hongos productores de enzimas celulasas y como materia prima para producir bioalcohol. En el presente trabajo se analizó la actividad de enzimas celulasas (UI/g de residuo seco) obtenidas de la fermentación sólida sobre los residuos de banano pseudotallo, hojas y raquis con los hongos Pleurotus ostreatus, Pleurotus pulmonarius y Lentinula edodes en 24 días de incubación. La máxima actividad enzimática de celulasas fue producida por Lentinula edodes en pseudotallo con valores de 8,14 UI/g de residuo seco. Para la aplicación de las enzimas celulasas en la obtención de bioalcohol, primeramente se modificó la estructura química de la lignina de los residuos de banano, mediante un pretratamiento a cada uno, con 0,74 g de hidróxido de calcio/g de residuo, para la posterior hidrólisis de la celulosa a azúcares con 12 UI de extracto enzimático/g de residuo seco pretratado. Los líquidos conteniendo los azúcares solubles fueron separados y concentrados a 6°Brix, para su posterior fermentación alcohólica con Saccharomyces cerevisiae durante 9 días. El mayor rendimiento de etanol fue en raquis, con 24,66 ml por 100 g de residuo seco. Existe un potencial uso de los residuos de cultivo de banano como sustratos para producción de enzimas celulasas y como fuente de biomasa lignocelulósica para etanol.*

**Palabras Claves:** *residuos lignocelulósicos de banano, fermentación sólida, celulasas, actividad enzimática, pretratamiento, celulosa, hidrólisis, etanol.*

### Abstract

*In Ecuador, the cultivation of bananas generates large amounts of lignocellulosic residues, (rich in cellulose, hemicellulose and lignin) which can be use in solid state fermentation of fungi producing cellulase enzymes, and as raw material to produce bioalcohol. In this proyect we analyzed the activity of cellulase enzymes (IU/g dry residue) obtained from the solid fermentation over the residues of bananas, pseudostem, leaves and rachis with fungi Pleurotus ostreatus, Lentinula edodes Pleurotus pulmonarius and within 24 days of incubation. The maximum enzymatic activity of cellulases produced by Lentinula edodes in pseudostem with values of 8,14 IU/g of dry residue. For the application of cellulase enzymes in the production of bioalcohol, first modified the chemical structure of lignin from the banana waste, by pretreatment for each one, with 0,74 g of calcium hydroxide/g of waste, to the next step which is the hydrolysis of cellulose to sugars with 12 enzyme extract IU/g of dry residue pretreated. The liquids that contained fermentable sugars were separated and concentrated to 6°Brix, for alcoholic fermentation with Saccharomyces cerevisiae during nine days. The highest yield of ethanol was in the spine, with 24,66 ml per 100 g of dry residue. There is a potential use of the banana crop residues as substrates for cellulases production and a source of lignocellulosic biomass for ethanol production.*

**Keywords:** *lignocellulosic waste of banana, solid state fermentation, cellulase, enzyme activity, pre-treatment, cellulose hydrolysis, ethanol.*

### 1. Introducción

A lo largo de la historia se han venido empleando las enzimas para usos industriales, una de las enzimas comúnmente utilizadas es la celulasas obtenidas mediante fermentación de diferentes microorganismos,

los cuales han sido estudiados en varios sustratos. La optimización de la producción de enzimas a partir de microorganismos depende de una serie de factores interrelacionados, lo que significa que una enzima solo

puede sintetizarse durante parte de su ciclo de crecimiento [1].

Las celulasas y xilanasas son enzimas hidrolíticas que participan en el rompimiento de los enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,4 presentes en los polisacáridos de la celulosa y hemicelulosa, respectivamente. El interés por las celulasas empezó alrededor de los años 50 debido a su enorme potencial para convertir la lignocelulosa en glucosa y azúcares solubles. Cabe señalar que la lignocelulosa es la fuente de energía renovable más abundante de la tierra. Está formada por tres componentes principales que son: celulosa, hemicelulosa y lignina, y su contenido es bajo en cenizas, proteínas, grasas y ceras [2]

Bacterias y hongos pueden producir enzimas celulasas para la hidrólisis de material lignocelulósico. Estos microorganismos pueden ser aeróbicos o anaeróbicos, mesófilos o termófilos. [3]. Géneros y especies de hongos tales como *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Neurospora crassa*, incluyendo además hongos comestibles como: *Lentinula edodes*, *Volvariella volvacea*, *Pleurotus sp.*, producen celulasas [4].

La celulosa es el principal componente de la membrana celular de la mayor parte de las plantas, está constituida por moles de D-glucosa unidas por los enlaces  $\beta$ -1-4 glicosídicos y es el más abundante en la biosfera, generalmente resistente a la fermentación, no significa que no se pueda hidrolizar, pues existen microorganismos celulíticos que poseen enzimas como: las celobiohidrolasas y las endoglucanasas que se encargan de su degradación [5].

