

# UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA



*La Universidad Católica de Loja*

## ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA

### OBTENCIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES POR DEGRADACIÓN FÚNGICA DE PULPA DE BANANO (CAVENDISH VALERY)

Tesis previa a la obtención del título  
de Ingeniero Químico

**AUTORA:**

**PATRICIA ELIZABETH RUIZ GUEVARA**

**DIRECTORA:**

**ING. ANA BEATRIZ HERNÁNDEZ RUIZ**

LOJA-ECUADOR

2008

## **CESIÓN DE DERECHOS EN TESIS DE GRADO**

Yo, Patricia Ruiz declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice:” Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

Loja, Octubre del 2008

.....

Patricia Elizabeth Ruiz Guevara

## CERTIFICACIÓN

Ingeniera Ana Beatriz Hernández Ruiz

DIRECTORA DE TESIS

### **Certifica:**

Que el trabajo de investigación: “Obtención de azúcares fermentables por degradación fúngica de pulpa de banano (*Cavendish valery*)”, reúne los requisitos que exige el reglamento de la Escuela, por tal razón autorizo su presentación.

Loja, Octubre del 2008

.....

Ingeniera Ana Beatriz Hernández Ruiz

DIRECTORA DE TESIS

## **AUTORÍA**

Las ideas, opiniones y conclusiones del presente trabajo de tesis son de exclusiva  
responsabilidad de la autora.

.....

Patricia Elizabeth Ruiz Guevara

## DEDICATORIA

Con inmenso cariño y amor dedico este trabajo de investigación a mis queridos padres Washington y Narcisa por brindarme su apoyo, y porque permitieron que alcance mis más anhelados triunfos, gracias por sus sabios consejos y palabras de aliento que me han permitido seguir adelante.

A mis hermanos Edgar y Jessica quienes han estado presentes en mis momentos más difíciles.

A mi sobrino por llegar en el mejor momento.

A mi abuelita María Luzmila gracias por sus buenos deseos y por sus bendiciones.

*Patricia Elizabeth*

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Técnica Particular de Loja por abrirme sus puertas para culminar mis estudios superiores. A todas las personas que integran el Centro de Biología Celular y Molecular por colaborar en mi investigación.

Mi sincero agradecimiento a la Ing. Beatriz Hernández, directora de tesis por haber dirigido generosamente mi trabajo de investigación.

A los docentes de la Escuela de Ingeniería Química, por compartir cada uno de sus conocimientos y experiencias en el transcurso de mi vida académica los cuales han servido para formarme integralmente.

## CONTENIDOS

Cesión de derechos en tesis de grado .....	ii
Certificación .....	iii
Autoría .....	iv
Dedicatoria .....	v
Agradecimiento .....	vi
Contenidos .....	vii
Resumen .....	xi

### CAPITULO I

<b>1. Introducción</b> .....	1
<b>1.1. Antecedentes y justificación</b> .....	1
<b>1.2. Fin del Proyecto</b> .....	3
<b>1.3. Propósito de Proyecto</b> .....	3
<b>1.4. Componentes</b> .....	3
<b>1.5. Hipótesis de trabajo</b> .....	4
<b>1.6. Diseño experimental a utilizar y variables de estudio</b> .....	4
1.6.1. Diseño experimental .....	4
1.6.2. Variables de estudio .....	4

### CAPITULO II

<b>2. Antecedentes</b> .....	5
<b>2.1 Pared celular de los vegetales</b> .....	5

2.1.1	Estructura química: Almidón, Pectina y Celulosa .....	6
2.1.1.1	Almidón .....	6
2.1.1.2	Pectina .....	7
2.1.1.3	Celulosa .....	8
<b>2.2.</b>	<b>Hongos .....</b>	<b>9</b>
2.2.1.	Características generales de los hongos .....	9
2.2.2.	Estructura celular de los hongos .....	9
2.2.3.	Importancia de los hongos .....	10
<b>2.3.</b>	<b>Actividad enzimática .....</b>	<b>11</b>
2.3.1	Enzimas amilolíticas .....	11
2.3.2	Enzimas pectinolíticas .....	11
<b>2.4.</b>	<b>Aplicaciones industriales .....</b>	<b>12</b>
2.4.1	Amilasas .....	12
2.4.2	Pectinasas .....	12
2.4.3	Azúcares fermentables .....	13
<b>2.5</b>	<b>Composición química del banano “Cavendish Valery” .....</b>	<b>14</b>
<b>2.6.</b>	<b>Descripción de los Pretratamientos .....</b>	<b>15</b>

### CAPITULO III

<b>3.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>16</b>
3.1	Diseño experimental .....	16
3.2	Aislamiento de Especies fúngicas .....	16
3.3.	Recolección del banano de rechazo .....	16
3.4.	Evaluación cualitativa de Enzimas amilolíticas, pectinolíticas y celulolíticas .....	17



3.5. Fermentación .....	17
3.6. Evaluación cuantitativa de enzimas amilolíticas y pectinolíticas .....	18
3.6.1 Enzimas amilolíticas .....	18
3.6.2 Enzimas pectinolíticas .....	19
3.7. Cuantificación de glucosa .....	20

## CAPITULO IV

<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>22</b>
4.1. Análisis estadístico de resultados .....	22
4.1.1. Pruebas de comparaciones múltiples para la variable pretratamiento (glucosa) .....	23
4.1.2. Pruebas de comparaciones múltiples para la variable concentración de sustrato (Producción amilolítica) .....	24
4.1.3. Pruebas de comparaciones múltiples para la variable concentración de sustrato (Producción pectinolítica) .....	25
4.1.4. Pruebas de comparaciones múltiples para la variable hongo (Producción enzimática) .....	26
4.1.5. Rendimiento en glucosa obtenida .....	27
4.1.6. Producción de enzimas amilolíticas: 3 concentraciones, 3 pretratamientos, 3 hongos .....	27
4.1.7. Producción de enzimas pectinolíticas: 3 concentraciones, 3 pretratamientos, 3 hongos .....	28

## CAPITULO V

<b>5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
---	-----------

## CAPITULO VI

<b>6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>39</b>
--	-----------

6.1. Conclusiones .....	39
-------------------------	----

6.2. Recomendaciones .....	40
----------------------------	----

<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>41</b>
------------------------------	-----------

<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>43</b>
------------------------	-----------

Anexo 1. Protocolos y medios .....	43
------------------------------------	----

Anexo 2. Imágenes y toma de datos .....	47
---	----

## RESUMEN

Esta investigación es parte de un proyecto en el cual se pretende dar un uso sustentable a un residuo agrícola como es el banano denominado “de rechazo”, producto que no es exportado principalmente por no alcanzar el tamaño requerido, lo cual nos da una materia prima en buen estado y a bajo costo.

El Ecuador posee una amplia biodiversidad microbiológica, por lo que también ha sido objetivo de este trabajo conocer hongos que sean aptos para la producción de enzimas que favorezcan la obtención de azúcares fermentables.

Primeramente se inició con el muestreo de hongos degradadores de material celulósico y amiláceo, microorganismos que fueron aislados de tres sectores con actividad bananera de la Provincia de El Oro, los cuales fueron sometidos a un tamizaje enzimático para determinar cualitativamente la actividad celulolítica, amilolítica y pectinolítica. De estos trabajos previos se ha seleccionado inicialmente tres aislamientos fúngicos con potencial actividad biológica. Para favorecer el acceso de las enzimas e incrementar el rendimiento en glucosa obtenida, se ha introducido el estudio de tres pretratamientos en la materia prima.

La mayor actividad para glucosa fue de 4.99 g/L con el pretratamiento hidrotérmico a los 14 días de cultivo a una concentración de sustrato de 10% con el hongo 110M.

La mayor actividad para amilasa fue de 9.99 UA/ml a los 16 días a una concentración de 10% de sustrato con el hongo 138M.

Para la actividad pectinolítica se registró la mayor actividad para polimetilgalacturonasa de 0.19 UE/ml a los 12 días a una concentración de 10% de sustrato con el pretratamiento hidrotérmico hongo 110M. Para poligalacturonasa la mayor actividad fue de 0.254 UE/ml con el pretratamiento hidrotérmico a los 10 días a una concentración 10% con el hongo 110M. Para pectato liasa la mayor actividad fue de 188.07 UE/ml con el pretratamiento hidrotérmico a los 14 días a una concentración 5% con el hongo 110M. Para pectin liasa la mayor actividad fue de 262.70 UE/ml con el pretratamiento hidrotérmico a los 12 días a una concentración 10% con el hongo 70M.

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

El dramático deterioro ambiental generado por el uso abusivo de combustibles fósiles no renovables, sobre todo aquellos que tienen que ver con el uso en automotores, ha hecho que la ciencia oriente sus esfuerzos a la investigación de alternativas energéticas que modifiquen y disminuyan las incesantes emisiones de dióxido de carbono y que permitan el uso de otras fuentes, principalmente la biomasa, como materia prima a la generación de energía (U. S. Department of Energy, 2006).

La producción de biocombustibles a partir de cultivos energéticos renovables como la caña de azúcar, el maíz, la yuca, la remolacha azucarera, la palma africana, el girasol, el maní, el sorgo dulce, o los excedentes de banano ofrecen, múltiples ventajas, no sólo relacionadas con el uso en automotores y la reducción de emisiones de gases, producto de la descomposición biológica, sino también, en el acceso a los beneficios de los Mecanismos de Desarrollo Limpio (MDL) en el marco del Protocolo de Kyoto y en la venta de Certificados de Reducción de Emisiones de Gases de Efecto Invernadero -negociables en el mercado internacional, lo que podría significar ingresos adicionales al estado ecuatoriano (Europa Press).

El uso de biomasa como materia prima para la producción de biocarburantes tiene ventajas desde el punto de vista económico ya que al producirse a gran escala implica bajos costos, además que al ser un recurso renovable se disminuiría en gran parte la dependencia del crudo de petróleo.

Ecuador es un país mega diverso, su riqueza biológica se refleja en la gama de plantas, animales y microorganismos. A su vez el banano se constituye en el principal cultivo agrícola de exportación después del petróleo. En el año 2007 se registro un volumen de exportación de 4'651.342 TM, lo que representa aproximadamente el 80% de la producción (A.E.B.E. 2007), el 20% restante corresponde a la fruta que no está en capacidad de ser exportada, denominado banano de rechazo, el cual se genera en la etapa de selección y empaque, de este residuo (1'162.835 TM/año) una parte es utilizado para alimentación animal y en otros casos se degrada al ambiente ocasionando problemas de contaminación ambiental, que da lugar a la emisión de gases de efecto invernadero, atracción de vectores y producción de lixiviados que

arremeten contra la calidad hídrica, superficial y subterránea afectando la calidad de los suelos (Afanador, A. 2005)

Es importante anotar que a más de la gran cantidad de biomasa generada por esta actividad agrícola, la fruta es rica en almidón 20.3% (Afanador, A. 2005) convirtiéndola en un importante recurso con grandes posibilidades de darle valor agregado.

Los polisacáridos presentes en el banano de rechazo, pueden ser convertidos a azúcares fermentables, por diferentes procesos hidrolíticos, y estos azúcares a su vez convertirse a alcohol, utilizando prácticas biotecnológicas simples y muy conocidas la fermentación; además ser utilizadas en la producción de edulcorantes, debido al contenido de glucosa y fructuosa, siendo los azúcares fermentables del banano aplicados en la industria (Arenas, A. 1998).

El etanol es un alcohol que se obtiene por fermentación de productos ricos en carbohidratos y/o celulosa; y en su estado anhidro es usado actualmente como el sustituto ideal de la gasolina.

El bioetanol presenta algunas ventajas como:

- Se obtiene a partir de cultivos agrícolas, que constituyen fuentes renovables de energía.
- Se produce a partir de cultivos propios de la región permitiendo el crecimiento agrícola del sector y la producción local del biocombustible.
- Permitiría una liberación parcial de la producción y las políticas petroleras, así como de las fluctuaciones de su precio.
- Las emisiones al ambiente causadas por la combustión de etanol son menos contaminantes para los seres vivos, el agua y el aire.

Pese a que en el Ecuador existe una inmensa biodiversidad, no se han reportado estudios importantes de fermentación fúngica usando banano como sustrato, con esta investigación se pretende contribuir al desarrollo del conocimiento científico en lo referente a la búsqueda de metabolitos fúngicos de interés, obtención de azúcares fermentables que pueden ser usados como precursores en la fermentación alcohólica

La Universidad Técnica Particular de Loja, a través del Centro de Biología Celular y Molecular pretende aportar al impulso de metodologías biotecnológicas aplicables al aprovechamiento sustentable de los recursos naturales, promoviendo de esta manera el interés en nuevas tecnologías para dar valor agregado a los recursos subutilizados, y además, abren las puertas para el estudio de nuevos sustratos de cultivos de nuestra región, esto permitirá, el desarrollo del conocimiento científico y técnico en investigaciones que beneficien a la sociedad, la ciencia y el medio ambiente

## **1.2 FIN DEL PROYECTO**

Obtener azúcares fermentables que sirvan como precursores de fermentación.

