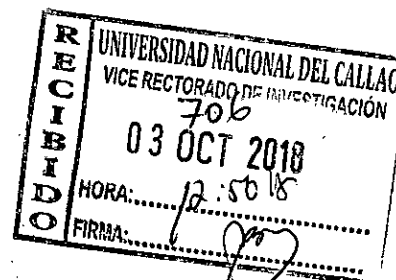


**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y DE ALIMENTOS**  
**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA**  
**PESQUERA Y DE ALIMENTOS**



**INFORME FINAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**  
**“OBTENCIÓN DE JARABES GLUCOSADOS A PARTIR DE**  
**CÁSCARAS DE *Ananás comosus* (PIÑA) MEDIANTE HIDRÓLISIS**  
**ENZIMÁTICA DE CELULASAS”**

**AUTOR: Blga. Ms.C. ALICIA CECILIA DECHECO EGÚSQUIZA**

**PERIODO DE EJECUCIÓN: del 01 de octubre del 2017 al 30 de Setiembre del 2018.**

**RESOLUCIÓN DE APROBACIÓN: N° 955-2017-R**

**CALLAO – 2018**

**PERÚ**

A small, handwritten signature or mark located in the bottom right corner of the page.

## **DEDICATORIA**

A la memoria de mis queridos padres, “mis angelitos”, Emilia Josefina y Luis Cesar Augusto a quienes recuerdo con mucho amor y admiración.

A mi hijo Álvaro el gran soporte de mi vida; quien me impulsa a ser mejor persona cada día y me otorga su amor, comprensión y apoyo.

## **Agradecimientos**

A la Facultad de Ingeniería Pesquera y de Alimentos de la Universidad Nacional del Callao, por el gran apoyo y respaldo brindado para desarrollar las determinaciones a nivel de laboratorio durante la realización del presente trabajo de investigación.

Al Lic. Maestro Stalein Jackson Tamara Tamariz por su apoyo en la interpretación de los análisis estadísticos de la presente investigación.

A todas las personas que de manera directa o indirecta han contribuido a la realización de la presente investigación.

## I. INDICE

	Página
I. INDICE	1
II. RESUMEN Y ABSTRACT	8
III. INTRODUCCION	10
3.1: Problema	10
3.2: Importancia y justificación de la investigación	12
IV. MARCO TEORICO	16
4.1: Piña	16
4.2: Composición y valor nutritivo	18
4.3: Componentes de la Cáscara de piña	20
4.4: Pretratamientos de la biomasa lignocelulósica	28
4.5: Hidrólisis enzimática	31
4.6: Azúcares reductores y Equivalente de Dextrosa	36
4.7: Sólidos Solubles (Grados Brix)	40
4.8: Antecedentes del Estudio	42
V. MATERIALES Y METODOS	47
5.1: Metodología de la investigación	47
5.2: Población y procedimiento muestral	50
5.3: Métodos de análisis	51
VI. RESULTADOS	70
6.1: Características de la Cáscara de Piña	70
6.2: Hidrólisis enzimática de la cáscara de piña	71
VII. DISCUSION	79
7.1. Comparación de la concentración de Celulasa y el Tiempo de hidrólisis con respecto al porcentaje de Azúcar Reductor	79

7.2: Comparación de la concentración de Celulasa y el tiempo de hidrólisis con respecto al porcentaje de Equivalente de Dextrosa	83
VIII. REFERENCIALES	96
IX. APENDICE	109
X. ANEXOS	117