Los residuos agrícolas son ricos en celulosa, hemicelulosa y lignina; teniendo en cuenta su estructura, pueden usarse como sustratos para el cultivo de hongos filamentosos capaces de producir enzimas extracelulares con actividades celulasas, con importantes aplicaciones industriales, como la hidrólisis de biomasa lignocelulósica para la producción de etanol [6].

Una planta de banano al momento de su cosecha debe tener un peso promedio de 100 Kg los cuales están repartidos en 15 Kg de hojas; 50 Kg de pseudotallo; 33 Kg de banano y 2 Kg de raquis. Esto lógicamente indica que el 67% del volumen total de producción lo constituyen los desechos que no provecha el hombre sistemáticamente, sino más bien es un foco de contaminación [7].

El bioalcohol es un combustible de origen vegetal que tiene las características parecidas a los de los combustibles fósiles, lo que permite su utilización en motores apenas modificados. Además, los biocombustibles no contienen azufre, uno de los causantes de la lluvia ácida. El bioetanol puede fabricarse a partir de cualquier materia prima orgánica que contenga cantidades significativas de azúcares o compuestos que puedan transformarse en azúcares como almidón o celulosa [8].

La utilización de la tecnología del bioalcohol en el sector agrícola, particularmente en países no industrializados, como el Ecuador, puede permitir a los pequeños, medianos y grandes productores disponer de una opción para su producción, pudiendo utilizar parte de la misma para autoabastecerse de biocombustible, total o parcialmente, en función de los precios de las materias primas a utilizarse.

Considerando estos antecedentes el presente estudio planteó los siguientes objetivos: a) Producir enzimas celulasas a partir de residuos agrícolas que se desechan del cultivo de banano como las hojas, raquis y pseudotallo por fermentación sólida con los hongos *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Lentinula edodes*; b) Determinar la actividad de las enzimas celulasas a diferentes tiempos y pH de reacción. c) Aplicar las enzimas celulasas en la hidrólisis de la celulosa residuos de banano, previo un pretratamiento, para la obtención de etanol.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1. Materiales

Los residuos del cultivo de banano perteneciente a la familia *Musaceae* y de género *Musa* empleados en el presente estudio provinieron de la Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas y fueron los siguientes: hojas, pseudotallo y raquis. Así también se utilizó granos de trigo para la propagación de cepas, que sirvieron de semilla para fermentar los residuos de banano.

Para la obtención de extractos enzimáticos se utilizaron tres cepas: *Pleurotus ostreatus var. florida* registrada como CP-184, cedida por la colección del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (Universidad de Oriente, Cuba); *Pleurotus pulmonarius* N. 20 Pamela Fungi propiedad de la UOITA; y la cepa *Lentinula edodes* provenientes del laboratorio Wb-Laboratory-Canadá.

### 2.2. Métodos

La investigación se ejecutó en la Unidad de Investigación en Tecnología de Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

**2.2.1. Acondicionamiento de la materia prima.** Los residuos del cultivo de banano como: hojas, pseudotallo y raquis fueron trasladados a la Unidad Operativa de Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato para la aplicación de los distintos tratamientos. Se seleccionaron los residuos de apariencia firme, color y olor característico, luego fueron lavados, deshidratados en un secador a 60°C y por último cortados para su posterior análisis.

### 2.2.2. Análisis químico de los residuos lignocelulósicos del banano

**Análisis proximal de los residuos de banano:** se utilizaron los métodos AOAC Official Method, 2002 para la determinación de proteína, grasa, fibra y cenizas [9].

**Extracción de los solubles en alcohol-benceno:** Previamente a la determinación de lignina y celulosa, las muestras fueron sometidas a extracción de los materiales solubles en dos partes de benceno y una parte de etanol. Con los solventes se extraen todas las sustancias de baja polaridad como resinas, ácidos grasos, hidrocarburos, parte de los taninos. Se realizó en extractor tipo Soxhlet por un tiempo de cuatro horas [10].

**Eliminación de los compuestos solubles en agua caliente:** Al material extraído en alcohol-benceno se lo trató con agua a baño termostático por tres horas. El agua caliente disuelve todos los extractivos que no fueron solubles en la etapa anterior. Incluye el resto de los taninos, azúcares, aminoácidos, alcoholes [10].

**Determinación del contenido de lignina insoluble en ácido:** El contenido de lignina insoluble en ácido se realizó en las muestras libres de sustancias extraíbles. Las muestras se mezclaron con 15 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 72%, se agitaron con frecuencia a 15°C durante dos horas. Las mezclas se diluyeron con agua destilada, se colocaron a reflujo durante cuatro horas, se filtraron, y los residuos se secaron hasta masa constante, según el método de Klason descrita por Núñez C. (2008) [10].

**Determinación del contenido de celulosa:** El contenido porcentual de celulosa se determinó mediante el método de Kúrshner-Höffer, los materiales libres de sustancias extraíbles se le añadieron 25 ml de mezcla reactiva de HNO<sub>3</sub>-etanol (1:4); se colocaron a reflujo en baño de agua durante una hora, se decantaron y se añadieron una nueva cantidad de mezcla reactiva, repitiendo esta operación tres veces. Posteriormente se añadieron 25 ml de KOH al 1% durante 30 minutos, se filtró y los sólidos se secaron [11].