## **1.3 PROPÓSITO DEL PROYECTO**

Determinar la actividad de las enzimas amilolíticas y pectinolíticas presentes en la degradación fúngica de pulpa de banano.

## **1.4 COMPONENTES DEL PROYECTO**

- Aislar cepas fúngicas de tres bananeras de la Provincia de El Oro.
- Determinar cualitativamente la actividad amilolítica, pectinolítica y celulolítica de las especies aisladas.
- Determinar el pretratamiento óptimo (molienda, troceado, hidrotérmico) para incrementar el rendimiento en glucosa obtenida.
- Identificar cuantitativamente la actividad amilolítica ( $\alpha$ -amilasa) y pectinolítica de los fermentados fúngicos.
- Determinar la influencia de la concentración del sustrato en la producción enzimática.
- Determinar la cepa con mayor productividad.

## 1.5 HIPÓTESIS DE TRABAJO

**H1.** El pretratamiento aplicado a la pulpa influye en el rendimiento de glucosa obtenida.

**H2.** La concentración del sustrato influye en la producción de las enzimas amilolíticas y pectinolíticas.

**H3.** Las tres especies de hongos poseen el mismo nivel de degradación de pulpa.

## 1.6 DISEÑO EXPERIMENTAL Y VARIABLES DE ESTUDIO

**1.6.1 Diseño a utilizar:** Diseño Factorial

**1.6.2 Variables de estudio:**

$a_0$ = Molienda                       $b_0$ = concentración 1%                       $c_0$ = Hongo 1(70M)

$a_1$ = Troceado                       $b_1$ = concentración 5%                       $c_1$ =Hongo 2 (110M)

$a_2$ = Hidrotérmico                       $b_2$ = concentración 10%                       $c_2$ =Hongo 3 (138M)

**1.6.3 Variables respuesta:**

Glucosa, amilasa, pectinasas

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 Pared celular de los vegetales

La pared celular de las plantas está formada por una estructura compleja y ordenada que constituye una barrera que defiende a las células de las invasiones microbianas. Un comportamiento característico de muchos organismos fitopatógenos es la facultad de producir una serie de enzimas capaces de degradar los polímeros constituyentes de la pared celular de las plantas (Alconada, T. 1992)

La pared celular de las plantas se divide en 3 capas: laminilla media, pared primaria y pared secundaria, las cuales varían en su composición química como el grado de organización. La laminilla media y la pared primaria son los principales constituyentes de las sustancias pécticas (30%), las hemicelulosas y celulosa son los principales componentes de la pared secundaria (70%) y la lignina llena los espacios dentro del marco fibrilar de celulosa uniéndose químicamente a los polisacáridos (Esau, 1982)

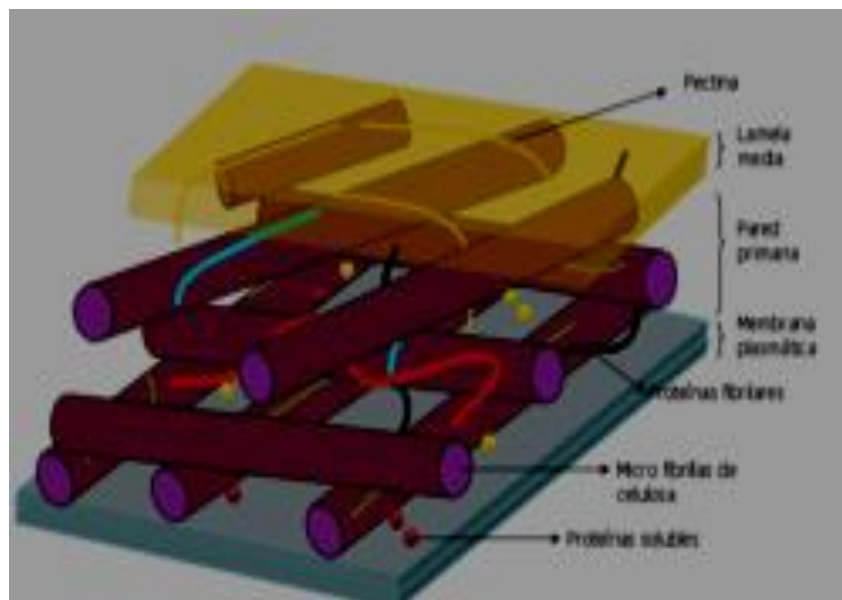


Fig. 1 Pared celular vegetal (Esau, 1982)



## 2.1.1 Estructura química: Almidón, Pectina y Celulosa

### 2.1.1.1 Almidón

El almidón es la principal reserva energética de algunos vegetales y están constituidos por monómeros de glucosa, formando estructuras largas conocidas como amilosa y amilopectina (García, I. 2005)

La amilosa es una cadena lineal de 300 a 350 unidades de glucosa, con uniones  $\alpha$  1-4, es soluble en agua y representa aproximadamente el 20% del total del almidón.

La amilopectina, de 2.000 a 200.000 unidades de glucosa, con uniones  $\alpha$  1-6 presenta ramificaciones en su estructura cada 20-25 unidades de glucosa, y constituye la mayor parte del almidón 80% (Rock, J. 2006)

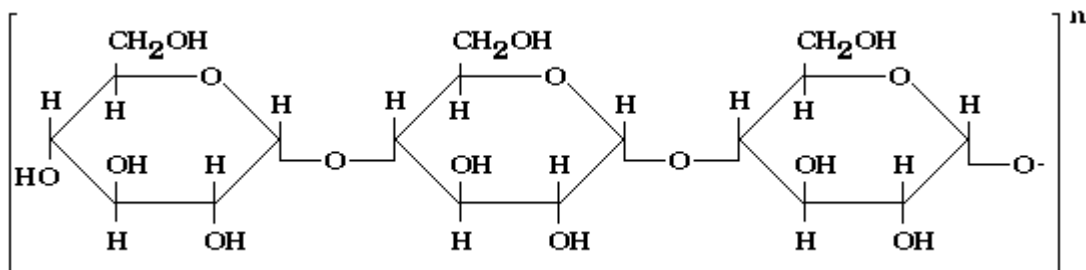


Fig 3. Molécula de amilosa (Rock, J. 2006)

Es importante mencionar que la pulpa de banano que se utiliza contiene un porcentaje de almidón de 20,3%, siendo de interés en nuestro proyecto (Afanador, A. 2005).

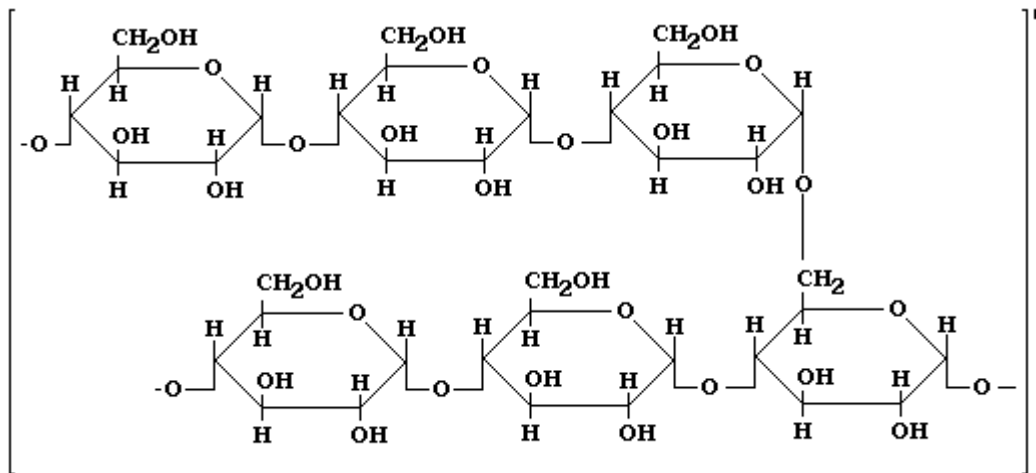


Fig. 4 Molécula de amilopectina (Rock, J. 2006 )

### 2.1.1.2 Pectina

Las pectinas son polisacáridos que se componen principalmente de ácidos poligalacturónicos. Las pectinas son útiles por su capacidad para formar geles o jaleas con compuestos polihidroxilados, como los azúcares o con cantidades diminutas de iones polivalentes (Arroyo, A. 2002).

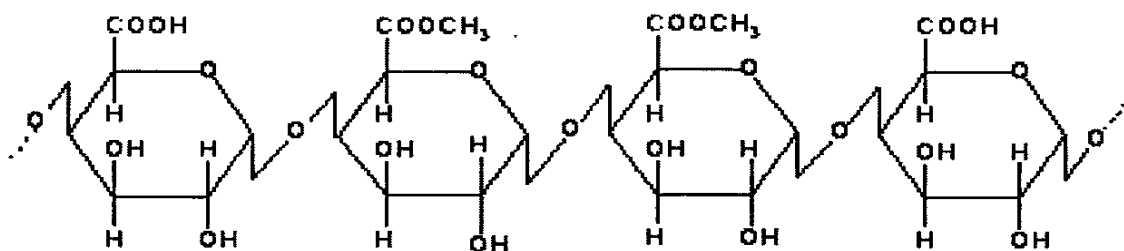


Fig. 5 Molécula de pectina (Soriano, M. 2004)

La pectina tiene función lubricante en la pared celular de las plantas superiores, está involucrada en la textura y maduración de las frutas, en el crecimiento de los vegetales y en la interacción entre plantas huésped y sus patógenos (Soriano, M. 2004).

Se considera que la eliminación de la pectina facilita a las enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas un mayor acceso a los sustratos incrementándose la conversión de la biomasa (Alconada, T. 1992)

### 2.1.1.3 Celulosa

La celulosa es el polímero lineal individual más importante de las plantas, constituyendo entre el 40-50% de la pared celular de la planta, consiste en un monómero de glucosa unida por enlace  $\beta$  (1-4) (Wainwright, M. 1995). La celulosa tiene una estructura lineal o fibrosa en la que se establecen múltiples puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de las distintas cadenas de glucosa, haciéndolas muy resistentes e insolubles al agua; de esta manera se originan fibras compactas que constituyen la pared celular de las células vegetales, dándoles así la necesaria frigidéz.

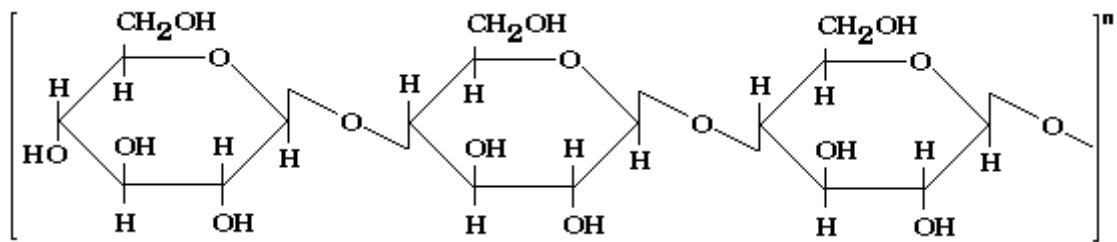


Fig. 6 Molécula de celulosa (Wainwright, M. 1995)

Las fibrillas de celulosa muy empaquetadas y dispuestas en haces paralelos rodean a la célula formando capas cruzadas. Estas fibrillas se hallan aglutinadas por una matriz compuesta de hemicelulosa, proteína y pectina (Paz, V. 1985)

La hemicelulosa está presente en la pared celular de la planta y en ella forma un gel acuoso en el cual están embebidas las microfibrillas de celulosa (Cunningham, R. 1994)

## **2.2 HONGOS**

### **2.2.1. Características generales de los hongos.**

Los hongos constituyen un conjunto de seres vivos que incluye desde organismos unicelulares u organismos pluricelulares macroscópicos. Están formados por células eucariotas con una pared rígida, se caracterizan por ser inmóviles, presentar nutrición heterótrofa por absorción y reproducción asexual y sexual.

Los hongos unicelulares son microscópicos, poseen forma redondeada y se denominan levaduras. La mayor parte de los hongos, sin embargo son pluricelulares, están formados por células cilíndricas alargadas, que se disponen linealmente para constituir largos filamentos, denominados hifas. Todas las hifas al crecer forman micelios (Los Hongos. Apuntes de Microbiología UAB)

La mayoría de los hongos poseen un papel importante en la naturaleza, en la que se hallan ampliamente distribuidos, degradando y reciclando la materia orgánica muerta a merced de sus numerosas potencialidades metabólicas de tipo quimioheterótrofo.