## TABLAS DE CONTENIDO DE TABLAS

	Página
4.1. Clasificación botánica de la piña <i>Ananas comosus</i>	18
4.2. Determinaciones químicas proximales a muestras representativas de piña ( <i>Ananas comosus</i> )	19
4.3. Características fisicoquímicas de la piña ( <i>Ananas comosus</i> )	20
4.4. Composición química proximal de la cáscara de piña seca y fresca	27
4.5. Tipos de pretratamientos a materiales lignocelulosicos	29
4.6. Rango óptimo de operación de los parámetros en la hidrólisis Enzimática	34
4.7. Clasificación de los jarabes de glucosa según su Equivalente de Dextrosa (DE)	39
6.1. Balances de materia en la obtención de jarabes glucosados de cáscara de piña	70
6.2. Relación entre la Concentración de la enzima Celulasa y el Tiempo de Hidrólisis con los Grados Brix y porcentaje de Azúcar Reductor	72
6.3. Relación entre la Concentración de la enzima Celulasa y el Tiempo de Hidrólisis con el porcentaje Azúcar Reductor y Porcentaje Equivalente de dextrosa	75
7.1. Análisis de varianza de la relación entre la Concentración de Celulasa y el Tiempo de Hidrólisis con el Porcentaje de Azúcar Reductor	79
7.2. Concentración de celulasa versus Porcentaje Azúcar Reductor. Medidas simétricas	81
7.3. Tiempo de Hidrolisis versus Porcentaje Azúcar Reductor. Medidas simétricas	82
7.4. Análisis de varianza de la relación entre la Concentración de Celulasa y el Tiempo de hidrólisis con el Porcentaje de	

Equivalente de Dextrosa	84
7.5. Concentración de Celulasa versus Porcentaje Equivalente de Dextrosa. Medidas simétricas	86
7.6. Tiempo de Hidrolisis versus Porcentaje Equivalente de Dextrosa. Medidas simétricas	87
10.1. Ficha Técnica enzima Gramozyme Celulasa	118
10.2. Certificado de Análisis Gramozyme Celulasa	119
10.3. Ejemplos de pretratamientos a materiales lignocelulosicos	120
10.4. Matriz de Consistencia	124

## TABLAS DE CONTENIDO DE FIGURAS

	Página
4.1. Características morfológicas de planta y fruto de piña ( <i>Ananas comosus</i> )	17
4.2. Estructura de la Celulosa	22
4.3. Estructura de la Hemicelulosa	25
4.4. Estructura de la Lignina	26
4.5. Efecto del pretratamiento sobre la biomasa lignocelulósica	30
4.6. Representación esquemática de hidrólisis de la celulosa microcristalina y amorfa por el complejo Celulasa	32
5.1. Diagrama del procedimiento metodológico aplicado para el tratamiento y estandarización de las cáscaras de piña (Etapa 1)	52
5.2. Diagrama del procedimiento metodológico proceso aplicado para la hidrólisis enzimática por las enzimas Celulasas a partir de mostos de cáscara de piña. (Etapa 2)	56
5.3. Preparación de mostos de cáscara de piña y homogenización	58
5.4. Medida de pH y grado Brix inicial de mostos de cáscara de piña	59
5.5. Preparación de solución enzimática de Celulasa al 0.5%, 1% y 1.5% (p/v) y homogenización	59
5.6. Adición de solución enzimática de Celulasa al 0.5%, 1% y 1.5% (p/v)	60
5.7. Incubación de mostos con Celulasa a 50°C por 18, 24 y 30 horas (en cada tratamiento)	61
5.8. Control de grados Brix y pH de los hidrolizados enzimáticos	62
5.9. Tratamiento térmico de jarabes a 85°C por 10 minutos para inactivar la enzima Celulasa	63
5.10. Filtración de los jarabes	63



5.11. Preparación de las muestras para analizar azúcares reductores (Método Eynon-Lane)	66
5.12. Prueba cuantitativa de determinación de Azúcares Reductores métodos volumétricos de Eynon-Lane	67
9.1. Materiales y Equipos utilizados	110
9.2. Fotos experimentales de la selección, lavado y pesado y trozado de las cáscaras de piña (Etapa 1)	111
9.3. Fotos experimentales del tratamiento térmico, enfriamiento, licuado de las cáscaras de piña (Etapa 1)	112
9.4. Fotos experimentales del acondicionamiento de mostos en frascos esterilizados para su tratamiento térmico en autoclave (Etapa 1)	113
9.5. Fotos experimentales del procedimiento desarrollado para la determinación de humedad de la cáscara de piña ( <i>Ananas comosus</i> ) variedad Golden	114
9.6. Prueba cualitativa de determinación de Azúcares Reductores con reactivo de Benedict en los diferentes tratamientos	115
9.7. Fotos experimentales del procedimiento desarrollado para la determinación de acidez titulable de los jarabes glucosados de cáscara de piña ( <i>Ananas comosus</i> ) variedad Golden	116

