

## **“Obtención de jarabes glucosados a partir de cáscaras de Ananas comosus (Piña) mediante hidrólisis enzimática de Celulasas”**

"Obtaining glucosed syrups from Ananas comosus (Piña) rinds by enzymatic hydrolysis of Cellulases"

Alicia Deheco Egúsqüiza<sup>1</sup>

### **RESUMEN**

El objetivo fue determinar el efecto de la aplicación de la enzima Celulasa fúngica en las cáscaras de piña (*Ananas comosus*) de la variedad Golden para la obtención de jarabe glucosado. Se estudió la hidrólisis enzimática de las cáscaras de piña al 30% (p/v) a una temperatura constante de 50°C. Las variables independientes a controlar fueron la Concentración de la enzima Celulasa fúngica (0,5%, 1% y 1,5% p/v) y el Tiempo de hidrólisis (18, 24 y 30 horas). Las variables dependientes fueron el porcentaje de Azúcar Reductor y el porcentaje de Equivalente de Dextrosa (D.E.) de las muestras hidrolizadas enzimáticamente. El diseño experimental fue completamente al azar con modelo factorial 32. Se obtuvo jarabes glucosados a partir de cáscaras de piña (*Ananas comosus*) de la variedad Golden por la hidrólisis enzimática de la Celulasa fúngica. Los mayores porcentajes de Azúcar Reductor y de Equivalente de Dextrosa se presentaron en la Concentración de Celulasa al 1,5% (p/v) durante un Tiempo de hidrólisis de 30 horas con valores promedio de 14,5% de porcentaje de Azúcar Reductor y de 31,3% de porcentaje de Equivalente de Dextrosa.

En la hidrólisis enzimática con Celulasa fúngica al 1,5% (p/v) y 30 horas se obtuvo un producto de mayor valor agregado, se definieron las condiciones de operación y las etapas del proceso que deberían ser adaptadas para la producción de jarabe glucosado a partir de cáscaras de piña (*Ananas comosus*) de la variedad Golden.

**Palabras clave:** Cáscara de piña, Lignocelulosa, Celulasa, Jarabes glucosados.

### **ABSTRACT**

The objective was to determine the effect of the application of the fungal cellulase enzyme on the pineapple peels (*Ananas comosus*) of the Golden variety to obtain glucosed syrup. The enzymatic hydrolysis of pineapple peels was studied at 30% (w/v) at a constant temperature of 50 ° C. The independent variables to be controlled were the concentration of the fungal cellulase enzyme (0.5%, 1% and 1.5% w/v) and the hydrolysis time (18, 24 and 30 hours). The dependent variables were the percentage of Reducer Sugar and the percentage of Dextrose Equivalent (D.E.) of the enzymatically hydrolysed samples. The experimental design was completely randomized with factorial model 32. Glucosed syrups were obtained from pineapple peels (*Ananas comosus*) of the Golden variety by the enzymatic hydrolysis of the fungal cellulase. The highest percentages of Reducer Sugar and Dextrose Equivalent were presented in the Cellulase Concentration at 1.5% (w/v) during a hydrolysis time of 30 hours with average values of 14.5% of reducing sugar percentage and 31.3% of percentage of Dextrose Equivalent.

In the enzymatic hydrolysis with fungal cellulase at 1.5% (w / v) and 30 hours a higher value-added product was obtained, the operating conditions and the stages of the process were defined that should be adapted for the production of glucosed syrup from of pineapple peels (*Ananas comosus*) of the Golden variety.

**Keywords:** Aguaymanto, cape gooseberry, adsorption isotherm, water activity, equilibrium moisture.

<sup>1</sup>Universidad Nacional del Callao, Facultad de Ingeniería Pesquera y de Alimentos. Av. Juan Pablo II 306 - 308, Callao. Perú.

## INTRODUCCIÓN

La alta producción de residuos sólidos orgánicos está impulsando a los investigadores a estudiar los productos agrícolas y subproductos de las mismas después de ser sometidas a procesos de transformación agroindustrial, estos subproductos o residuos en su mayoría corresponden a biomasa lignocelulósica rica en polímeros de celulosa y hemicelulosa entre 75-80% (Sánchez Riaño, 2010). Por ejemplo, de la hidrólisis de residuos lignocelulósicos como la cáscara de frutas que en su gran mayoría son consideradas biomásas desvalorizadas, se puede obtener jarabes glucosados para obtener bioetanol (Tejeda L. et al., 2010).