Crece fácilmente en los medios de cultivo convencionales dando lugar a colonias visibles macroscópicamente, con morfología bien diferenciada según están formadas por levaduras u hongos filamentosos (Los Hongos. Apuntes de Microbiología UAB).

### **2.2.2. Estructura celular de los hongos.**

Las células fúngicas son eucariotas, poseen el núcleo y las estructuras propias de estas células, como son el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi, las mitocondrias y un citoesqueleto,

así como ribosomas, en un citoplasma limitado por una membrana celular, recubierta por una pared rígida característica (Los Hongos. Apuntes de Microbiología UAB).

La pared celular de los hongos está formado por capas, constituidas por diversos polímeros polisacáridos fibrilares, como la quitina (polímero  $\beta$  1-4 de N-acetilglucosamina), la celulosa (polímero $\beta$ -1,4 de glucosa) y por estructuras amorfas.

### **2.2.3. Importancia de los hongos.**

Los hongos son la base de muchas fermentaciones y la fuente de muchas enzimas comerciales, como las amilasas y pectinasas; son responsables de la degradación de gran parte de la materia orgánica de la tierra, una actividad enormemente beneficiosa ya que permite el reciclaje de la materia viva (García R. 2008).

Los hongos de uso industrial deben producir la sustancia de interés, estar disponible en cultivo puro; y crecer en cultivos a gran escala, que origine el producto deseado en un corto período de tiempo (Lexur, 2007)

En la etapa de crecimiento o trofofase, el hongo crece exponencialmente. Al consumirse un nutriente, la velocidad de crecimiento disminuye y comienza la fase de almacenamiento en la cual comienza la síntesis de metabolitos secundarios y la fase de mantenimiento donde la producción de metabolitos secundarios disminuye (Forchiassin, F. 1999)

Un ejemplo de producción de metabolitos secundarios de interés industrial, es el que se obtiene de los residuos del cultivo del plátano al emplearse como sustrato en un proceso de fermentación en estado sólido (Granda, D. 2005).

## 2.3 Actividad enzimática

Las enzimas son catalizadores biológicos que permiten que las reacciones químicas del metabolismo celular ocurran a una velocidad significativa, en condiciones ambientales extremadamente suaves (Illanes, A. 1994)

### 2.3.1 Enzimas amilolíticas

Las amilasas hidrolizan moléculas de almidón liberando diversos productos, incluido polímeros compuestos de unidades de glucosa. Las amilasas se dividen en tres grupos:  $\alpha$ -amilasa,  $\beta$ -amilasas y glucoamilasas (Rigon, M. 2005)

#### $\alpha$ – Amilasa

La  $\alpha$  – amilasa rompe al azar los enlaces en el interior del sustrato (endoamilasas) las cuales hidrolizan ordenadamente unidades de maltosa a partir de los extremos no reductores del sustrato (exoamilasa) y glucoamilasas que liberan unidades de glucosa a partir de los extremos no reductores del sustrato (Carrera, J. 2003)

La  $\alpha$  – amilasa está distribuida ampliamente en los microorganismos que hidrolizan enlaces  $\alpha$ -1,4 glicosídicos de la amilosa, amilopectina y glucógeno, pero los enlaces  $\alpha$ -1,6 glicosídicos de la cadena ramificada de los polímeros del almidón no son atacados.

La hidrólisis de la amilosa por  $\alpha$ -amilasa causa una conversión en glucosa, maltosa y maltotriosa (Vargas, A. Silver, L.)

### 2.3.2 Enzimas pectinolíticas

Las enzimas pectinolíticas son producidas en grandes cantidades por numerosos microorganismos asociados en forma patógena a las plantas (Bateman, 1966, Rombouts, 1980)

Las pectinasas presentan gran diversidad, debida en parte a la compleja naturaleza del sustrato degradado. Las plantas y los microorganismos son los principales productores de estas enzimas (Naidu y Panda, 1998)

#### **Polimetilgalacturonasa**

Degradan el polímero metilado, la pectina. Son producidas por algunos hongos, bacterias y plantas superiores (Sawada et al., 2001).

#### **Poligalacturonasa**

Degradan la pectina desmetilada, es decir el ácido poligalacturónico. Las poligalacturonasas rompen los enlaces glucosídicos  $\alpha$  (1-4) mediante hidrólisis, creándose dos moléculas similares a la original aunque de menor tamaño debido a la aparición de un nuevo residuo terminal reductor (Rodríguez, P.)

#### **Pectin liasa**

Sirve para aumentar la cantidad de pectina natural de las frutas y verduras (Cortes, A.)

Son sintetizadas mayoritariamente por hongos, aunque también son identificados en bacterias (Kozianowski et al., 1997).

#### **Pectato liasa**

Están ampliamente distribuidas entre los microorganismos patógenos de plantas y son el objeto de diferentes estudios debido a su posible papel como factores de virulencia. Estas enzimas actúan a pH alcalino 8-10 y requieren calcio para la actividad enzimática (Cavalitto, S. 2003)

## **2.4 APLICACIONES INDUSTRIALES**

### **2.4.1 Amilasas**

Estas enzimas tienen diferentes aplicaciones en la industria, se utilizan para modificar las características naturales de los almidones, es así que en panadería y molinería se utiliza para la reducción de la viscosidad de las pastas, aceleración del proceso de fermentación, incremento del volumen de pan, mantenimiento de frescura y suavidad, incremento de volumen de masa. En cervecera para el proceso de malteado (Vargas, L.)

El banano es considerado como una materia prima potencial para la industria del bioetanol dado que tiene un alto contenido de almidón (20.3%), el cual mediante hidrólisis se convierte en azúcares fermentables (Afanador, A. 2005).

#### **2.4.2 Pectinasas**

Industria Juguera; el jugo de frutas por prensado, presenta turbiedad debido a la presencia de restos de tejidos, el agregado de estas enzimas promueve la degradación de la capa externa de pectina permitiendo la exposición sobre la superficie de las proteínas contenidas en su interior, aumenta el rendimiento del jugo extraído y facilita su procesado (Cavalitto, S. 2003).

Las enzimas pectinolíticas producen modificación de la estructura de la pared celular, incrementándose la accesibilidad de los componentes en la degradación hacia otras enzimas (Alconada, T. 1920), estas enzimas son de gran importancia en la producción de azúcares fermentables porque catalizan el desdoblamiento de uniones glucosídicas  $\alpha$ - (1,4) de cadenas de pectina, que contiene la pulpa de banano.

Los microorganismos pectinolíticos producen diferentes enzimas pécticas según el sustrato el mecanismo y el patrón de acción.



### **2.4.3. Azúcares fermentables**

Los azúcares fermentables son el resultado de la degradación de cadenas largas de carbohidratos, transformando el almidón en cadenas cortas de glucosa (Dela, J. 2006).

La producción de glucosa, tiene algunas aplicaciones en las industrias de la alimentación y farmacéuticas (Ballesteros, E. 2008).

Los polisacáridos presentes en el banano de rechazo, pueden ser convertidos a azúcares fermentables, por procesos hidrolíticos. Estos azúcares pueden ser convertidos a alcohol, utilizando prácticas biotecnológicas simples y muy conocidas, fermentación (Grupo Interdisciplinario de estudios moleculares GIEM).

Una de las más grandes aplicaciones biotecnológicas de los azúcares fermentables obtenidos en nuestra investigación, es el etanol; el cual puede utilizarse como combustible (Oliva, J. 2003).

## **2.5 Composición química del banano “Cavendish Valery”**

Los bananos verdes contienen del 20 – 22% de la materia seca, principalmente en forma de almidón. Cuando estas maduran el almidón se convierte en azucares simples como: sacarosa, fructuosa y glucosa. Los azúcares presentes en la pulpa de banano maduro, son fácilmente asimilables. Los principales son sacarosa (66%), glucosa (20%) y fructuosa (14%) (Hurtado, F. 2001).

**Tabla 1.** Análisis de pulpa de banano: Cavendish Valery

	<b>Pulpa</b>
Proporción en peso	57.0
Humedad	73.3
Azúcares reductores	0.16
Sacarosa	2.1
Polisacáridos fácilmente hidrolizables	26.6
Almidón	20.3

Fuente: Lizuka et. Al. (1985)

Polisacáridos fácilmente hidrolizables: glucógeno, celulosa, quitina, pectina (Calderon, B. 2005)

## **2.6 Descripción de los Pretratamientos**

El objetivo de los pretratamientos para obtener azúcares fermentables es aumentar la susceptibilidad del material para obtener un sustrato lignocelulósico reactivo que sea altamente accesible al ataque del carácter microbiológico y enzimático en el contexto de la utilización o procesamiento bioquímico de los mismos (Cunningham, R. 1994).

Además los pretratamientos consiguen remover total o parcialmente la lignina y la hemicelulosa y reducir el tamaño de las partículas de material (Medel, F.)

- a) Pretratamientos Físicos;** se dividen en mecánicos, como molienda y troceado. Molienda, aumenta la superficie específica y la densidad aparente, facilitando la hidrólisis posterior (Oliva, J. 2003). Troceado, reduce el tamaño de las partículas del material (Pacheco, F 2005).
- b) Pretratamientos Físicoquímicos;** incluye el pretratamiento hidrotérmico, el cual logra el fraccionamiento selectivo de cada uno de los tres componentes poliméricos que constituye la biomasa lignocelulósica (Cunningham, R. 1994).

- c) **Pretratamientos Químicos:** el objetivo de estos pretratamientos es solubilizar la fracción de lignina y modificar la estructura de la celulosa facilitando la acción de las enzimas al sustrato (Ballesteros, M. 2003).
- d) **Pretratamientos Biológicos:** el material lignocelulósico se somete a la acción de determinados microorganismos, el objetivo es degradar la lignina y la hemicelulosa, eliminando las barreras que protegen la celulosa y haciéndola más accesible al posterior ataque enzimático (Ballesteros, M. 2003).

### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Diseño experimental

Se utilizó el diseño factorial, de acuerdo a los 3 pretratamientos, 3 concentraciones y las 3 especies fúngicas, con un total de 27 tratamientos por tres repeticiones, dando un total de 81 ensayos.

#### 3.2 Aislamiento de Especies fúngicas

La recolección de las especies fúngicas se realizó en la provincia de El Oro, en los siguientes cantones:

**Tabla 2.** Recolección de especies fúngicas

<b>Cantón</b>	<b>Hacienda</b>	<b>msnm</b>
El Guabo	La Soledad	9
Pasaje	Corralitos	12
Arenillas	Fabiola	17

Fuente: Datos experimentales  
Elaboración: La Autora

Las muestras fúngicas se tomaron de troncos, frutos en descomposición, esporas del ambiente, endófitos del follaje del banano y plantas cercanas, que fueron aisladas en medio MYP, (Anexo 1.1), con el fin de obtener cepas puras e iniciar screening enzimático.

El procedimiento para aislar endófitos se encuentra en el Anexo 1.4

#### 3.3 Recolección del Banano de rechazo

La recolección del banano de rechazo se realizó en los mismos sectores de la toma de muestras fúngicas.

**Lavado:** El banano recolectado es lavado con abundante agua.

**Troceado:** la pulpa de banano es cortada en círculos de 0.5 cm.

**Secado:** en una estufa a 50°C, con la finalidad de detener la maduración y obtener una materia prima más homogénea.

A la vez este procedimiento nos permite reducir la actividad de agua y disminuir el riesgo de contaminación de la materia prima durante el almacenamiento.

### **3.4 Evaluación cualitativa de Enzimas amilolíticas , pectinolíticas y celulolíticas**

Se evaluó cualitativamente las especies aisladas buscando una actividad enzimática importante.

#### **a) Enzimas amilolíticas**

Se utiliza como inductor banano en tres concentraciones 1, 5, 10% y como revelador lugol al 0.4%. Este es colocado en el medio MYP, zonas claras alrededor de la colonia es el indicador preliminar de presencia de enzimas amilolíticas.

#### **b) Enzimas pectinolíticas**

El inductor es banano en tres concentraciones 1, 5,10% y como revelador azul de bromotimol al 0.1%. Un cambio de coloración es el indicador preliminar de presencia de enzimas pectinolíticas.

#### **c) Enzimas celulolíticas**

Para la detección de enzimas celulolíticas se realiza un ensayo cualitativo, en medio basal agarizado con tiras de papel filtro (MN615.Φ185mm), a una concentración del 5, 10%, crecimiento del micelio es el indicador de enzimas celulolíticas.

### **3.5 Fermentación**

Se realizo en matraces de 250ml, se coloca 100ml de medio basal (Anexo 1.2) y se suplementa con las concentraciones de sustrato establecidas para cada experimentación: 1%, 5%,10% de pulpa de banano, esto se realiza para cada pretratamiento: troceado, molienda e hidrotérmico y para cada hongo escogido.