**Estimación del contenido de hemicelulosa total:** Las hemicelulosas totales se estimaron por diferencia entre 100% y la suma del porcentaje de celulosa y lignina

### 2.2.3. Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida

**Preparación de la semilla de las diferentes cepas de hongos:** Para preparar la semilla se utilizó granos de trigo, se seleccionaron los granos para eliminar partículas ajenas, y se lavaron mediante enjuagues continuos con abundante agua. Se sumergieron los granos en agua fría durante 24 horas y se escurrió el exceso de agua. Seguidamente se colocaron aproximadamente 400g de trigo hidratado en frascos de boca ancha y de capacidad de medio litro. Se esterilizaron en autoclave a 121 °C por 20 minutos. Se enfriaron los frascos y se los agitaron con la finalidad

de separar los granos y favorecer una aireación e hidratación homogénea. Con la ayuda de un bisturí estéril se partió en porciones iguales el micelio de los tres tipos de hongos crecidos en PDA en cajas Petri. Estas porciones se depositaron en los frascos que contenían los granos de trigo con un asa estéril. Se incubaron los frascos por 2 semanas a una temperatura de 22-24°C y una humedad relativa de 60-70%.

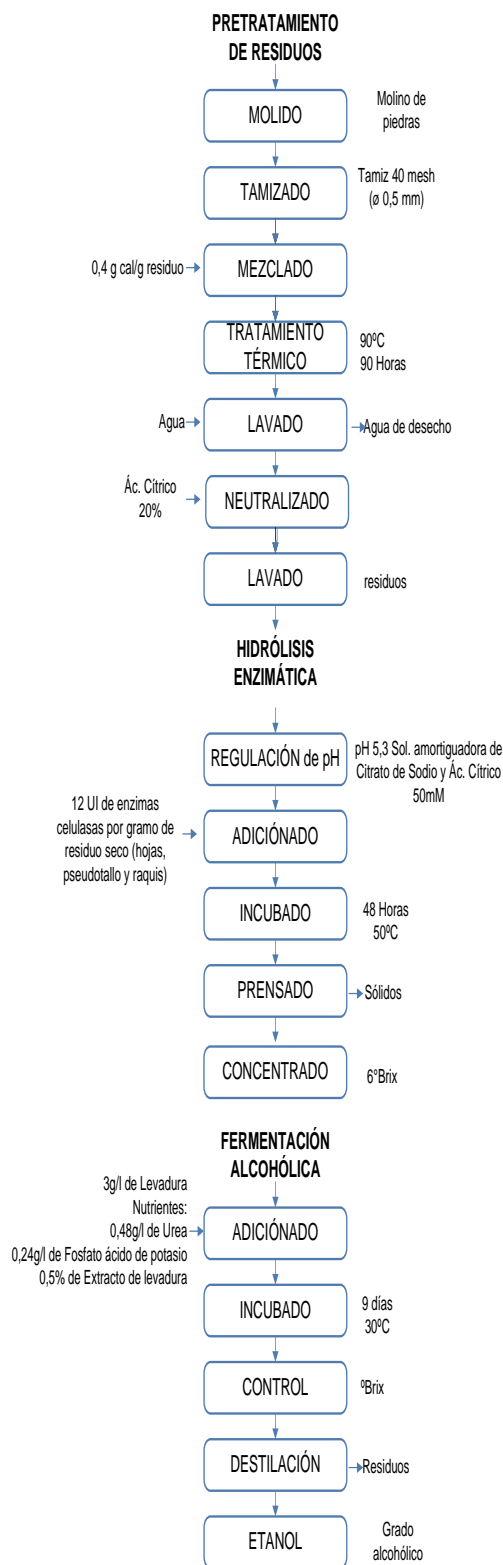
**Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida:** Se colocaron 12 g de residuos de banano en matraces de 500 ml, el tamaño de partícula de los residuos fue de 0,5 y 1 cm aproximadamente y se ajustaron la humedad al 80%. Posteriormente, los matraces con los residuos se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 30 minutos, se dejaron enfriar hasta 22°C. En forma aséptica se mezcló homogéneamente con la semilla en una proporción del 2% del peso húmedo del sustrato. Se incubaron los matraces por 24 días a una temperatura de 22-24°C y una humedad relativa de 60-70%.

**Extracción de enzimas:** Al tiempo definido de fermentación (24 días) se adicionaron a cada matraz 30ml de solución amortiguadora de citrato 50mM, pH 5,3 y se agitaron durante 15 minutos, para seguidamente prensarle. El volumen obtenido se distribuyó en tubos para centrifugarlos por 30 minutos a 6000 rpm y se separaron el sobrenadante al cual le llamaremos extracto enzimático.