## TABLAS DE CONTENIDO DE GRÁFICOS

	Página
6.1. Relación entre la Concentración de la enzima Celulasa y el Tiempo de Hidrólisis con el grado Brix final promedio	73
6.2. Relación entre la concentración de la enzima Celulasa y el tiempo de hidrólisis con el Porcentaje Azúcar Reductor	74
6.3. Relación entre la concentración de la enzima Celulasa y el tiempo de hidrólisis con el Porcentaje de Equivalente de Dextrosa	76
7.1. Concentración de Celulasa versus el Porcentaje Azúcar Reductor	81
7.2. Tiempo de hidrolisis versus el Porcentaje Azúcar Reductor	83
7.3. Porcentaje de Celulasa versus el Porcentaje Equivalente de Dextrosa	86
7.4. Tiempo de Hidrolisis versus Porcentaje Equivalente de Dextrosa	88
10.1. Actividad de las enzimas Celulasas sobre sustrato carboximetil celulosa a diferentes tiempos y temperaturas	122
10.2. Actividad relativa de enzimas Celulasas sobre sustrato carboximetil celulosa a diferentes valores de pH	122
10.3. Producción de celulasas por <i>A. niger</i> , expresadas en unidades enzimáticas promedio/ml de extracto hasta los 20 días de incubación ( $p < 0,05$ )	123

## II. RESUMEN

**Objetivo:** 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.

**Método:** 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 3<sup>2</sup>.

**Resultado:** 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.

**Conclusiones:** 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.

## II. ABSTRACT

**Objective:** To determine the effect of the application of the fungal cellulase enzyme on pineapple peels (*Ananas comosus*) of the Golden variety to obtain glucosed syrup.

**Method:** 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 a factorial model 3<sup>2</sup>.

**Result:** 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.

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

**Key words:** Pineapple peel, Lignocellulose, Cellulase, Glucose syrups.

### III. INTRODUCCION

#### 3.1: Problema

La tendencia mundial es el notable crecimiento en la generación de residuos, derivado del incremento en la generación de productos comercializables. A partir del marco de referencia anterior, se puede entonces decir que los residuos agroindustriales son materiales en estado sólido o líquido que se generan a partir del consumo directo de productos primarios o de su industrialización, y que ya no son de utilidad para el proceso que los generó, pero que son susceptibles de aprovechamiento o transformación para generar otro producto con valor económico, de interés comercial y/o social. El problema al que se enfrentan los residuos agroindustriales es que no existe una clara conciencia ambiental para su manejo, además de que falta capacidad tecnológica y recursos económicos para darles un destino final, así como una legislación específica para promover la gestión de este tipo de residuos, que asegure un buen manejo desde su generación hasta su disposición final. Aún en nuestros días, esta problemática prevalece a nivel mundial.

En nuestro país los mercados y las industrias agroalimentarias generan una gran cantidad de residuos sólidos vegetales que comprometen gravemente los ecosistemas por su alta concentración de materia orgánica. Nuestras ciudades generan cada vez más cantidad de residuos cuya disposición final se realiza en botaderos a cielo abierto o cuerpos de agua constituyendo un problema para la salud pública, además los elevados volúmenes suponen importantes costos de recolección y disposición final.

Pese a esto, los residuos orgánicos también son una fuente importante de compuestos que pueden ser utilizados debido a sus propiedades favorables tecnológica o

nutricionalmente, de hecho, recientemente se ha mostrado que los residuos de cítricos contienen antioxidantes que pueden tener un efecto benéfico para la salud humana.

Al buscar una oportunidad de aprovechamiento de los residuos, se hace necesaria su caracterización para conocer su composición, la calidad de sus componentes y la cantidad que se genera, con esto se pueden definir las tecnologías más apropiadas para su aprovechamiento y posterior tratamiento. En la búsqueda de oportunidades de aprovechamiento de residuos este aspecto deberá ser considerado, con un enfoque de responsabilidad ambiental.

Actualmente, la utilización de residuos agroindustriales, como materia prima de bajo costo, en procesos biotecnológicos para la obtención de productos químicos finos, se perfila como una opción atractiva para reducir la dependencia del petróleo y, al mismo tiempo, obtener nuevos compuestos que son económica o técnicamente inviables de obtener por síntesis química. (Gil-Horán R. 2008).