En los medios estériles se inocula un disco de agar de 1 cm de  $\Phi$ , que contiene micelio fúngico, se incuba a T de 30°C con agitación de 125 rpm, desde el primer día de incubación se toman muestras del fermentado para determinar la actividad enzimática y glucosa.

### **3.6 Evaluación cuantitativa de enzimas amilolíticas y pectinolíticas**

#### **3.6.1. Enzimas amilolíticas**

Para evaluar cuantitativamente la actividad amilolítica se aplica el respectivo protocolo para la enzima:  $\alpha$  – amilasa (Álvarez, T. 1998).

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que oxida 1 umol de sustrato en un minuto y se expresa en unidades por litro.

#### **Amilasa**

##### **Solución A:**

Solución de almidón al 0.05% en buffer fosfato 0.1m pH 7. El buffer es preparado con ClNa 0.15M

### **Solución B:**

Solución de yodo 0.01N de yodo molecular HCl 0.02M

### **Procedimiento:**

- Marcar 2 tubos de ensayo con patrón (P) y muestra (M) cada uno.
- Colocar a cada tubo 1ml de solución A e incubar en baño María a 30°C por 5min.
- Agregar 20µL de muestra (sobrenadante) al tubo M, mezclar en vortex por 2 segundos e incubar a 30°C por 10min en baño María.
- Añadir 1ml de solución B y dejar reaccionar por 1 min.
- Añadir 8ml de agua destilada a los tubos y mezclar en vortex por 2 segundos y Leer a 640nm.

Amilasa (UA/ml) =  $10 \cdot (A \text{ patrón} - A \text{ muestra}) / A \text{ patrón}$

### **3.6.2. Enzimas pectinolíticas**

Para evaluar cuantitativamente la actividad pectinolítica se aplica el respectivo protocolo para cada enzima: polimetilgalacturonasa, poligalacturonasa, pectin liasa y pectato liasa (Forchiassin, F. 1999).

#### **Polimetilgalacturonasa**

**Sustrato:** pectina 0.1% en buffer acetato de sodio pH 5.5 0.1M

#### **Reacción:**

- 0.4ml sustrato + 0.1ml enzima
- 0.4ml buffer acetato +0.1ml enzima (blanco de sobrenadante)
- 0.4ml sustrato + 0.4ml buffer (blanco de sustrato) en baño a 50°C por 30min
- La reacción se debe parar inmediatamente (agregando Somogy)
- Continuar con Somogy Nelson. Leer a 540nm, contra blanco.

(UE/ml) =  $\text{abs} \cdot \text{factor} \cdot 10(\text{dilución}) / 194(\text{PM galacturónico}) \cdot 30(\text{tiempo})$

#### **Poligalacturonasa**

**Sustrato:** ácido galacturónico

**Reacción:**

- 0.4ml sustrato + 0.1ml enzima
- 0.4ml buffer acetato +0.1ml enzima (blanco de sobrenadante)
- 0.4ml sustrato + 0.4ml buffer acetato (blanco de sustrato) en baño a 50°C por 30min
- La reacción se debe parar inmediatamente agregando Somogy Nelson
- Leer a 540nm, contra blanco.

$$(\text{UE/ml}) = \text{abs} * \text{factor} * 10(\text{dilución})/194(\text{PM galacturónico}) * 30(\text{tiempo})$$

**Pectin liasa**

**Reacción:**

- 1ml de pectina 1.2% en buffer tris- HCL 50Mm, pH 8
- Adicionar 670µL de sobrenadante, incubar una hora 30°C
- 0.5ml HCl 1N
- Agregar 1ml de TBA (ácido tiobarbitúrico) 0.04M
- Hervir 20 min
- Leer a 550nm, contra blanco.

**Blanco:** enzima hervida 10min

**Pectato liasa**

**Sustrato:** ácido poligalacturónico 1.2%, en buffer Tris HCl 50 mM pH 8.

**Reacción:**

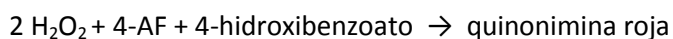
- 670µL de sobrenadante, incubar 1h 30°C
- 0.5 ml HCl 1N
- 1 ml de TBA 0.04M hervir 20min
- Leer 550nm



### 3.7 Cuantificación de glucosa

La determinación de glucosa se realiza por métodos enzimáticos y espectrofotométricos.

El esquema de reacción es el siguiente:



Para la determinación de glucosa se utilizan 3 tubos de reacción: B (Blanco), S (estándar) y D (desconocido).

#### Reactivos:

Solución estándar: glucosa 1 g/l

Reactivo de trabajo: glucosa oxidasa (GOD), peroxidasa (POD), 4 – aminofenazona (4 – AF) y buffer fosfato pH: 7.0.

#### Desarrollo de la Técnica

**Tabla 3.** Técnica de glucosa

	<b>B</b>	<b>S</b>	<b>M</b>
<b>Estándar</b>	----	10 ul	----
<b>Muestra</b>	----	----	10 ul
<b>Rvo. De Trabajo</b>	1 ml	1 ml	1 ml

Fuente: Datos experimentales  
Elaboración: La Autora

Incubar 8 minutos en Baño María a 37 °C. Luego leer en espectrofotómetro a 505 nm. Llevar a cero con el blanco.

#### Cálculos

$$\text{Glucosa g/l} = D * f$$

$$\text{Factor (f)} = 1.00 \text{ g/l} / S$$

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análisis Estadístico de Resultados

Una vez conocidas las medias de los datos con su respectiva desviación estándar para las tres especies fúngicas, a las tres concentraciones de sustrato y con los tres pretratamientos, se realizó el análisis estadístico utilizando el programa XLSTAT versión 7.5 y se obtuvo los siguientes resultados:

HIPÓTESIS 1.

**H<sub>0</sub>**: El pretratamiento aplicado a la pulpa no influye en el rendimiento de glucosa obtenida.

**H<sub>i</sub>**: El pretratamiento aplicado a la pulpa influye en el rendimiento de glucosa obtenida.

HIPÓTESIS 2.

**H<sub>0</sub>**: La concentración de sustrato influye en la producción de las enzimas amilolíticas

**H<sub>i</sub>**: La concentración de sustrato no influye en la producción de las enzimas amilolíticas.

HIPÓTESIS 2.1.

**H<sub>0</sub>**: La concentración de sustrato influye en la producción de las enzimas pectinolíticas

**H<sub>i</sub>**: La concentración de sustrato no influye en la producción de las enzimas pectinolíticas.

HIPÓTESIS 3.

**H<sub>0</sub>**: Las tres especies de hongos no poseen el mismo nivel de degradación de pulpa.

**H<sub>i</sub>**: Las tres especies de hongos poseen el mismo nivel de degradación de pulpa.

#### 4.1.1. Pruebas de comparaciones múltiples para la variable pretratamiento (glucosa)

**Tabla 4.** Análisis de las diferencias entre grupos con un intervalo de confianza de 95.00 %.

Prueba de Duncan

<b>Categorías</b>	<b>Diferencia</b>	<b>Diferencia estandarizada</b>	<b>Valor crítico</b>	<b>Pr.&gt;Dif</b>	<b>Significativo</b>
Hidrotérmico	4.490	28.093	2.445	<0.0001	No
Troceado	0.972	0.007	2.440	1.000	Si
Molienda	0.916	0.003	2.445	<0.0001	Si

Fuente: Datos experimentales

Elaboración: La Autora

**Tabla 5.** Ordenación y agrupamiento de los grupos no significativamente diferentes:

<b>Categorías</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupamientos</b>
Hidrotérmico	4.858	A
Troceado	1.007	B
Molienda	0.985	B

Fuente: Datos experimentales

Elaboración: La Autora

Con un intervalo de confianza del 95% y al aplicar la prueba de Duncan respectiva, para establecer la diferencia que existe en el pretratamiento aplicado a la pulpa en la producción de glucosa, se puede apreciar que no existe diferencia significativa entre el pretratamiento troceado y molienda, pero si existe diferencia significativa entre estos pretratamientos con el pretratamiento hidrotérmico . Por tanto la hipótesis nula  $H_0$  planteada para la hipótesis 1 se rechaza, demostrando que el pretratamiento aplicado a la pulpa influye en el rendimiento de glucosa obtenida.

**4.1.2. Pruebas de comparaciones múltiples para la variable concentración de sustrato (producción amilolítica).**

**Tabla 6.** Análisis de las diferencias entre grupos con un intervalo de confianza de 95.00 %. Prueba de Duncan

Categorías	Diferencia	Diferencia estandarizada	Valor crítico	Pr.>Dif	Significativo
1%	0.640	1.577	2.420	0.941	No
10%	4.428	19.079	2.420	<0.0001	Si
5%	3.853	5.299	2.395	0.0	Si

Fuente: Datos experimentales  
Elaboración: La Autora

**Tabla 7.** Ordenación y agrupamiento de los grupos no significativamente diferentes:

Categorías	Media	Agrupamientos
1%	0.853	A
10%	8.033	B
5%	6.537	B

Fuente: Datos experimentales  
Elaboración: La Autora

La hipótesis nula  $H_0$  planteada para la hipótesis 2 se acepta, ya que la concentración de sustrato influye en la producción de enzimas amilolíticas. En la tabla 6 y 7 se observa que no hay diferencia significativa en cuanto a la actividad enzimática a una concentración de 10% y 5%, pero si existe diferencia significativa entre estas concentraciones y la concentración 1%.

**4.1.3.** Pruebas de comparaciones múltiples para la variable concentración de sustrato (producción pectinolítica).

**Tabla 8.** Análisis de las diferencias entre grupos con un intervalo de confianza de 95.00 %. Prueba de Duncan

<b>Categorías</b>	<b>Diferencia</b>	<b>Diferencia estandarizada</b>	<b>Valor crítico</b>	<b>Pr.&gt;Dif</b>	<b>Significativo</b>
10%	236.232	88.824	2.411	<0.0001	Si
5%	112.267	52.097	2.321	<0.0001	Si
1%	0.154	31.093	2.421	<0.0001	Si

Fuente: Datos experimentales  
Elaboración: La Autora

**Tabla 9.** Ordenación y agrupamiento de los grupos no significativamente diferentes:

<b>Categorías</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupamientos</b>
10%	262.667	A
5%	136.967	B
1%	0.145	C

Fuente: Datos experimentales  
Elaboración: La Autora

La hipótesis nula  $H_0$  planteada para la hipótesis 2.1 se acepta, ya que la concentración de sustrato influye en la producción de enzimas pectinolíticas. En la tabla 8 y 9 se observa que hay diferencia significativa en cuanto a la actividad enzimática.

#### 4.1.4. Pruebas de comparaciones múltiples para la variable hongo (producción enzimática)

**Tabla 10.** Análisis de las diferencias entre grupos con un intervalo de confianza de 95.00 %.

Prueba de Duncan

Categorías	Diferencia	Diferencia estandarizada	Valor crítico	Pr.>Dif	Significativo
70M	346.293	92.96	2.440	0.252	Si
110M	36.833	43.414	2.286	<0.0001	Si
138M	4.078	17.571	2.404	<0.0001	Si

Fuente: Datos experimentales  
Elaboración: La Autora

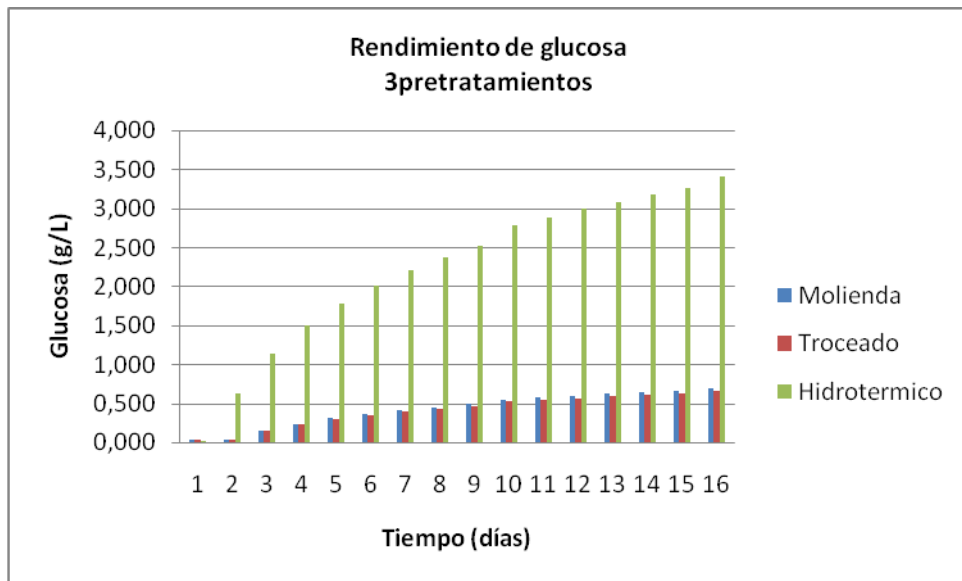
**Tabla 11.** Ordenación y agrupamiento de los grupos no significativamente diferentes:

Categorías	Media	Agrupamientos
70M	204.858	A
110M	136.967	B
138M	8.583	C

Fuente: Datos experimentales  
Elaboración: La Autora

Con un intervalo de confianza del 95% y al utilizar la prueba de Duncan respectiva, para establecer si las tres especies fúngicas poseen el mismo nivel de degradación de pulpa, se determinó que existe diferencia significativa entre las tres especies. Por lo tanto la hipótesis nula  $H_0$  planteada para la hipótesis 3 se acepta, demostrando que las tres especies no poseen el mismo nivel de degradación de pulpa.