**Determinación de la actividad enzimática de las enzimas celulasas:** La actividad de enzimas celulasas se midió aplicando el procedimiento de Loera y Córdova y la concentración de azúcares reductores por el método de Lane y Eynon. Como sustrato para la actividad de celulasas se utilizó carboximetil celulosa (CMC) sal de sodio al 0,5%, que fue disuelto a razón de 2,5g en 500ml de solución amortiguadora de citrato (50mM; pH 5,3). La mezcla de reacción se hizo con 45ml de sustrato y 5 ml de extracto enzimático en matraces de 50ml. Los matraces fueron colocados en un baño termostático con agitación (80 rpm) a 50°C por el lapso de 1 hora. Luego la mezcla fue hervida por 1 minuto para inactivar la enzima y se determinaron el contenido de azúcares reductores formados en la mezcla de reacción. Para el cálculo de la actividad enzimática se relacionó con el volumen de extracto enzimático extraído de cada matraz de fermentación. La actividad enzimática de celulasas se reportaron en Unidades Internacionales (UI), definiendo la UI como la cantidad de enzima que libera 1µmol de azúcares reductores (glucosa) por minuto en las condiciones de la reacción. Para cada fermentación sólida, la actividad enzimática se expresó en UI por gramos de residuo seco [12].

**2.2.4. Obtención de bioalcohol.** Los residuos hojas, raquis y pseudotallo de banano deshidratados y cortados se sometieron a un proceso de molienda en un molino de piedras. Las harinas de los residuos fueron tamizados en un tamiz de malla de 40 mesh (Serie

Standard Sieve, U. S. A, con un tamaño de poro de 42,5  $\mu\text{m}$ ).



**Figura 1.** Diagrama de la obtención de etanol a partir de residuos del cultivo de banano pretratados e hidrolizados con enzimas celulasas

**Pretratamiento de los residuos de banano:** Se tomaron 100g de cada residuo molido y por separado se les agregó 0,74 g de hidróxido de calcio/g de residuo seco y fueron llevados a un volumen 720 ml con agua destilada. Los residuos fueron colocados en vaso de precipitación de 1000 ml, tapados con papel aluminio y colocados en una estufa a la temperatura de 90°C por 90 horas. Una vez enfriado, se lavo por sucesivas ocasiones con agua destilada hasta obtener agua clara en el filtrado. Los residuos lavados fueron colocados en vasos de precipitación y neutralizado con ácido cítrico al 20%, para nuevamente lavarlos con agua destilada con el fin de eliminar los excedentes de hidróxido de calcio y acondicionar los residuos a un pH óptimo (5,3) para su posterior hidrólisis.

**Hidrólisis enzimática:** Cada uno de los residuos tratados fue puesto en una suspensión del 5% en agua destilada y ajustados a pH 5,3 con ácido cítrico al 10%. A la suspensión de los residuos pre-tratados se les adicionó el extracto enzimático en una proporción de 12 UI/ g de residuo seco y se incubaron a 50°C por 48 horas. Al final de este tiempo se filtro y se obtuvo un líquido conteniendo el azúcar fermentable.

**Fermentación alcohólica:** El líquido filtrado fue concentrado hasta 6°Brix, posteriormente se le adicionó los siguientes componentes: levadura *Sacharomyces cerevisiae* de fabricación nacional (3g/l) y nutrientes (urea 0,48g/l; fosfato ácido de potasio 0,24g/l extracto de levadura 0,5%) como menciona Cardona *et al*, 2004 [13]. El proceso de fermentación alcohólica se realizó en biorreactores adaptados a escala de laboratorio a una temperatura de 30°C durante 9 días. Al final de la fermentación se procedió a destilar y medir del grado alcohólico, según Métodos Oficiales de Análisis del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Tomo II, Madrid, 1986 [14] En la Figura 1, se describe el proceso de producción de etanol celulósico a partir de los residuos de banano.

### 2.2.5. Diseño experimental y análisis estadístico.

Para la obtención de enzimas celulasas se utilizó un diseño factorial A\*B con tres replicas por tratamiento. Los factores fueron tres tipos de hongos (*Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Lentinula edodes*) y tres sustratos (hojas, pseudotallo y raquis). Los datos se analizaron mediante el paquete estadístico STHATGRAPHICS (2004). Los promedios se compararon mediante la prueba de Tukey (Multiple Range Tests) y la interacción de los dos factores mediante el paquete estadístico EMSTAC.

## 3. Resultados y Discusión

### 3.1. Análisis químico de los residuos

En la Tabla 1 se indica el análisis proximal de los residuos de la plante de banano: hojas, pseudotallo y raquis, en la que se visualiza su composición y su

viable utilización en el presente estudio. Así se tiene que, el raquis es el residuo de banano que mayor cantidad de fibra en base seca posee, con un valor de 53,90%, seguido del pseudotallo con 35,30%, dato que es corroborado por Viswnathan *et al.*, (1989) [15], que reporta un valor de 31,5% cercano al determinado en el presente estudio, mientras que el porcentaje de fibra en hojas fue de 34,20%.