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).

Por tal motivo, en esta investigación se pretende obtener dextrinas y 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.

### **3.2: Importancia y justificación de la investigación**

#### **Importancia de la investigación**

En nuestro país, el mercado industrial y minorista utiliza del fruto de la piña, la pulpa para el procesamiento y posterior consumo, mientras que las cascarras son desechadas sin conocer que estos pueden ser aprovechados para ser procesados y obtener subproductos como los jarabes glucosados.

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).

Este trabajo trata de sustentar conceptual y metodológicamente la importancia de aprovechar los residuos orgánicos agroindustriales generados del procesamiento de la piña para obtener productos intermedios de alto valor agregado y su impacto en la calidad de los productos derivados para consumo humano.

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).

Este trabajo de investigación es un aporte de beneficio para empresas de transformación de materia orgánica, industria química, industria farmacéutica, empresas agroindustriales, mercados y de consulta para profesores, profesionales, alumnos y empresarios afines al quehacer alimentario, y en consecuencia participar fortaleciendo a la institución.

La presente investigación es viable en cuanto a recursos humanos, materiales y tiempo y permite sustentar conceptual y metodológicamente la importancia de aprovechar los residuos orgánicos agroindustriales generados del procesamiento de la piña para obtener productos intermedios de alto valor agregado y su impacto en la calidad de los productos derivados para consumo humano.

En cuanto a la delimitación del proyecto, las etapas experimentales de la presente investigación se realizaron en las instalaciones de los laboratorios de la Facultad de Ingeniería Pesquera y de Alimentos de la Universidad Nacional del Callao.

### **Justificación de la Investigación**

El interés social por la conservación del medio ambiente ha resultado en el endurecimiento de legislaciones ambientales y cambios de política fiscal que buscan impulsar a la industria química y reducir su impacto ambiental. Por tal motivo, la utilización de residuos agroindustriales como materia prima de bajo costo, para la obtención de productos químicos finos por biotransformación está ganando interés. Esta opción de transformar desechos en nuevas materias primas se perfila como una opción atractiva para reducir la dependencia del petróleo y, al mismo tiempo, obtener compuestos que son económica o técnicamente inviables de obtener por síntesis química tradicional. (Gil-Horán R. *et al.*, 2008).

En el Perú se genera un gran volumen de desechos sólidos (cáscara y bagazo), producto de la obtención de jugo y conservas de piña, siendo deseable su aprovechamiento para la producción de productos de alto valor agregado y la eliminación de una fuente de contaminación importante.



El uso racional de los recursos es un factor importante que orienta al diseño a sumar esfuerzos para crear estrategias de consumo y reducción de impactos generados a lo largo del ciclo de vida de los productos; de esta forma, en los procesos de desarrollo y fabricación de productos debe considerarse el aprovechamiento concientizado de los residuos que se generan, así como la utilización de la materia prima residual para la creación de nuevos productos, ayudando además, a la búsqueda del equilibrio sostenible del planeta. (Hernández Neria G. *et al.*, 2015).

La piña es un producto altamente utilizado a nivel mundial, por la variedad de subproductos, como: jugos de piña, jaleas, vinagre, productos farmacéuticos, producción de cerveza y otros. Siendo el fruto de la piña el producto más utilizado como tal; pero los ejes de inflorescencia y cáscara que son los residuos producidos de este producto, algunas veces quedan en el abandono y no son utilizados; es el caso de la cascara de piña.

La piña es la tercera fruta tropical de importancia económica en el mundo, su producción a nivel mundial, entre 2006 - 2010, fue de 17,5 – 18 millones de toneladas de fruta fresca, siendo Filipinas, Brasil, Costa Rica, Tailandia y China los principales países productores, los cuales representan el 55% del total de la producción (Adegbite *et al.*, 2014).

Es importante que el residuo esté disponible localmente y en las cantidades necesarias para asegurar la fabricación de un producto de interés. (Saval S. 2012). En este sentido los desechos de la industrialización de la piña constituyen hasta el 65% del fruto. Además de la corona (parte superior del fruto), el corazón y las cáscaras, se genera el rastrojo, el cual corresponde al material vegetal de la planta y se elimina después del ciclo comercial. Se ha determinado que, por hectárea de piña cultivada, se genera cerca de 300 TM de rastrojo. (Araya S., 1998).