Los residuos industriales de la piña son una alternativa de bajo costo para la producción de jarabes glucosados. Este desecho contiene azúcares simples fermentables (glucosa, fructosa y sacarosa) y cantidades significativas de celulosa y de hemicelulosa potencialmente hidrolizables. (Vincent et al., 2006).

La cáscara y la corona están constituidas principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, las cuales la hacen no comestibles para los humanos, pero potencialmente aprovechables para obtener otros productos de valor agregado. (Swaroop R. & Krishna N., 2004).

La celulosa es un polímero de D-glucosa unida por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 (Figura N° 4.2), que se estructuran en largas cadenas lineales (microfibrillas) unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals intramoleculares, formando una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática (Ovando C. & Waliszewski K., 2005). La hemicelulosa es un polímero complejo de heteropolisacáridos formado por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) que forman cadenas ramificadas y los ácidos 4-O-metilglucurónico, D-galacturónico y D-glucurónico, los azúcares están unidos por

enlaces  $\beta$ -1,4 y ocasionalmente por enlaces  $\beta$ -1,3 (Pérez J. et al., 2002).

Para procesar la biomasa lignocelulósica se requiere las siguientes etapas: a) reducción de tamaño, si es necesario b) pretratamiento, c) hidrolisis de celulosa y hemicelulosa.

Estas etapas pueden llevarse a cabo mediante distintas configuraciones de proceso y dentro de cada una de ellas existen múltiples alternativas. (Merino S. y Cherry J. 2007).

Las celulasas son una mezcla de tres enzimas que actúan simultáneamente en la hidrólisis de la celulosa: endoglucanasa, celobiohidrolasa y celobiasa ( $\beta$ -glucosidasa). Las primeras dos enzimas actúan directamente en la celulosa. Los principales productos de reacción son la celobiosa y la glucosa; la celobiosa es entonces hidrolizada a glucosa por la celobiasa. Las endoglucanasas y las celobiohidrolasas degradan a las celodextrinas solubles y a la celulosa amorfa; sin embargo, la celobiohidrolasa degrada a la celulosa cristalina de una manera más eficiente (Bohorquez C. y Herrera S., 2005).

Los jarabes de glucosa es uno de los productos de gran valor comercial que pueden sustituir a la sacarosa o azúcar de mesa, o pueden ser utilizados para la obtención de jarabes de fructosa. Son soluciones concentradas y purificadas de sacáridos nutritivos obtenidos a partir de hidrolisis ácida o enzimática. (Madrid A, y Cenzano J. 2001).

Por tal motivo, en esta investigación se pretende obtener jarabes glucosados a partir de una materia prima diferente a la convencional como es el maíz y utilizar en este caso la cascara de piña como única materia prima esencial del proceso y darle valor agregado a productos o subproductos a partir de cascara de piña, esta sería una opción para incrementar el nivel comercial de este insumo en nuestro país.

## MATERIAL Y MÉTODO

### Muestra

Se trabajó con 10 kg de cáscaras de piña variedad Golden al 30% (p/v) seleccionados de manera aleatoria, para evaluar la hidrólisis de los componentes de la cascara de piña por el método de hidrólisis enzimática.

### Unidad experimental

Estuvo conformada por cáscaras de piña variedad Golden que se obtuvo en condiciones de laboratorio para tener suficiente cantidad para las pruebas de hidrólisis enzimática.

### Análisis estadístico

Los datos resultantes fueron procesados mediante análisis estadísticos, con el fin de observar el nivel de significancia de las variaciones de concentración de enzima y tiempo de acción de la misma sobre el índice de dextrosa (ED). Los resultados obtenidos se analizaron con el programa estadístico SPSS, versión 20, empleándose el diseño factorial, 3 x 2 con 3 repeticiones, así como la prueba de análisis de varianza (ANVA) y prueba de Duncan, para determinar si hubo un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) en los diferentes tratamientos.

### Procedimiento

Los diagramas de flujo del proceso de Hidrólisis enzimática aplicado a cáscaras de piña variedad Golden al 30% (p/v) para obtener el jarabe y las fotografías se muestran en la Figura 1 y 2.



**Figura 1.** Diagrama del proceso de Hidrólisis enzimática aplicado a las cáscaras de piña.



**Figura 2.** Fotografías del desarrollo del proceso de hidrólisis de cáscaras de piña.

Las variables independientes estudiadas fueron la concentración de la celulasa fúngica al 0,5%, 1% y 1,5% (p/v) y el tiempo de hidrólisis de 18 horas, 24 horas y 30 horas. Las variables dependientes estudiadas fueron el contenido de azúcares reductores y Equivalente de Dextrosa (DE) de las muestras hidrolizadas enzimáticamente.