#### 4.1.5. Rendimiento en glucosa obtenida

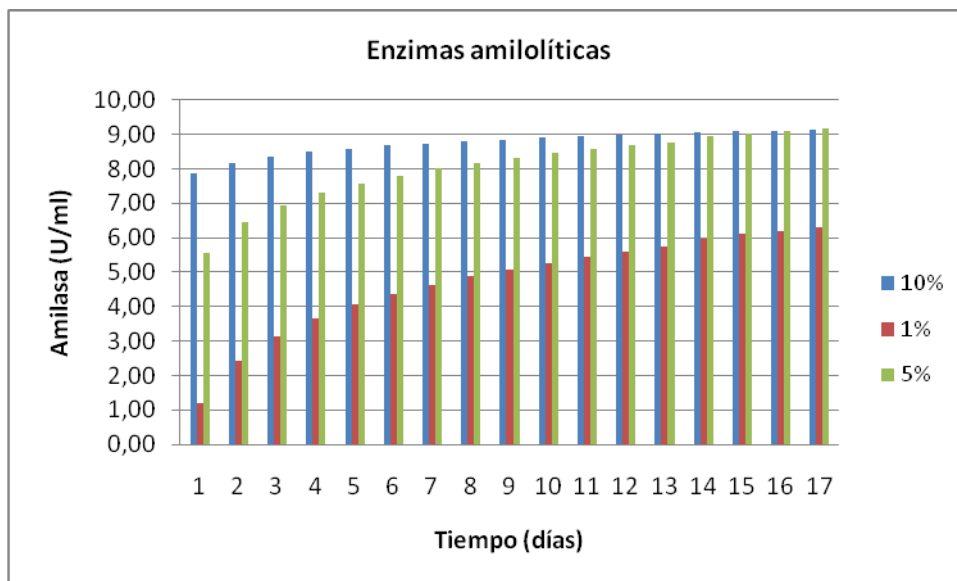


**Grafico 1.** Rendimiento de glucosa a los 3 pretratamientos.

El mejor resultado de glucosa se lo obtuvo con el pretratamiento hidrotérmico con 4.88 g/L, seguido del pretratamiento troceado con 1.035 g/L y el pretratamiento molienda con 0.984 g/L (Grafico 1).

#### 4.1.6. Producción de enzimas amilolíticas: 3 concentraciones, 3 pretratamientos, 3 hongos

Se evaluó la producción de las enzimas amilolíticas ( $\alpha$ -amilasas) de los fermentados fúngicos, utilizando pulpa de banano como sustrato en medio basal. Se encontró la mayor actividad con el tratamiento hidrotérmico, concentración de sustrato 10%, hongo 138M en el día 16 a partir de ese día la actividad se mantiene constante. La actividad de los mejores pretratamientos se detallan a continuación:



**Grafico 2.** Actividad amilolítica para los mejores pretratamientos con sus respectivas concentraciones.

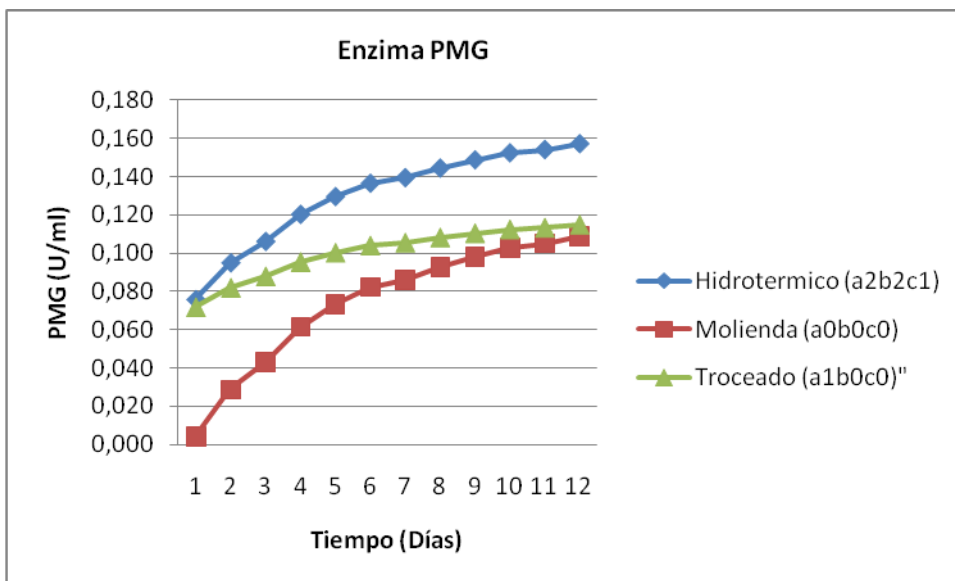
A una concentración de 10% se obtuvo valores máximos de 9.99 UA/ml en el día 16 de la fermentación, a una concentración de 5% valores máximos de 9.86 UA/ml el día 18, finalmente a una concentración de 1% la producción máxima fue de 9.85 UA/ml (Grafico 2).

#### 4.1.7. Producción de enzimas pectinolíticas: 3 concentraciones, 3 pretratamientos, 3 hongos.

Se evaluó la producción de las enzimas pectinolíticas de los fermentados fúngicos, utilizando pulpa de banano como sustrato en medio basal. La actividad de los mejores pretratamientos de cada enzima se indica a continuación:

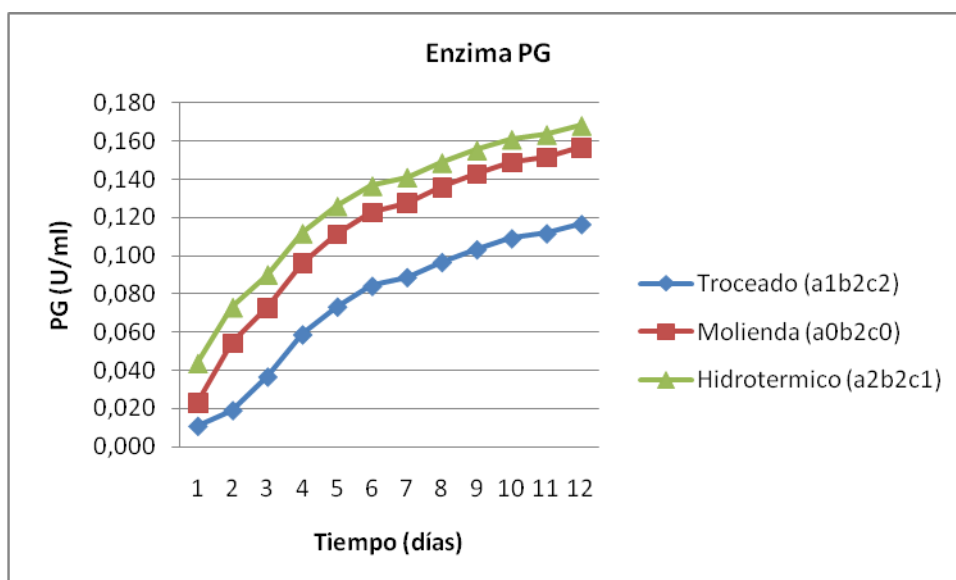
- ✓ Enzima polimetilgalacturonasa, mejor actividad 0.193 UE/ml con el pretratamiento hidrotérmico, hongo 110M, concentración de sustrato de 10%. La mayor actividad para el pretratamiento troceado y molienda es 0.183 UE/ml y 0.156 UE/ml (Grafico 3).





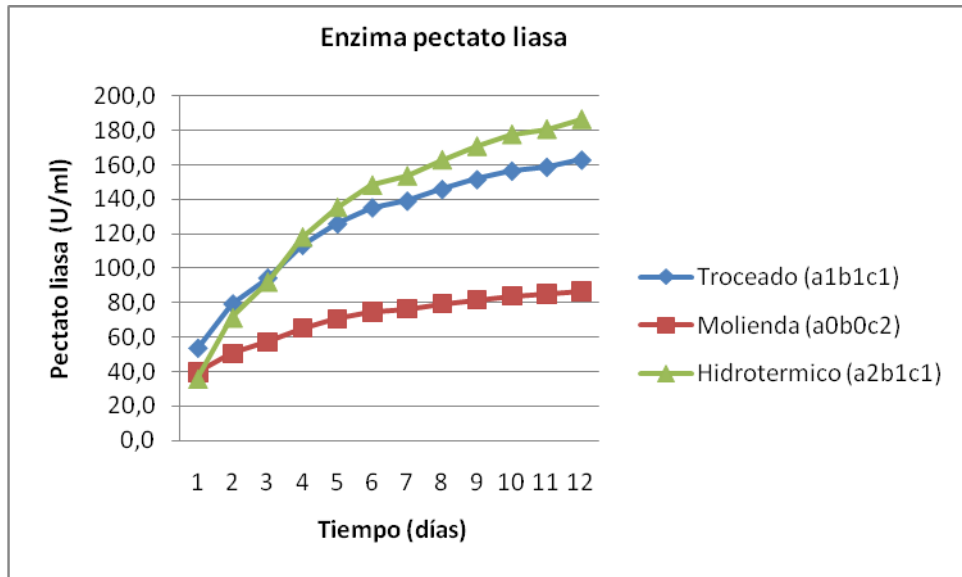
**Grafico 3.** Actividad polimetilgalacturonasa

- ✓ Enzima poligalacturonasa, mejor actividad 0.254 UE/ml con el pretratamiento hidrotérmico, hongo 110M, concentración de sustrato de 10%. La mayor actividad para el pretratamiento molienda y troceado es 0.227 UE/ml y 0.144 UE/ml (Grafico 4).



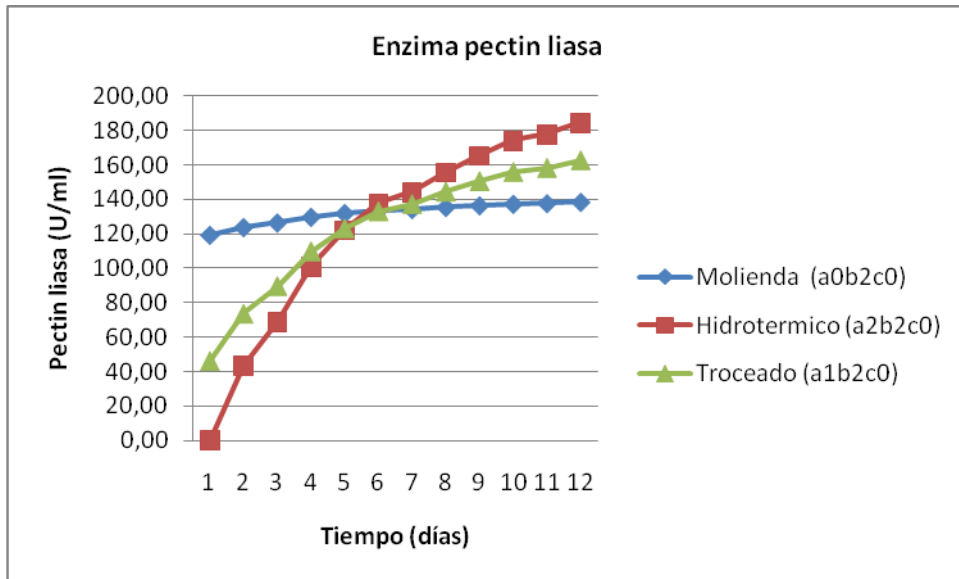
**Grafico 4.** Actividad poligalacturonasa

- ✓ Enzima pectato liasa, mejor actividad 188.07 UE/ml con el pretratamiento hidrotérmico, hongo 110M, concentración de sustrato de 5%. La mayor actividad para el pretratamiento troceado y molienda es 158.1 UE/ml y 129.27 UE/ml (Grafico 5).