**Tabla 1.** Análisis proximal de los residuos de banano en base seca (g/100g)

Análisis	Hojas (%)	Pseudotallo (%)	Raquis (%)
Cenizas	16,10	28,30	23,10
Extracto Etéreo	2,30	9,60	1,50
Proteína cruda	12,30	5,30	3,30
Fibra cruda	34,20	35,30	53,90

Considerando que el 67% del volumen total de producción lo constituyen los desechos [7], bien se podrían posesionar como una innovadora alternativa de recurso para la generación de enzimas, aportando al aprovechamiento de residuos agrícolas que conforman del 30 al 42% de celulosa de la biomasa existente en la biosfera [3].

**Tabla 2.** Contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa de los residuos lignocelulósicos del cultivo de banano, en base seca

Residuo de banano	Lignina (%)	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)
Hojas	8,5	36,6	27,39
Pseudotallo	5,2	35,3	24,9
Raquis	9,85	30,6	15,7

En la Tabla 2 se indica el contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa de los residuos lignocelulósicos del cultivo de banano en base seca. Así se tiene que las hojas contienen 36,6% de celulosa, seguida por el pseudotallo con 35,3% y por último el raquis con 30,6%. Por su predominancia con respecto al resto de componentes la celulosa es la opción más viable para utilizarse como fuente de producción de glucosa y así llegar al siguiente paso que es la fermentación alcohólica.

En las hojas, la hemicelulosa posee un valor de 27,39%, seguido de pseudotallo con 24,9% y de raquis con 15,7%. Como la hemicelulosa puede desdoblarse en otra forma de azúcar, esta se perfila como una segunda fuente para producir bioalcohol.

El contenido de lignina en hojas presenta un valor de 8,5%, en pseudotallo 5,2%, y en raquis 9,85%, porcentajes no muy altos, pero que al ser la lignina la

que restringe el acceso de las enzimas celulasas a la celulosa, por lo que esta debe ser hidrolizada o modificada previamente.

### 3.2. Actividad de enzimas celulasas

La determinación de actividad enzimática es una forma de medir la cantidad de enzima que se forma durante la fermentación sólida en un sustrato determinado, por lo que en primera instancia establecimos la mejor interacción cepa-sustrato, de la cual se pueda obtener un extracto enzimático con una máxima actividad.

**Tabla 3.** Actividades de las enzimas celulasas (UI/g de residuo seco) obtenidas de la fermentación sólida en los diferentes tratamientos

Tratamientos (Sustrato-Cepa)		R 1	R 2	R 3	Promedio
T1	Hojas- <i>P. ostreatus</i>	1,27	2,15	2,47	1,96 <sup>c</sup>
T2	Hojas- <i>P. pulmonarius</i>	2,62	1,59	1,12	1,78 <sup>c</sup>
T3	Hojas- <i>Lentinula edodes</i>	0	0	0	0 <sup>d</sup>
T4	Pseudotallo- <i>P. ostreatus</i>	6,48	6,19	6,18	6,28 <sup>b</sup>
T5	Pseudotallo- <i>P. pulmonarius</i>	6,72	6,22	6,47	6,47 <sup>b</sup>
T6	Pseudotallo- <i>Lentinula edodes</i>	7,45	8,9	8,06	8,14 <sup>a</sup>
T7	Raquis- <i>P. ostreatus</i>	0	0	0	0 <sup>d</sup>
T8	Raquis- <i>P. pulmonarius</i>	0	0	0	0 <sup>d</sup>
T9	Raquis- <i>Lentinula edodes</i>	0	0	0	0 <sup>d</sup>

Las diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos ( $\alpha < 0,05$ ).

La Tabla 3 se observa los valores de actividad de las enzimas celulasas en los diferentes tratamientos, la máxima actividad enzimática de celulasas fue producida por *Lentinula edodes* en pseudotallo con 8,14 UI/g de residuo seco. Se identificó también que el tratamiento Pseudotallo-*P. pulmonarius* da una actividad de 6,47 UI/g residuo seco, siendo esta una actividad considerable. No se obtuvo valores de actividad en el sustrato raquis, cuando se sembró *Pleurotus* y *Lentinula edodes*, lo que nos conduce a aseverar que el raquis no posee los requerimientos nutricionales adecuados para el crecimiento de estos hongos. El hongo *Lentinula edodes* tampoco creció en hojas de banano.