### Prueba de determinación de Porcentaje de Azúcares Reductores

Para la determinación cuantitativa del contenido de azúcares reductores se utilizó el método volumétrico de Eynon-Lane (INDECOPI NTP 203.OO2-1979 y INDECOPI NTP 208.102:2014).

### Prueba de determinación de Porcentaje de Equivalente de dextrosa (ED).

La cuantificación de ED se realizó tomando como base los azúcares reductores y la cantidad en sustancia seca de la muestra de jarabe utilizada.

$$E.D. = \frac{\% \text{ Azúcares reductores (base seca)} \times 100}{\% \text{ Extracto seco (base seca)}}$$

Para obtener el porcentaje de extracto seco (% ES), de 100 se restó el porcentaje de humedad del jarabe, es decir:

$$\% \text{ ES} = 100 - \% \text{ humedad de la muestra de jarabe}$$

## RESULTADOS

Se determinaron los valores de grado Brix, % Azúcares reductores, % de equivalente de dextrosa cuyos resultados se ve en la Tabla 1. En general se pudo observar que los mayores porcentajes de azúcar reductor y de Equivalente de Dextrosa se presentaron en la Concentración de Celulasa al 1.5% (p/v) durante un Tiempo de hidrólisis de 30 horas con valores promedio de 14.5% de porcentaje de Azúcar Reductor y de 31.3% de porcentaje de Equivalente de Dextrosa.

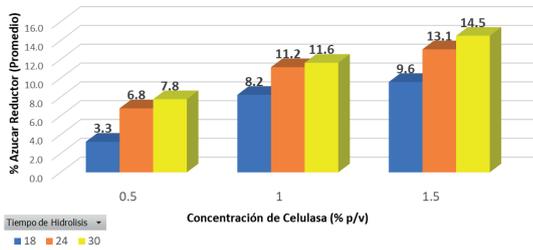
**Tabla 1.** Relación entre la concentración de la enzima Celulasa y el tiempo de hidrólisis con el % azúcares reductores y el Equivalente de dextrosa de los jarabes.

% Celulasa	Tiempo (horas)	%Azúcar Reductor	% Azúcar Reductor Prom	% Equivalente Dextrosa	% Equivalente Dextrosa Prom.
0.5	18	3.0	3.3	7.2	7.7
0.5	18	3.5		7.7	
0.5	18	3.8		8.3	
0.5	24	6.0	6.8	13.1	14.9
0.5	24	7.4		16.3	
0.5	24	7.0		15.2	
0.5	30	8.1	7.8	18.9	17.4
0.5	30	7.7		16.8	
0.5	30	7.5		16.4	
1	18	7.8	8.2	16.6	18.0
1	18	8.4		18.6	
1	18	8.5		18.9	
1	24	11.3	11.2	21.4	20.9
1	24	10.6		19.1	
1	24	11.6		22.1	
1	30	12.2	11.6	24.2	22.7
1	30	11.9		22.6	
1	30	10.8		21.4	
1.5	18	9.5	9.6	19.5	19.2
1.5	18	10.0		19.4	
1.5	18	9.3		18.8	
1.5	24	12.4	13.1	24.6	25.9
1.5	24	13.6		27.0	
1.5	24	13.2		26.2	
1.5	30	13.7	14.5	29.6	31.3
1.5	30	14.0		30.5	
1.5	30	15.8		33.8	

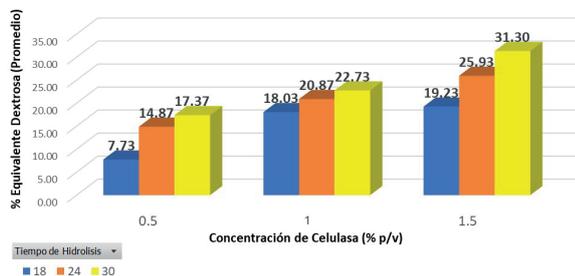
Conforme disminuía la viscosidad de las soluciones, iba aumentando en forma creciente los grados Brix y formándose azúcares reductores en diferentes niveles de acuerdo a la concentración de la enzima (0,5%, 1% y 1,5% (p/v) y de los tiempos de hidrólisis (18 horas, 24 horas y 30 horas).