**Grafico 5.** Actividad Pectato liasa

- ✓ Enzima pectin liasa, mejor actividad 262.70 UE/ml con el pretratamiento hidrotérmico, hongo 70M, concentración de sustrato de 10%. La mayor actividad para el pretratamiento troceado y molienda es 261.33 UE/ml y 192.33 UE/ml (Grafico 6).



**Grafico 6.** Actividad Pectin liasa

## 5 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

- Del muestreo microbiológico realizado en los cultivos bananeros se obtuvo 90 aislamientos fúngicos, de los cuales los cualitativamente positivos para las enzimas de interés están siendo caracterizados molecularmente por el área de Biodiversidad Molecular del CBCM.
- Al ser el banano un recurso vegetal, a nivel de su pared celular se encuentra formada por lignina, celulosa y pectina, biomoléculas que son variables entre estructuras vegetales de diferentes especies, por lo que hemos escogido hongos que degraden estos compuestos y nos permitan un mejor rendimiento en glucosa que es el metabolito de nuestro interés. Además de determinar cómo influye la sinergia de estos en la degradación de la pulpa, los resultados se presentan en anexo 2 tabla 19. De acuerdo al tamizaje enzimático realizado se escogieron 3 hongos que presentaron los siguientes resultados:

**Tabla 12.** Tamizaje Enzimático

Hongo	Actividad positiva
70M	amilolítica y celulólitica
110M	amilolítica y pectinolítica
138M	amilolítica, celulólitica y ligninolítica*

Fuente: Datos experimentales  
Elaboración: La Autora

\*La actividad ligninolítica es otra de las cualitativas que se realizó y se incluyó este hongo para determinar el efecto en las variables respuesta de la enzima ligninolítica

- Se determinó parámetros antes y después de la fermentación para evaluar la cantidad de biomasa degradada, obteniéndose los siguientes resultados:

**Tabla 13.** Porcentaje biomasa degradada

Parámetro a evaluar	Valor antes fermentación	Valor después fermentación	Tratamiento
% almidón en pulpa	20%	1,85	H-1%-110M
		2,07	T-5%-70M
		2,27	M-1%-138M

Fuente: Datos experimentales

Elaboración: La Autora

- En cuanto al porcentaje de almidón luego del proceso de fermentación fúngica vemos que la mejor degradación corresponde al pretratamiento hidrotérmico, al 1%, con el hongo 110M, con una reducción de almidón desde la muestra original de 90.93%, pero en este punto no cabe desestimar los resultados obtenidos por el hongo 70 M, en el sentido que la cantidad de sustrato es cinco veces mayor comparada con el hongo 110M con una reducción de almidón desde la muestra original del 89.64%. La cantidad de azúcares fermentables obtenida es baja, 4.8 g/L , valor que se puede dar porque el hongo está usando a la glucosa como fuente de carbono y energía, pero existe una considerable degradación del almidón que está en el orden del 90% por lo que se puede usar esta actividad enzimática para probar procedimientos de sacarificación y fermentación simultánea.
  
- La actividad amilolítica fue determinada para pulpa de banano obteniéndose los siguientes resultados:

**Tabla 14.** Unidades enzimáticas amilasa

Tratamiento	Día de fermentación	Amilasa(UA/ml)
H/10%/138M	16	9,99
H/1%/110M	17	9,88
M/10%/70M	18	9,86
T/1%/70M	12	9,85

Fuente: Datos experimentales

Elaboración: La autora

A más de la actividad reportada por el tratamiento hidrotérmico, concentración de sustrato 10%, hongo 138M que es de 9.99 UA/ml, se considera importante la actividad del hongo 70M ya que el pretratamiento usado es troceado frente a hidrotérmico, lo cual significa un considerable ahorro en el costo de operación. Los resultados de todos los tratamientos se encuentran en anexo 2 tabla 21.

Al revisar en artículos científicos la producción de amilasas en cultivo sumergido, se encuentra resultados superiores lo cual indica que con la actividad obtenida se logro el 71.35% de degradación a los obtenidos en nuestro proyecto, por ejemplo se realizaron estudios utilizando como sustrato almidón de yuca, a T=30°C donde se obtiene 14 UA/ml y 15.7 UA/ml los dos con diferentes especies de hongos.

- La actividad polimetilgalacturonasa fue determinada para pulpa de banano obteniéndose las unidades enzimáticas más altas para los siguientes tratamientos:

**Tabla 15.** Unidades enzimáticas PMG

<b>Tratamientos</b>	<b>Día de Fermentación</b>	<b>PMG(UE/ml)</b>
T-1%-70M	17	0,18
T-10%-110M	17	0,18
M-1%-70M	12	0,15
H-10%-110M	12	0,19

Fuente: Datos experimentales  
Elaboración: La Autora

A más de la actividad reportada por el tratamiento hidrotérmico, 10%, hongo 110M que es de 0.19 UE/ml, se considera importante la actividad del hongo 70M ya que el pretratamiento usado es troceado frente a hidrotérmico, lo cual significa que el pretratamiento troceado genera menos costos en relación al hidrotérmico, donde se emplea más tiempo y gastos energéticos. Los resultados de todos los tratamientos se encuentran en anexo 2 tabla 22.

Al realizar las comparaciones con otros artículos científicos la producción de PMG en cultivo sumergido, se encuentra los siguientes resultados: utilizando paja de arroz como sustrato, a T=40°C 0.10 UE/ml y 0.21 UE/ml los dos resultados se obtienen con diferentes especies.

Con esto se confirma que las unidades enzimáticas obtenidas con un valor de 0.19 UE/ml tienen aproximación utilizando pulpa de banano como sustrato.

- La actividad poligalacturonasa fue determinada para pulpa de banano obteniéndose las unidades enzimáticas más altas para los siguientes tratamientos:

**Tabla 16.** Unidades enzimáticas PG

<b>Tratamiento</b>	<b>Día de Fermentación</b>	<b>PG(UE/ml)</b>
T-10%-38M	14	0,14
M-10%-70M	16	0,27
H-10%-110M	10	0,25

Fuente: Datos experimentales  
Elaboración: La Autora

A más de la actividad obtenida por el tratamiento hidrotérmico, 10%,110M que es de 0.254 UE/ml. También se considera importante la actividad del hongo 70M ya que el pretratamiento usado es molienda frente a hidrotérmico lo cual significa un ahorro, ya que difieren uno del otro en costos de producción. Los resultados de todos los tratamientos se encuentran en anexo 2 tabla 23.

Al realizar las comparaciones con otros artículos científicos la producción de PG en cultivo sumergido, se encuentra los siguientes resultados: utilizando paja de arroz como sustrato, a T=40°C 0.04 UE/ml y a partir de un sustrato de pulpa de café a T=37°C 3 UE/ml.

En este caso las unidades enzimáticas varían de acuerdo al sustrato utilizado en 0.04 a 3 UE/ml, los resultados obtenidos para esta enzima se encuentran en este rango con un valor de 0.254 UE/ml.

- La actividad pectato liasa fue determinada para pulpa de banano obteniéndose las unidades enzimáticas más altas para los siguientes tratamientos:

**Tabla 17.** Unidades enzimáticas pectato liasa

<b>Tratamientos</b>	<b>Día de Fermentación</b>	<b>Pectato liasa (UE/ml)</b>
T-5%-110M	17	158,1
M-1%-138M	12	129,27
H-5%-110M	14	188,07

Fuente: Datos experimentales  
Elaboración: La Autora

El pretratamiento hidrotérmico, 5%, hongo 110M que es de 188.07 UE/ml, presenta la mejor actividad pectato liasa, este pretratamiento genera gran consumo de energía, por tal razón se considera importante el hongo 110M con el pretratamiento troceado, tomando en cuenta la relación beneficio/costo del pretratamiento troceado e hidrotérmico. Los resultados de todos los tratamientos se encuentran en anexo 2 tabla 24.

Al revisar en artículos científicos la producción de pectato liasa, se encuentra los siguientes resultados, por ejemplo se realizaron estudios utilizando como sustrato paja de arroz, a  $T=30\text{ }^{\circ}\text{C}$  donde se obtiene 23.38 UE/ml.

El valor obtenido en el proyecto es de 188.07 UE/ml, lo cual nos indica que la pulpa de banano es un buen sustrato para la producción de enzima pectato liasa.



- La actividad pectin liasa fue determinada para pulpa de banano obteniéndose las unidades enzimáticas más altas para los siguientes tratamientos:

**Tabla 18.** Unidades enzimáticas pectato liasa

Tratamientos	Día de Fermentación	Pectin liasa (UE/ml)
T-10%-70M	7	261,33
M-10%-70M	16	192,33
H-10%-70M	12	262,7

Fuente: Datos experimentales  
Elaboración: La Autora

A más de la actividad reportada por el tratamiento hidrotérmico, 10%, 70M que es de 262.7 UE/ml, se considera importante la actividad del hongo 70M en el pretratamiento troceado, 10%, hongo 70M ya que el pretratamiento usado es troceado frente a hidrotérmico, al revisar costos y resultados se aprecia que la diferencia en la actividad enzimática es de 1 UE/ml. Los resultados de todos los tratamientos se encuentran en anexo 2 tabla 25.

En artículos científicos la producción de pectin liasa, se encuentra los siguientes resultados, por ejemplo se realizaron estudios utilizando como sustrato pectina de limón al 1%, a T=30°C donde se obtiene 110 UE/ml, y utilizando paja de arroz, T=40°C se obtiene 47.22 UE/ml, las unidades enzimáticas varían de acuerdo al sustrato empleado.

El valor obtenido en el proyecto es de 262.70 UE/ml, lo cual nos indica que la pulpa de banano es un buen sustrato para la producción de enzima pectin liasa.

- En un estudio realizado se obtiene enzimas pectinasas a través de la pulpa de la uva reportando una actividad de 205 UE/ml con la cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, en este estudio se hace una comparación con pectinasas comerciales las cuales reportan un valor de 720 UE/ml (Vilanova de la Torre, M. González, T. 2002).

- La concentración del sustrato tiene una relación directamente proporcional con la producción enzimática, a mayor concentración de pulpa de banano (10%), mayor actividad enzimática.

Para las amilasas se confirma que a mayor concentración mayor actividad enzimática. Dentro de las pectinasas la enzima polimetilgalacturonasa, poligalacturonasa y pectin liasa se da la mejor actividad a la mayor concentración (10%), únicamente para la enzima pectato liasa la mayor concentración de sustrato se da al 5%.

- La cepa con mayor productividad para producción de glucosa es 110M, para amilasas la mejor cepa es 138M y para pectinasas, polimetilgalacturonasa, poligalacturonasa y pectato liasa la mejor producción se da con la cepa 110M y pectin liasa con la cepa 70M.

Los mejores resultados de actividad enzimática se dan con el pretratamiento hidrotérmico, seguido por el pretratamiento troceado con la cepa 70M, tomando en cuenta el ahorro que existe en el costo de operación se considera importante el hongo 70M.

## 6 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 6.1 Conclusiones

El análisis de resultados realizado luego del proceso de experimentación permite concluir lo siguiente:

- Con el pretratamiento hidrotérmico se ha conseguido un mayor rendimiento en glucosa obtenida, con el tiempo óptimo de 14 días alcanzando un valor de 4.88 g/L de glucosa a una concentración del 10% de sustrato con el hongo 110M.
- El porcentaje de almidón degradado al final de la fermentación es de 90.92% con el tratamiento hidrotermico, 1%, 110M y el hongo 70M reduce el 89.64% a una concentración del 5% usando el pretratamiento troceado.
- Se determinó que la mejor producción de actividad amilolítica se tiene del pretratamiento de explosión a vapor, con un tiempo optimo de producción enzimática de 16 días alcanzando valores máximos de hasta 9,99 unidades enzimáticas por ml a una concentración de 10% de sustrato con el hongo 3(138 M).
- Se determinó que la mejor producción de actividad polimetilgalacturonasa se tiene del pretratamiento hidrotermico, con un tiempo óptimo de 12 días alcanzando un valor de 0.193 unidades enzimáticas por ml a una concentración de 10% de sustrato con el hongo 110M.
- La mejor producción de actividad poligalacturonasa se tiene del pretratamiento hidrotermico, con un tiempo óptimo de 10 días alcanzando un valor de 0.254 UE/ml a una concentración de 10% de sustrato con el hongo 110M.
- Se determino que la mejor producción de actividad pectato liasa se tiene del pretratamiento hidrotérmico, con un tiempo óptimo de 14 días alcanzando un valor de 188.07 UE/ml a una concentración de 5% de sustrato con el hongo 110M.
- La mejor producción de actividad pectin liasa se tiene del pretratamiento hidrotérmico, con un tiempo óptimo de 12 días alcanzando un valor de 262.70 UE/ml a una concentración de 10% de sustrato con el hongo 70M.