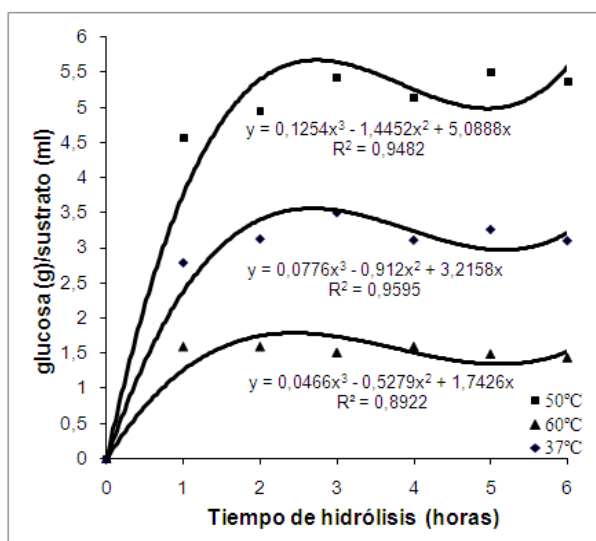
*P. ostreatus* ha sido reconocido como productor de enzimas lignolíticas [16], más que de celulasas y xilanasas. En el presente estudio la actividad de celulasas expresada por *P. ostreatus* fueron aparentemente superiores a los reportados por Marques

et al., 2007 para *P. ostreatus* IE8, quien encontró una máxima actividad de 1,16 UI/g de residuo seco en 19 días de fermentación. En *Trametes sp.*, el valor que obtuvo Márquez es de 9,56 g/g de residuo seco, un poco más alto que el producido por *Lentinula edodes* (Shiitake) obtenido en este trabajo, que fue de 8,14 UI/g de residuo seco en 24 días de fermentación.

Aplicando un análisis de varianza se establece que existe diferencia altamente significativa ( $\alpha < 0,01$ ) para los residuos (sustratos) y las interacciones AxB, más no existe diferencia significativa ( $\alpha < 0,05$ ) en cepas, ni en replicas. Al no existir diferencia significativa en las cepas se entiende que para obtener la misma cantidad de enzimas celulasas podría trabajarse con *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* o *Lentinula edodes*.

### 3.3. Efecto de pH y temperatura en la actividad de las enzimas celulasas

Para conocer la influencia del tiempo y temperatura en la hidrólisis de la celulosa por parte de las enzimas celulasas extraídas del mejor tratamiento, se probaron distintos rangos, así para el efecto del tiempo en la hidrólisis se sometió a las enzimas celulasas a 6 horas de reacción con solución de CMC sal de sodio al 0,5%, y a las siguientes temperaturas: 50°C, temperatura óptima de la enzima, a 60°C y a 37°C.



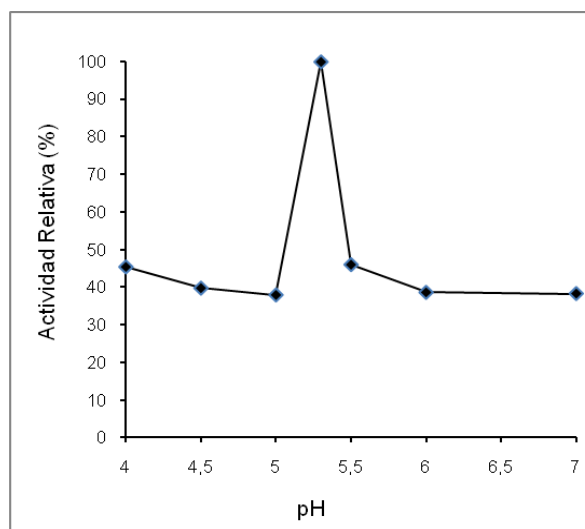
**Figura 2.** Actividad de las enzimas celulasas sobre sustrato carboximetil celulosa a diferentes tiempos y temperaturas.

Las hidrólisis de las enzimas se realizaron en un baño termostático con agitación de 100 rpm en sentido oscilatorio, las curvas de hidrólisis se presenta en la Figura 2, donde se evidencia que a la temperatura de 50°C produce la mayor cantidad de glucosa en 1000 ml de sustrato. De ahí que, podemos decir que ha temperaturas superiores e inferiores a la óptima, la enzima produce menor cantidad de azúcares. También podemos visualizar que la actividad enzimática ocurre rápidamente durante la primera hora de reacción y

alcanza la máxima actividad a las dos horas y media aproximadamente, pasado este tiempo la formación de glucosa no ocurre, es decir ya no se da el rompimiento de la molécula de CMC.

En la Figura 3, se observa que el pH de 5,3 se consigue la mayor actividad relativa de las celulasas en una hora de reacción, verificándose que la hidrólisis de la celulosa por acción de las celulasas se ve influenciada por la concentración de iones hidrogeno del medio, debido a que se afecta el grado de ionización de los aminoácidos del complejo enzima-sustrato [17]. A un pH menor a 5,3; la actividad de la enzima disminuye, y por ende la formación de glucosa es baja, lo mismo ocurre a un pH superior.

La especificidad de la hidrólisis hace que las celulasas actúen a condiciones bastante específicas u óptimas de pH y temperatura, 5,3 y 50 °C respectivamente. Por lo tanto, la efectividad y reproducibilidad del tratamiento dependerá enormemente del control de estas dos variables. Por este motivo es recomendable el uso de soluciones tampón, que modifican la fuerza iónica del medio para una mejor hidrólisis [18].