Al finalizar los tiempos de incubación para la hidrólisis enzimática con la celulasa al 0,5%, 1% y 1,5% (p/v) el líquido filtrado tenía una tonalidad naranja amarillenta.

La concentración enzimática de la celulasa de mejor rendimiento de la reacción de hidrólisis fue del 1.5% durante una incubación de 30 horas ya que se obtuvieron hidrolizados con mayores grados Brix y porcentajes de azúcares reductores. Grafico 1 y 2.



**Grafico 1.** Relación entre la concentración de la enzima Celulasa y el tiempo de hidrólisis con el % azúcares reductores (AR).



**Grafico 2.** Relación entre la concentración de la enzima Celulasa y el tiempo de hidrólisis con el porcentaje de Equivalente de Dextrosa.

Los análisis estadísticos demostraron que existieron diferencias significativas entre los porcentajes de Celulasas utilizados y los tiempos de hidrólisis versus el porcentaje de azúcar reductor y el % de Equivalente de Dextrosa. Tabla 2 y 3.

**Tabla 2.** Análisis de varianza de la relación entre la concentración de Celulasa y el tiempo de hidrólisis con el porcentaje de azúcar reductor.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
% Celulasa (p/v)	63.87	2.00	31.94	215.84	0.00	6.94
Tiempo de Hidrólisis	29.25	2.00	14.62	98.83	0.00	6.94
Error	0.59	4.00	0.15			
Total	93.71	8.00				

Criterio estadístico. 95% de confianza

**Tabla 3.** Análisis de varianza de la relación entre la concentración de Celulasa y el tiempo de hidrólisis con el porcentaje de equivalente de dextrosa.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
% Celulasa (p/v)	224.64	2.00	112.32	29.08	0.00	6.94
Tiempo de Hidrólisis	118.83	2.00	59.42	15.39	0.01	6.94
Error	15.45	4.00	3.86			
Total	358.91	8.00				

Criterio estadístico. 95% de confianza

## DISCUSIÓN

Para el presente estudio se utilizó la enzima Gramozyme Celulasa fungal que provocó la hidrólisis del polisacárido celulosa a oligosacáridos de cadena corta que se evidenció por el aumento del Porcentaje de Azúcar Reductor y el Porcentaje de Equivalente de Dextrosa y la obtención de jarabes glucosados. Al respecto, Krogh K. et al., (2004); Wen N. et al., (2005); Sehnem Z et al., (2006), proponen el uso de enzimas segregadas por hongos filamentosos para la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos como son: las celulasas, que engloban un conjunto de enzimas que hidrolizan la celulosa cristalina a pequeños oligosacáridos y posteriormente a glucosa; y las hemicelulasas, que hidrolizan la hemicelulosa a azúcares monoméricos.

Los jarabes que se obtuvieron de hidrólisis enzimática de acuerdo a BeMiller J. and R. Whistle (2009) fueron del tipo I que consisten principalmente de segmentos de peso molecular alto y dextrinas lineales. Esta categoría obtenida se explica porque la hidrólisis enzimática de la celulosa fue limitante ya que no tubo valores altos de azúcares reductores y equivalentes de dextrosa como se esperaba, esto es por la poca eliminación de la lignina que limitaba la acción de la enzima celulasa puestos que no fueron suficientes los tratamientos mecánicos y térmicos aplicados en este estudio. Esto concuerda con Han M. et al., (2011) quien menciona que la conversión de biomasa lignocelulósica a otros productos es un proceso complejo debido a la estructura química de la pared celular de este material vegetal, por lo tanto, es necesario implementar un tratamiento previo el cual permita pasar de un complejo celulósico a azúcares fermentables que contengan principalmente glucosa.

Al respecto. Martín C. y P. Manzanares, (1994) informan que la celulosa está muy bien protegida para el ataque por agentes químicos y biológicos. Las moléculas se encuentran sólo dentro de las microfibrillas y rodeadas de una matriz de otros

materiales reactivos. Esto supone la existencia de sucesivas barreras protectoras que dificultan el acceso de agentes químicos y enzimas a las cadenas de celulosa.