- La concentración del sustrato si influye en la producción enzimática, para amilasas la mejor producción 9.99 UA/ml se da al 10% de concentración, y para pectinasas la mejor producción 262.70 UE/ml se da al 10% de concentración de sustrato.
- Se determino que la cepa con mayor productividad es la cepa 70M.

## **6.2 Recomendaciones**

- Ajustar la técnica para la cuantificación de glucosa, modificando las condiciones de reacción: tiempo, volumen de muestra y volumen de reactivo.
- Ensayar nuevos sustratos como los que existen en nuestra región la caña de azúcar, maíz, yuca, para permitir nuevos desarrollos en el conocimiento científico.
- Para posteriores investigaciones es conveniente adoptar una técnica de sacarificación y fermentación simultanea, ya que la presencia de levaduras junto con el complejo enzimático, reduce la acumulación de azúcares en el reactor evitando la inhibición por producto final del complejo enzimático, obteniéndose mayores rendimientos que el proceso de hidrólisis y fermentación separada.

## 7 BIBLIOGRAFÍA:

1. Afanador, A. 2005. El banano verde de rechazo en la producción de alcohol carburante. Revista EIA, ISSN 1237 3p 51 68. Escuela de Ingeniería de Antioquia, Medellín (Colombia).
2. Alconada, T. 1992. Enzimas de *Fusarium oxysporum f. sp. melonis* involucradas en la degradación de la pared celular de las plantas superiores. Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad de Buenos Aires.
3. Álvarez, T Giménez, A. 1998. IIFB Manual de Micología Experimental. Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas.
4. Arenas, A. Sierra, D. 1998. Producción de alcohol carburante a partir de fuentes residuales. Grupo interdisciplinario de Estudios Moleculares GIEM Universidad de Antioquia. Biotropical S.A.
5. Aristegui, B. 2002. El reino de los hongos. Rev Iberoam Micol.
6. Arroyo, A. 2002. Producción de Enzimas pectinasas por actinomicetos en cultivo sumergido utilizando pectina y cascara de naranja. Universidad Nacional de San Marcos. Lima – Perú.
7. Cams, W. Hoekstra, E.S. and Aptroot, A. (1998). CBS Course of Micology.
8. Carrera, J. 2003. Producción y aplicación de enzimas industriales. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad del Cauca, Popayán.
9. Cavalitto, S. 2003. Crecimiento de *Geotrichum Klebahnii* y expresión de protopectina – SE. Universidad Nacional de la Plata, Argentina.
10. Cunningham, R. López, G. 1994. Etanol de Lignocelulosicos. Universidad de Santiago de Compostela, Programa CYTED.
11. Curtis, H. Barnes, N. 1993. Biología. Quinta edición. Buenos Aires. Bogotá.
12. Crueger, W., Crueger, A. Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. Tercera Edición
13. Dela, J. 2006. Energía Renovable - Agricultura Sustentable. México.
14. Diorio, L. Forchiassin, F, Papinutti, V. 2003. Actividad enzimática y degradación de diferentes tipos de residuos orgánicos por *Saccobolus saccoboloides* (Fungi, Ascomycotina). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires Argentina. Rev Iberoam Micol.

15. Feoli, M. Gomez, Z. 1997. Aislamiento y Caracterización con actividad pectinolítica a partir de *Mangifera indica*. Universidad Nacional de Colombia. Rev. Col. Cienc.Quim.
16. Forchiassin, F., Magnelli, P., Diorio, L., Mercuri, O. (1999). Manual de Procedimientos. Segunda Edición. Laboratorio de Micología Experimental. Universidad de Buenos Aires. Argentina.
17. Founwh Edition. Ponsen and Looyen B. V., Wageningen, the Netherlands.
18. Guamán, J. Nalvay, G. (2000) Manual de Bromatología. Loja - Ecuador
19. Grupo Interdisciplinario de Estudios Moleculares GIEM. Biotropical S.A. Universidad de Antioquia. Producción de alcohol carburante a partir de fuentes residuales (Banano de rechazo caso específico).
20. Hibbett, D. 2007. A higher– level phylogenetic classification of the fungi. Science Direct
21. Hurtado, F. 2001. Obtención de hidrolizado proteico utilizando excedentes de la industria pesquera y agrícola. Guayaquil – Ecuador. Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de Producción. Escuela Superior Politécnica del Litoral.
22. Illanes, A. 1994. Biotecnología de Enzimas. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos.
23. Laguna, J. Piña, E. 2002. Bioquímica de Laguna. Quinta edición. manual moderno.
24. Los Hongos. Apuntes de Microbiología. UAB .
25. Oliva, J. 2003. Efecto de los productos de degradación originados por la explosión de biomasa de chopo sobre *Kluyveromyces marxianus*. Universidad Complutense de Madrid.
26. Reddy G.V; Raunindra, P. 2002. Process Biochemistry 38(2003) 1457-1462.
27. Rodríguez, P. García, J. Fibra soluble y su implicación en nutrición animal: enzimas y probióticos. Departamento de Biotecnología Universidad Politécnica de Madrid. XIV curso de especialización avances de nutrición y alimentación animal.
28. Rhodes, A. Fletcher, D. Principios de Microbiología Industrial. Editorial Acribia.
29. Soriano, M. 2004. Análisis de sistemas pectinolíticos bacterianos. Aislamiento y caracterización de las pectinasas PelA de *Paenibacillus* sp. BP – 23 e YvpA de *Bacillus subtilis*. Universidad de Barcelona.
30. U. S. Department of Energy, Breaking the biological barriers to cellulosic ethanol, (2006)
31. Vargas, A. Silver, L. Selección y evaluación de bacterias del genero *Bacillus* productores de amilasa en cultivos sumergidos.

## ANEXO 1.

### PROTOCOLOS Y MEDIOS

#### 1.1. Medio MYP

Extracto de Malta	7 g
Peptona	1 g
Extracto de Levadura	0.5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Mezclar todos los componentes en las cantidades indicadas, esterilizar en autoclave a 121°C por 20 minutos.

#### 1.2. Medio Basal:

MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.5 g	
HK <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.6 g	
H <sub>2</sub> KPO <sub>4</sub>	0.5 g	
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.4 mg	Se agregan en solución 2 ml de Solución A  2 ml de Solución B
MnCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	0.09 mg	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.07 mg	
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.02 mg	
FeCl <sub>3</sub>	1 mg	
ZnCl <sub>2</sub>	2.5 mg	
Agua destilada	Hasta 1000 ml	

Mezclar todos los componentes en las cantidades indicadas, esterilizar en autoclave a 121°C por 20 minutos. Este medio se utiliza en la fase de fermentación.

### 1.3. Determinación de almidón

- ❖ Pesamos 50 gramos de muestra seca y triturada, en un vaso de precipitación de la capacidad 600 ml.
- ❖ Adicionamos 150ml de agua destilada al vaso con muestra y agitamos por 5 minutos.
- ❖ Utilizando filtros de tul doble hacemos pasar la muestra agitada para retener la pulpa y dejamos pasar al almidón, si la muestra aún contiene almidón se le adiciona 50ml de agua y se la vuelve a agitar para de esta manera extraer todo el almidón.
- ❖ La suspensión de almidón obtenida se coloca en un embudo de decantación de 250ml de capacidad, se deja sedimentar por espacio de una hora como mínimo o hasta que haya formado la capa de almidón y agua que permita obtener el almidón.
- ❖ El almidón obtenido se lo lava con 20ml de metanol.
- ❖ Luego filtramos la suspensión a través de un embudo de Buchner y lo dejamos secar al almidón en la estufa por tres horas.
- ❖ Pesamos la cantidad de almidón obtenido.

$$\% A = (\text{peso del almidón obtenido} / \text{peso de la muestra}) \times 100.$$

### 1.4. Aislamiento de hongos endófitos

- ❖ Para el aislamiento de los hongos endófitos, las hojas se lavaron con agua potable y fueron esterilizadas superficialmente por inmersiones consecutivas, durante 1 minuto en etanol 70% (v/v), 10 minutos en hipoclorito de sodio 3% y 30 segundos en etanol 70% (v/v).
- ❖ Para el secado de las hojas se dejó pasar unos minutos bajo la cabina de bioseguridad, cada hoja fue dividida en cuatro partes y mediante técnicas asépticas se cortaron en secciones pequeñas (3-5 mm<sup>2</sup>) entre la nervadura central y el borde de la hoja, con el uso de una tijera esterilizada con alcohol y flameada en el mechero.



- ❖ Después de la esterilización, las secciones correspondientes a cada hoja se inocularon en medio MYP e incubaron a T ambiente.

## 1.5. Preparación de Reactivos y Soluciones

### 1.5.1 Solución de yodo

Yodo metálico	0.2g
Yoduro de potasio	1.0g
Agua destilada	20ml

### 1.5.2 Reactivo de Somogy

**A:** 24g  $\text{CO}_3 \text{Na}_2$  anhidro

12g tartrato sódico potásico

Agua destilada 250ml

**B:** 4g  $\text{SO}_4\text{Cu}_2$  hidratado

Agua destilada 40ml

Agregar B en A agitado

**C:** sobre la mezcla A + B añadir lentamente 16g  $\text{CO}_3\text{HNa}$

**D:** 180g  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  anhidro

Agua destilada 500ml (hervir 30min)

Una vez frio se mezclan D+C y se lleva a 1000 ml. Se guarda en frasco oscuro y se usa 2 días después. Fraccionarlo cada vez que se usa.

Nota: si al mezclar con el Nelson no queda amarillo está mal.

### 1.5.3 Reactivo de Nelson

**A:** 50g  $\text{Mo}_7\text{O}_{24}(\text{NH}_4)_6$

Agua destilada 900 ml

Añadir 42 ml  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  concentrado agitando

**B:** 6g arseniato bisódico

Agua destilada 50 ml

Mezclar A y B guardar en frasco oscuro. Usar 48 horas después.

#### 1.5.4 Buffer fosfato 0.1M pH 7

$\text{K}_2\text{HPO}_4$	13,6g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	4,0g

Agua destilada 1000ml

#### 1.5.5 Buffer acetato

**A:** 1.2 ml ácido acético en 100ml de agua

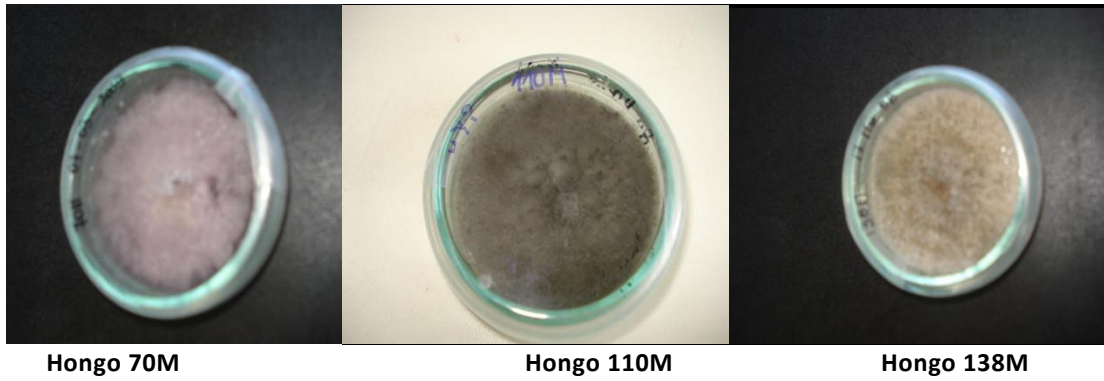
**B:** 2.7 g acetato de sodio en 100 ml agua

Para pH 4,8: 40A + 60B (0.2 M)

Para 0.1 M agregar 100 ml agua

**Anexo 2.**  
**IMÁGENES Y TOMA DE DATOS**

**2.1 Hongos a ensayar**



**Fig. 6** Hongos

**2.2 Actividad cualitativa de enzimas celulolíticas**



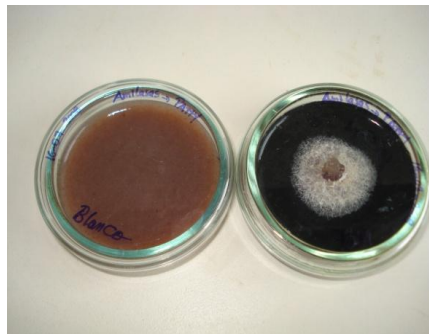
**Fig. 7** Ensayo cualitativo de enzimas para hongo # 70M