La producción de jarabes de glucosa y fructosa en nuestro país, es muy limitada ya que existen muy pocas compañías dedicadas a esta actividad cuya producción apenas abastece una parte mercado nacional y el resto se tiene que importar.

El interés para desarrollar la presente investigación surge a partir de la falta de aprovechamiento de residuos sólidos vegetales y, asimismo, los mercados y las empresas agroindustriales disminuirán los costos asociados a la disposición de residuos sólidos vegetales y por lo tanto el impacto al ambiente será menor. Este trabajo pretende utilizar las cascaras de piña como sustrato para la producción de metabolitos de interés como jarabes glucosados al utilizar enzimas celulasas en las cascaras de piña y se puede obtener un valor económico ambiental porque va a originar un producto que puede ser utilizado en la agroindustria, empresas de transformación de materia orgánica, industria química y farmacéutica.

## IV. MARCO TEORICO

### 4.1: Piña

La piña (*Ananas comosus L.*) es originaria de América del Sur, del centro y Sureste de Brasil, y Noreste de Argentina y Paraguay. Ha sido seleccionada desarrollada y domesticada desde tiempo prehistóricos. En la actualidad los frutos de piña y sus derivados tienen gran importancia económica en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Jiménez B., 2014).

La piña (*Ananas comosus (L.) Merr*) es el fruto de las plantas, tales como arbustos se cultiva ampliamente en las zonas tropicales y subtropicales (Jaelani A., 2013), la producción de piña en el Perú aumentó del 2007 al 2013 de 212,1 mil toneladas a 438,6 mil toneladas (Ministerio de Agricultura y Riego, 2014), la piña tiene un sabor dulce conteniendo sólidos solubles alrededor de 12°Brix y la variedad roja trujillana es la más ácida, soporta bien el almacenamiento, transporte y la duración de la piña en anaquel es bastante larga (Carhuancho P., 2011).

Como sabemos el cultivo de la piña se concentra principalmente en la selva central del Perú, donde se plantan las dos variedades tradicionales “Samba” y “Hawaiana” y las introducidas “Cayena Lisa” y MD-2, actualmente conocido como Golden. Pero, la piña, es cultivada en toda la selva peruana donde se plantan un sin número de tipos; de las que sobresalen los ecotipos “Pucalpina o Negra”, “Motilona”, “Blanca”, “Azúcar”, “Real” o “Hawaiana”; “Casha piña”, “Guacamayo”, “Roja Trujillana” entre otros. (Cáceres P. 2008).

La piña es la que mayor industrialización puede desarrollar por ser transformada en jugo concentrado, trozos y rebanadas (CNSPP, 2009). Para su consumo en fresco es considerada como una buena alternativa, por ofrecer un sabor exótico y poseer un alto

contenido en vitamina A y C, además de fibra y propiedades diuréticas La piña es una planta natural de los trópicos americanos y pertenece a la familia de las bromelias. Aunque la planta tiene un gran valor ornamental, su fruta es considerada una de las más exquisitas y exóticas que se producen en el mundo (COVECA, 2010).

En la Figura N° 4.1 se muestra las características morfológicas de la planta y fruto de la piña (*Ananas comosus*).

**FIGURA N° 4.1**  
**CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE PLANTA Y FRUTO DE**  
**PIÑA (*Ananas comosus*)**



Fuente: Cáceres P. (2008).

#### **Descripción Botánica de la Piña**

La piña pertenece a la familia de las Bromeliáceas, que comprende unas 1.400 especies de plantas, casi todas herbáceas, de hoja perenne y con flores muy llamativas. Algunas de ellas producen enzimas proteolíticas (que disgregan las proteínas de los alimentos) y se localizan sobre todo en América tropical. (Sandoval I., 2011).

En la Tabla N° 4.1 se muestra la clasificación botánica de la Piña *Ananas comosus*.