**Figura 3.** Actividad relativa de las Enzimas Celulasas sobre sustrato carboximetil celulosa a diferentes valores de pH en una hora de hidrólisis

### 3.4. Producción de bioalcohol

Para probar la efectividad del extracto de enzimas celulasas obtenidas, a los residuos secos del cultivo de banano (pseudotallo, raquis y hojas) se les aplicó a estos residuos un pretratamiento químico con hidróxido de calcio a 90° C por 90 horas. El hidróxido rompe estructura de la lignina, permitiendo la accesibilidad a la celulosa.

Una vez que el material celulósico estuvo listo, es decir, concluido el pretratamiento y ajustado el residuo a pH 5,3, se adicionó el extracto de las enzimas celulasas en una proporción de 12 UI/ g de residuos seco. Seguidamente se incubó a 50°C por 48 horas, al final de este tiempo se filtro y se obtuvo un líquido

contenido de azúcares solubles, los que se les concentró hasta 6 °Brix. A los azúcares solubles se agregó levadura y nutrientes para someterlos a una fermentación alcohólica durante 9 días.

El resumen de los resultados obtenidos se indica en la Tabla 4, el mejor rendimiento de alcohol fue la relación de 26,71 ml de etanol por 100 g de residuo de raquis. El raquis tiene la mayor proporción de celulosa en su composición (49,52%) y mayor cantidad de fibra bruta (53,90%) con respecto a los a hojas y pseudotallo. El pseudotallo le sigue con respecto al rendimiento de alcohol producido con 20,89 ml etanol por 100 g de residuo y por último las hojas con 19,04 ml.

La alternativa de emplear residuos lignocelulósicos en la producción de etanol, constituye hoy día una posibilidad altamente prometedora por su amplia disponibilidad en el mundo. La existencia en los diversos países iberoamericanos, de abundantes recursos lignocelulósicos, justifica la dedicación por parte de estas naciones, de un esfuerzo importante al desarrollo y adaptación de tecnologías tendientes a la utilización integral y racional de los mismos [19].

#### 4. Conclusiones

Del análisis químico de los residuos lignocelulósicos del cultivo del banano: hojas, pseudotallo y raquis, se evidenció que la celulosa es la fracción mayoritaria de la parte lignocelulósica.

Se obtuvo enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos comestibles *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Lenitnula edodes*, utilizando como sustrato los residuos del cultivo de banano, siendo el mejor sustrato el pseudotallo que con la cepa *Lenitnula edodes* (*Shiitake*) produjo un extracto enzimático con la máxima actividad enzimática 8,14 UI/ g de sustrato seco. Así también se estableció que la temperatura y pH óptimos de la enzima es de 50°C y 5,3 respectivamente.

El proceso de producción de etanol celulósico a partir de biomasa lignocelulósica procedentes del cultivo del banano, como: hojas, pseudotallo y raquis, consta de cuatro pasos: (1) pretratamiento, por el que se liberan las fibras celulósicas del duro envoltorio de lignina de la biomasa vegetal, (2) sacarificación enzimática, por el que se disgregan las fibras

**Tabla 4. Cantidad de etanol obtenido a partir de 100 g de residuos de banano**

Tipo de residuo	Peso de los residuos secos sometidos al pretratamiento y luego a la hidrólisis enzimática	Volumen del líquido obtenido después de la hidrólisis con enzimas celulasas y la concentración a 6°Brix	Sólidos solubles iniciales del líquido a fermentar	Sólidos solubles finales del líquido fermentado	Grado alcohólico del líquido fermentado	Relación volumen de etanol por 100 g de residuo seco
	g	ml	°Brix	°Brix	°GL	ml etanol/100 g residuo
Hojas	100	850	6	2	2,24	19,04
Pseudotallo	100	933	6	2,2	2,24	20,89
Raquis	100	822	6	2,2	3,25	26,71

celulósicas liberadas en azúcares simples, (3) fermentación de los azúcares, por el que los azúcares simples se transforman en etanol por la acción de microorganismos (normalmente levaduras), y (4) destilación, por la que se obtiene etanol de gran pureza por separación térmica del caldo de fermentación.

Se determinó que para la aplicación de concentrados enzimáticos en la tecnología de bioalcohol, es necesario realizar un pretratamiento, que puede ser alcalino como el que se realizó en este estudio con hidróxido de calcio a los residuos de banano para poder modificar la envoltura protectora alrededor de la celulosa compuesta por hemicelulosa y la lignina, y así permitir el acceso a la celulosa por parte de las enzimas celulasas. En estas condiciones es

factible aplicar el extracto enzimático, el mismo que al transformar la celulosa a azúcares solubles y bajo la acción de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se logró fermentar hasta obtenerse etanol, en una relación de 24,66 ml de etanol puro por 100g de raquis, siendo este el mejor rendimiento de alcohol producido.

La obtención de etanol a partir de los residuos de banano puede ser una alternativa económica y ambiental para los bananeros del país.