Los análisis estadísticos demostraron que existieron diferencias significativas entre los porcentajes de Celulasa utilizados y los tiempos de incubación versus el porcentaje de Equivalente de Dextrosa. En la hidrólisis enzimática con Celulasa fúngica al 1.5% (p/v) y 30 horas se obtuvo un producto de mayor valor agregado, se definieron las condiciones de operación y las etapas del proceso que deberían ser adaptadas para la producción de jarabe glucosado a partir de cáscaras de piña (*Ananas comosus*) de la variedad Golden. Una mayor fluidez se observó en los hidrolizados obtenidos a una concentración de la enzima Celulasa al 1.5% y con un tiempo de incubación de 30 horas. Los hidrolizados obtenidos en la hidrólisis enzimática fueron poco viscosos, naranja amarillento y con brillo moderado. Es importante continuar con estudios de evaluación de hidrolisis enzimática de la celulosa tomando en consideración diferentes factores que puedan regularla. Al respecto, Medina M. (2011), señaló que la hidrolisis enzimática ha cobrado mucha importancia ya que es un proceso poco agresivo para el material y para el medio en el que se trabaja y que el único requerimiento para una hidrolisis enzimática es ajustar las condiciones, como el pH y la temperatura para que el proceso enzimático se lleve a cabo adecuadamente.

### Agradecimiento

A la Facultad de Ingeniería Pesquera y de Alimentos de la Universidad Nacional del Callao por el apoyo y respaldo brindado durante la realización de la presente investigación.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Miller J. and Whistler R. (2009). *Starch Chemistry and Technology*. Food Science and Technology, International Series. USA. Third Edition.
2. Bohórquez, C & Herrera, S. (2005) *Determinación de las mejores condiciones de hidrólisis del banano verde de rechazo*. Trabajo de grado (Ingenieros químicos). Medellín. Universidad Nacional de Colombia.
3. Han, M., et al. (2011) *Bioethanol production from optimized pretreatment of cassava stem*. Korean J. Chem. Eng., January, Vol. 28, No.1: 119-125. 2011.
4. Krogh, K et al. (2004) *Screening genus Penicillium for producers of cellulolytic and xylanolytic enzymes*. Appl Biochem Biotechnol. Vol. 114: 389-401.
5. Madrid A, y Cenzano J. (2001) *Nuevo Manual de Industrias Alimentarias*. España. Editorial Mundi-Prensa Libros. S.A.
6. Martín C. y Manzanares P. (1994). *Biomasa lignocelulósica. Polímeros constitutivos. Procesos biológicos de degradación de lignina*. Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT 754 – ISSN 0214-087X). Madrid, España.
7. Medina-M., et al. (2011) *Aprovechamiento de materiales lignocelulósicos para la producción de etanol como carburante*. Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila. México. Volumen 3, No. 6. 2011.
8. Merino S. y Cherry J. (2007) *Progress and Challenges in Enzyme Development for Biomass Utilization*. Adv Biochem Engin/Biotechnol 108: 95–120.
9. Indecopi. (1979) NTP 203.OO2-1979. *Determinación del contenido de Azúcares reductores*. Método de Eynon-Lane.
10. Indecopi. (2014) NTP 208.102:2014 CONFITERÍA. *Determinación de azúcares reductores y sacarosa*. 1ª Edición.

11. Ovando Chacón S.L. & Waliszewski K.N. Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia*, 21: 111-120. 2005.
12. Pérez J, Muñoz-Dorado A, De La Rubia T & Martínez, E. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int. Microbiol.* 5: 53–63. 2002.
13. Sánchez Riaño, G. M. Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. Tumbaga, 61-83. 2010.
14. Sehnem, N.T.; Bittencourt, L.R.; Camassola, M.; Dillon, A. J. P. Cellulase production by *Penicillium echinulatum* on lactose. *Appl Microbiol Biotechnol.* 72:163-167. 2006.
15. Swaroopa Rani, R., & Krishna, N. Ensilage of pineapple processing waste for methane generation. *Science Direct*, 523–528. 2004.
16. Tejada L.P., C. Tejada, Á. Villabona, M. R. Alvear, C. R. Castillo, D. L. Henao, W. Marimón, N. Madariaga, A. Tarón. Producción de bioetanol a partir de la fermentación alcohólica de jarabes glucosados derivados de cáscaras de naranja y piña. Universidad de Cartagena, Cartagena de Indias. (Colombia). *Revista Educación en Ingeniería*, 10, 120-125. 2010.
17. Wen, Z.; Liao, W.; Chen, S. Production of cellulase/ $\beta$ -glucosidase by the mixed fungi culture *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. *Process Biochem.* Vol. 40:3087-3094. 2005.
18. Vincent, M. *Química Industrial Orgánica*. España: Editorial de la Universidad Politécnica de Valencia. 2006.

Correo electrónico: dehecoperu@hotmail.com