**TABLA N° 4.1**  
**CLASIFICACIÓN BOTÁNICA DE LA PIÑA *Ananas comosus*.**

<b>Reino</b>	<b>Plantae</b>
<b>División:</b>	<u>Magnoliophyta</u>
<b>Clase:</b>	Liliopsida
<b>Subclase:</b>	<u>Commelinidae</u>
<b>Orden:</b>	<u>Poales</u>
<b>Familia:</b>	Bromeliaceae
<b>Subfamilia:</b>	<u>Bromelioideae</u>
<b>Género:</b>	<i>Ananas</i>
<b>Especie:</b>	<i>A. comosus</i> (L) Merr.1917

Fuente: National Center for Biotechnology Information (NCBI), 2018.

#### **4.2: Composición y valor nutritivo.**

Nutritionalmente, la parte comestible de la piña está constituida principalmente por un 85-90 por ciento de agua y de 8 a 10% de azúcares de los cuales dos terceras partes se encuentran en forma de sacarosa y el resto como glucosa y fructosa (Olivares P., 2003). Prácticamente no contiene almidón y su contenido de proteínas y grasa es muy baja. Contiene 0.6 a 0.9 % de ácidos de los cuales el 87 % es ácido cítrico y el resto ácido málico (Arias C. y J. Toledo, 2000).

Este rol nutritivo de la piña también es debido a que es una buena fuente de fibra dietética; al respecto Ramulu P. y Udayasekhara R. (2003) señalaron que esta fruta

presenta un 20% de fibra dietética, correspondiendo 16,43% a fibra insoluble y 3,57% a fibra soluble, en base seca.

En la Tabla N° 4.2 se muestra las determinaciones químicas proximales a muestras representativas de piña.

**TABLA N° 4.2.**  
**DETERMINACIONES QUÍMICAS PROXIMALES A MUESTRAS**  
**REPRESENTATIVAS DE PIÑA (*Ananas comosus*)**

<b>Característica</b>	<b>Piña (%)</b>
Humedad	90,9
Proteína	0,58
Grasa	0,24
Carbohidratos	7,98
Fibra cruda	0,62
Ceniza	0,30
Vitamina C (mg)	65,04
°Brix	10.8
Acidez titulable	1,47
pH	3,38

Fuente: Cubas Juárez L. M. *et al.*, 2016.

Los ácidos de mayor importancia en la piña, basado en su concentración son el cítrico y el málico. De estos, el primero aporta alrededor del 80% de la acidez total. También existe en la fruta pequeña cantidad de ácido ascórbico, pero este contribuye en muy baja proporción a su acidez (Morales, M., *et al.*, 2001).

Durante la post cosecha la acidez titulable exhibe un leve aumento, pero posteriormente tiende a bajar hasta llegar ligeramente arriba de su punto inicial. (Tejeda L., 2010).

En la Tabla N° 4.3 se muestra las características fisicoquímicas de la piña.

**TABLA N° 4.3**  
**CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE LA PIÑA**  
**(*Ananas comosus*)**

<b>Acidez Total Titulable (% Ác Cítrico)</b>	<b>pH</b>	<b>Acido Propiónico (ppm)</b>	<b>Azúcares Totales (%)</b>	<b>Azúcares Reductores (%)</b>
0.71	3.83	2.73	6.22	3.17

Fuente: Morales, M., *et al.*, 2001.

#### **4.3: Componentes de la Cáscara de piña**

##### **Aprovechamiento y valoración de residuos de la piña**

La cáscara de piña está compuesta principalmente por fibra (77.61), proteína cruda (6.56%) y carbohidratos no estructurales (12%). (Montilla, M., & Álvarez, C., 2007).

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).

El deficiente manejo y disposición que se hace de los desechos agroindustriales está conduciendo a preocupantes problemas ambientales que va en aumento debido a la producción de desechos, los cuales directa o indirectamente llegan a las corrientes

superficiales y por otra parte deteriora los suelos y pastizales agrícolas. Debido a la problemática ambiental por residuos generados al año se ha despertado cierto interés para el aprovechamiento de los desechos considerados como residuo para la obtención de nuevos productos de valor agregado (Saval S., 2012).