#### 5. Recomendaciones

Se recomienda comparar otras técnicas de pretratamiento de la biomasa lignocelulósica, aunque la aplicación de ácidos diluidos o álcalis diluidos son

tecnologías conocidas para el pretratamiento de biomasa lignocelulósica, recientemente se han descrito otras tecnologías teóricamente más eficientes. Entre estas tecnologías están los pre tratamientos de «explosión por vapor» y «explosión de fibras por amoníaco» (AFEX, por sus siglas en inglés), entre otras.

Examinar la estabilidad de las celulasas obtenidas, con el propósito de estudiar la actividad enzimática en relación al tiempo de almacenamiento del medio que contiene la enzima.

Se recomienda investigar la obtención de enzimas celulasas a partir del hongo *Trichoderma reesei* utilizando como sustrato el pseudotallo de banano (*Musa cavendish*).

## 5. Agradecimientos

Un sincero agradecimiento a la Universidad Técnica de Ambato y al Centro de Investigaciones CENI por el financiamiento del presente proyecto. A la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y a la Unidad Operativa de Investigaciones en Tecnología de Alimentos UOITA, por las facilidades brindadas a las diferentes actividades de investigación.

## 6. Referencias

- [1] Ramírez, P. y Cocha, J. “Degradación de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica”. Rev. Peru. biol.1. (1):67-77(2003).
- [2] Ponce, T. y Pérez, O. (2002) “Celulasas y xilanasas en la industria”, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Cinvestav.
- [3] Wang, J., Wang, J. and Gulfranz M. Efficient Cellulase Production from Corn Straw by *Trichoderma Reesei* LW1 through Solid State Fermentation Process. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 2002, pp.19: 23-33.
- [4] Vilchez, P., “Determinación de la actividad de exoglucanasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaraz”, Tesis. Biólogo, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas. Lima, Perú, 2000. Disponible en <http://sisbib.unmsm.edu.pe/>.
- [5] Mosquera C. y Rubio, B. (2000) “El reciclaje del papel, celulosa y *Trichoderma reesei*”, Departamento de Química, Universidad del Cauca. Popayán,
- [6] Rodríguez, I. y Piñeros, Y. (2007) “Producción de complejos enzimáticos celulolíticos mediante el cultivo en fase sólida de *Trichoderma sp.* sobre los racimos vacíos de palma de aceite como sustrato”, Grupo de Aprovechamiento de Recursos Agroalimentarios, Programa Ingeniería de Alimentos, Universidad Jorge Tadeo Lozano, Bogotá, Colombia.
- [7] Bao, M., Delgado S., García, M. & Torres, M. (1987) “Aprovechamiento de residuos de plataneras. I. Producción en Islas Canarias, sus características y alternativas de utilización”. Rev Agroquim Tecnol Aliment, pp. 27:24-30.
- [8] Ballesteros, M. 2006, “Carburantes sin petróleo: Bioetanol”, Investigación y ciencia, ISSN 0210-136X, N° 362, 2006. pags. 78-85.
- [9] Official Methods of Analysis of AOAC International, CD ROOM, 1<sup>7th</sup> Edition, Current Trough Revision # 1, 2002.
- [10] Núñez C., 2008, “Análisis Químico de la madera”. Disponible en: <http://www.cenunez.com.ar>.
- [11] Orea-Igarza, U.; Cordero E. y Gómez, R. (2006) “Estudio comparativo de la composición química de la corteza de tres especies de eucaliptos a tres alturas del fuste comercial”, Centro de Estudios Forestales, Universidad de Pinar del Río, Cuba.
- [12] Márquez A., Mendoza, G., González S., Buntinx S. y Loera O. (2007) “Actividad fibrolítica de enzimas producidas por *Trametes sp. eumI*, *Pleurotus ostreatus* IE8 y *Aspergillus Níger* AD96.4 en fermentación sólida”, Interciencia, VOL. 32 N° 11.
- [13] Cardona C., Sánchez O., Ramírez J y Alzate L. (2004) “Biodegradación de residuos orgánicos de plazas de mercado”. Revista Colombiana de Biotecnología, ISSN 1909-8758, Vol. 6, N°. 2, 2004, pp. 78-89.
- [14] Métodos Oficiales de Análisis del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 1986 Dirección General de Política Alimentaria. Tomo II, Madrid, España.
- [15] Viswanathan, K. *et al.*, 1989, “Nutritive value of banana stalk (*Musa cavendish*) as a feed for sheep”, India.
- [16] Guillén-Navarro GK, Márquez-Rocha F, Sánchez Vázquez JE, 1998, “Producción de biomasa y enzimas lignolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido” Rev. Iberoam. Micol. 15: 302-306.
- [17] Badui, S., 1993, “Química de los Alimentos”, Editorial Pearson, México.”.
- [18] Carrillo F., “Caracterización estructural de fibras lyocell y su comportamiento frente a procesos de degradación”, Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Cataluña, España, 2002.
- [19] Romano, S.; González E. y Laborde, M. 2005. “Combustibles Alternativos”. Red CYTED. Nuevas Tecnologías para la obtención de Biocombustibles. Ediciones Cooperativas. Buenos Aires, Argentina.