### 2.3 Actividad cualitativa de enzimas pectinolíticas



**Fig. 8** Ensayo cualitativo de enzimas

### 2.4 Actividad cualitativa de enzimas amilolíticas



**Fig. 9** Ensayo cualitativo de enzimas para hongo # 70M

## 2.5 Fase de fermentación en cultivo sumergido.



Fig. 10 Muestras en agitación

## 2.6. Determinación de Glucosa



Fig. 11 Espectrofotometría de glucosa

**Tabla 19.** Tamizaje enzimático cualitativo

Código cepario	Amilolítica	Pectinolítica	Celulolítica
71M	+	+	
65	+	+	
85	+	+	
55	+	+	
79	+	+	
60	+	+	
51	+	+	
80	+	+	
50	+	+	
53	+	+	
54	+	+	
56	+	+	
57	+	+	
58	+	+	
59	+	+	
62	+	+	
64	+	+	
68	+	+	
69	+	+	
78	+	+	
91	+	+	
92	+	+	
93	+	+	
94	+	+	
95	+	+	
88	+	+	
91	+	+	
92	+	+	
93	+	+	
94	+	+	
95	+	+	
103	+	+	
<b>110</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	
113	+	+	
114	+	+	
116	+	+	
122	+	+	
123	+	+	
124	+	+	

129	+	+	
130	+	+	
133	+	+	
134	+	+	
135	+	+	
137	+	+	
63	+	+	+
90	+	+	+
130	+	+	+
66	+		
75	+		
76	+		
84	+		
86	+		
96	+		
97	+		
99	+		
100	+		
104	+		
105	+		
106	+		
109	+		
111	+		
112	+		
118	+		
119	+		
125	+		
126	+		
131	+		
77		+	
83		+	
87		+	
52		+	
136		+	
132		+	
117		+	
<b>70</b>	<b>+</b>		<b>+</b>
107	+		+
121	+		+
<b>138</b>	<b>+</b>		<b>+</b>

**Tabla 20.** Resultados de glucosa sobre pulpa de banano

<b>Troceado</b>		
<b>Tratamiento</b>	<b>Mayor actividad(tiempo/día)</b>	<b>Glucosa (g/L)</b>
a1 b0 c0	19	0.619
a1 b0 c1	13	0.407
a1 b0 c2	13	0.463
a1 b1 c0	13	1.035
a1 b1 c1	13	0.847
a1 b1 c2	19	0.599
a1 b2 c0	13	0.707
a1 b2 c1	13	0.949
a1 b2 c2	18	0.643
<b>Molienda</b>		
<b>Tratamiento</b>	<b>Mayor actividad(tiempo/día)</b>	<b>Glucosa (g/L)</b>
a0 b0 c0	13	0.455
a0 b0 c1	19	0.516
a0 b0 c2	19	0.5
a0 b1 c0	19	0.766
a0 b1 c1	13	0.737
a0 b1 c2	19	0.855
a0 b2 c0	19	0.984
a0 b2 c1	15	0.779
a0 b2 c2	13	0.853
<b>Hidrotérmico</b>		
<b>Tratamiento</b>	<b>Mayor actividad(tiempo/día)</b>	<b>Glucosa (g/L)</b>
a2 b0 c0	14	1.11
a2 b0 c1	14	3.8
a2 b0 c2	14	1.17
a2 b1 c0	14	1.8
a2 b1 c1	14	4.7
a2 b1 c2	14	1.7
a2 b2 c0	14	1.32
a2 b2 c1	14	4.88
a2 b2 c2	14	1.16



**Tabla 21.** Resultados de actividad amilolítica sobre pulpa de banano

	<b>Troceado</b>	
<b>Tratamiento</b>	<b>Mayor actividad(tiempo/día)</b>	<b>Amilasa (UA/ml)</b>
a1 b0 c0	12	9.85
a1 b0 c1	20	9.76
a1 b0 c2	20	9.79
a1 b1 c0	21	9.77
a1 b1 c1	18	9.76
a1 b1 c2	18	9.74
a1 b2 c0	18	9.74
a1 b2 c1	18	9.73
a1 b2 c2	18	9.68
	<b>Molienda</b>	
<b>Tratamiento</b>	<b>Mayor actividad(tiempo/día)</b>	<b>Amilasa (UA/ml)</b>
a0 b0 c0	18	9.86
a0 b0 c1	18	9.8
a0 b0 c2	18	9.25
a0 b1 c0	12	9.8
a0 b1 c1	12	9.8
a0 b1 c2	18	9.79
a0 b2 c0	18	9.78
a0 b2 c1	18	9.86
a0 b2 c2	8	9.8
	<b>Hidrotérmico</b>	
<b>Tratamiento</b>	<b>Mayor actividad(tiempo/día)</b>	<b>Amilasa (UA/ml)</b>
a2 b0 c0	18	9.9
a2 b0 c1	17	9.88
a2 b0 c2	11	9.75
a2 b1 c0	15	9.8
a2 b1 c1	18	8.84
a2 b1 c2	18	9.95
a2 b2 c0	20	9.78
a2 b2 c1	18	9.9
a2 b2 c2	16	9.99

**Tabla 22.** Resultados de actividad polimetilgalacturonasa sobre pulpa de banano

<b>Troceado</b>		
<b>Tratamiento</b>	<b>Mayor actividad(tiempo/día)</b>	<b>PMG (UE/ml)</b>
a1 b0 c0	17	0.183
a1 b0 c1	17	0.144
a1 b0 c2	17	0.151
a1 b1 c0	17	0.151
a1 b1 c1	17	0.145
a1 b1 c2	17	0.141
a1 b2 c0	17	0.137
a1 b2 c1	17	0.183
a1 b2 c2	17	0.139
<b>Molienda</b>		
<b>Tratamiento</b>	<b>Mayor actividad(tiempo/día)</b>	<b>PMG (UE/ml)</b>
a0 b0 c0	12	0.156
a0 b0 c1	14	0.080
a0 b0 c2	2	0.105
a0 b1 c0	3	0.139
a0 b1 c1	10	0.097
a0 b1 c2	5	0.093
a0 b2 c0	14	0.116
a0 b2 c1	12	0.098
a0 b2 c2	9	0.138
<b>Hidrotérmico</b>		
<b>Tratamiento</b>	<b>Mayor actividad(tiempo/día)</b>	<b>PMG (UE/ml)</b>
a2 b0 c0	14	0.068
a2 b0 c1	9	0.118
a2 b0 c2	9	0.097
a2 b1 c0	17	0.107
a2 b1 c1	7	0.137
a2 b1 c2	7	0.107
a2 b2 c0	7	0.090
a2 b2 c1	12	0.193
a2 b2 c2	9	0.136

**Tabla 23.** Resultados de actividad poligalacturonasa sobre pulpa de banano

	<b>Troceado</b>	
<b>Tratamiento</b>	<b>Mayor actividad(tiempo/día)</b>	<b>PG (UE/ml)</b>
a1 b0 c0	10	0.091
a1 b0 c1	10	0.094
a1 b0 c2	9	0.087
a1 b1 c0	10	0.082
a1 b1 c1	10	0.090
a1 b1 c2	16	0.087
a1 b2 c0	10	0.083
a1 b2 c1	17	0.124
a1 b2 c2	14	0.144
	<b>Molienda</b>	
<b>Tratamiento</b>	<b>Mayor actividad(tiempo/día)</b>	<b>PG (UE/ml)</b>
a0 b0 c0	10	0.078
a0 b0 c1	10	0.085
a0 b0 c2	10	0.083
a0 b1 c0	12	0.106
a0 b1 c1	9	0.124
a0 b1 c2	10	0.094
a0 b2 c0	16	0.227
a0 b2 c1	12	0.061
a0 b2 c2	10	0.124
	<b>Hidrotérmico</b>	
<b>Tratamiento</b>	<b>Mayor actividad(tiempo/día)</b>	<b>PG (UE/ml)</b>
a2 b0 c0	7	0.144
a2 b0 c1	10	0.085
a2 b0 c2	10	0.089
a2 b1 c0	10	0.101
a2 b1 c1	10	0.073
a2 b1 c2	10	0.065
a2 b2 c0	9	0.097
a2 b2 c1	10	0.254
a2 b2 c2	9	0.146

**Tabla 24.** Resultados de actividad pectato liasa sobre pulpa de banano

<b>Troceado</b>		
<b>Tratamiento</b>	<b>Mayor actividad(tiempo/día)</b>	<b>Pectato liasa (UE/ml)</b>
a1 b0 c0	17	134.2
a1 b0 c1	17	157.7
a1 b0 c2	17	131.1
a1 b1 c0	17	156.9
a1 b1 c1	14	158.1
a1 b1 c2	17	153.29
a1 b2 c0	17	142.1
a1 b2 c1	10	155.9
a1 b2 c2	5	120.5
<b>Molienda</b>		
<b>Tratamiento</b>	<b>Mayor actividad(tiempo/día)</b>	<b>Pectato liasa (UE/ml)</b>
a0 b0 c0	17	117.7
a0 b0 c1	12	114
a0 b0 c2	12	129.27
a0 b1 c0	9	124.9
a0 b1 c1	7	112.87
a0 b1 c2	7	76.77
a0 b2 c0	7	109.17
a0 b2 c1	5	66.43
a0 b2 c2	16	122.87
<b>Hidrotérmico</b>		
<b>Tratamiento</b>	<b>Mayor actividad(tiempo/día)</b>	<b>Pectato liasa (UE/ml)</b>
a2 b0 c0	12	100.73
a2 b0 c1	7	81.2
a2 b0 c2	12	100.77
a2 b1 c0	16	168.93
a2 b1 c1	14	188.07
a2 b1 c2	16	165.2
a2 b2 c0	9	174.7
a2 b2 c1	16	155.87
a2 b2 c2	10	143.37

**Tabla 25.** Resultados de actividad pectinliasa sobre pulpa de banano

<b>Troceado</b>		
<b>Tratamiento</b>	<b>Mayor actividad(tiempo/día)</b>	<b>Pectin liasa (UE/ml)</b>
a1 b0 c0	10	202.6
a1 b0 c1	10	206.1
a1 b0 c2	10	214
a1 b1 c0	10	121.6
a1 b1 c1	10	193.9
a1 b1 c2	10	177.6
a1 b2 c0	7	261.33
a1 b2 c1	9	174
a1 b2 c2	10	75.2
<b>Molienda</b>		
<b>Tratamiento</b>	<b>Mayor actividad(tiempo/día)</b>	<b>Pectin liasa (UE/ml)</b>
a0 b0 c0	7	105.2
a0 b0 c1	12	110
a0 b0 c2	12	125.6
a0 b1 c0	10	169.2
a0 b1 c1	7	154.23
a0 b1 c2	7	163.23
a0 b2 c0	16	192.33
a0 b2 c1	10	153.63
a0 b2 c2	10	187.63
<b>Hidrotérmico</b>		
<b>Tratamiento</b>	<b>Mayor actividad(tiempo/día)</b>	<b>Pectin liasa (UE/ml)</b>
a2 b0 c0	12	165.1
a2 b0 c1	14	171.6
a2 b0 c2	14	190.2
a2 b1 c0	14	193.3
a2 b1 c1	14	197.4
a2 b1 c2	12	190.9
a2 b2 c0	12	262.70
a2 b2 c1	12	202.7
a2 b2 c2	12	225.6

**Tabla 26.** Porcentaje almidón degradado al final de la fermentación

**Troceado**

Experimento	%Almidón	% Degradación
Blanco -	12,86	35,702
a1 b0 c0	7,43	62,85
a1b0 c1	6,19	69,05
a1 b0 c2	4,71	76,45
a1 b1 c0	2,07	89,64
a1 b1 c1	6,62	66,9
a1 b1 c2	11,99	40,03
a1 b2 c0	11,63	41,88
a1 b2 c1	9,89	50,57
a1 b2 c2	17,40	13

**Molienda**

Experimento	%Almidón	% Degradación
Blanco -	3,97	80,15
ao b0 c0	22,04	10,2
aob0 c1	3,35	83,25
ao b0 c2	2,27	88,65
ao b1 c0	22,47	12,35
ao b1 c1	7,40	63
ao b1 c2	26,94	34,7
ao b2 c0	7,92	60,41
ao b2 c1	13,10	34,51
ao b2 c2	3,75	81,25

<b>Hidrotérmico</b>		
<b>Experimento</b>	<b>%Almidón</b>	<b>% Degradación</b>
Blanco -	14,68	26,6
a <sub>2</sub> b0 c0	14,75	26,25
a <sub>2</sub> b0 c1	1,85	90.93
a <sub>2</sub> b0 c2	5,62	72
a <sub>2</sub> b1 c0	9,94	50,3
a <sub>2</sub> b1 c1	12,56	37,2
a <sub>2</sub> b1 c2	17,63	11,85
a <sub>2</sub> b2 c0	8,15	70,9
a <sub>2</sub> b2 c1	12,06	39,7
a <sub>2</sub> b2 c2	4,93	75,35