De acuerdo a la bibliografía consultada se han realizado estudios como la obtención de celulosa y bioetanol a partir del bagazo de piña, en la cual se presentan producciones de etanol del 35% con bagazo y del 57% con celulosa, por tiempos de fermentación de 48 y 72 h (Antonio C. *et al.*, 2011). Por otra parte, Quesada-Solis K. *et al.*, (2005), menciona el aprovechamiento de fibras del rastrojo de piña para reforzar resinas de poliéster, observando mejoras en la resistencia a la ruptura por tensión. Asimismo, García-Rosales G. *et al.*, (2013), presenta la preparación de carbones acondicionados con nano partículas utilizando cáscaras de piña tratadas con sales de hierro, obteniendo materiales carbonosos con área superficial esférica de 167 m<sup>2</sup>/g y nano partículas de hierro con un diámetro entre 10 y 30 nm.

### **Composición de la lignocelulosa.**

La biomasa lignocelulósica está compuesta por los polisacáridos, lignina y otras sustancias. (Medina M. *et al.*, 2011).

#### **a. Polisacáridos.**

En su mayoría, los carbohidratos presentes en la naturaleza se encuentran en forma de polisacáridos, estos no solamente están compuestos por azúcares unidos por enlaces glucosídicos, sino también pueden contener estructuras sacaridas poliméricas unidas por enlaces covalentes a aminoácidos, péptidos, proteínas, lípidos y otras estructuras (Pérez *et al.*, 2002).



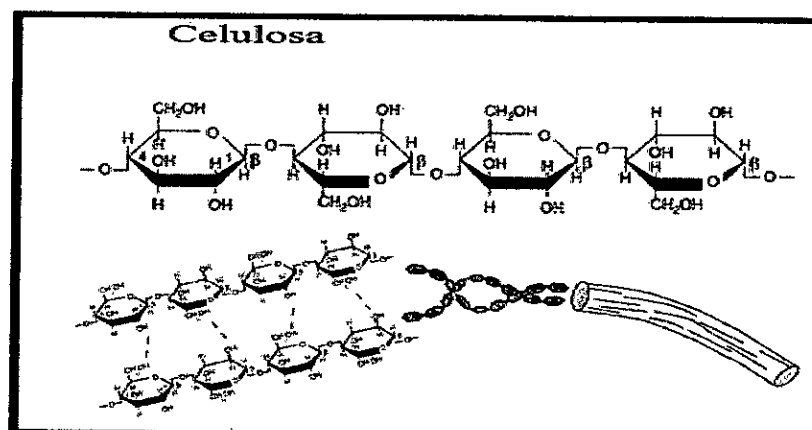
Comprende del 60-80% del material lignocelulósico. Este componente hace referencia a la celulosa y hemicelulosa que son hidrocarburos de alto peso molecular (Mathews, C.K., K.E. Van Holde Y K.G. Ahern. 2004).

## Celulosa

La celulosa es el polímero más abundante de la naturaleza, recibe el nombre de biopolímero ya que forma parte de estructuras biológicas vegetales. Su estructura está formada por monómeros de glucosa unidos por enlaces en el carbono 1 y el carbono 4 por medio de una unión  $\beta$ , es de peso molecular alto. (Laureano-Pérez, 2005).

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).

FIGURA N° 4.2  
ESTRUCTURA DE LA CELULOSA



Fuente: Mathews, C.K., K.E. Van Holde Y K.G. Ahern. 2004.

Los extremos del polímero son asimétricos, los que contienen el carbono anomérico (C1) libre de la molécula de glucosa pueden reducir a un número de oxidantes (como el cobre, etc.), y se conocen como extremos reductores. Mientras que el C4 con un radical hidroxilo libre es el extremo no reductor (McKee T. & McKee J., 2014). El arreglo de las moléculas de celulosa en la pared celular de las plantas es jerárquico. La configuración tridimensional es estabilizada mediante interacciones de van der Waals, y consiste de 30 moléculas lineales, de entre 10,000 y hasta 14,000 moléculas de glucosa, que forman una estructura conocida como protofibrilla; ésta a su vez se asocia con otras protofibrillas para formar la fibrilla de celulosa. Por último, las fibrillas se ensamblan entre ellas para formar las fibras de celulosa que son entrelazadas mediante interacciones no covalentes con la hemicelulosa y la lignina (Lynd *et al.*, 2002). Dentro de las fibras de celulosa se distinguen diferentes regiones que van desde las más organizadas (región cristalina) y hasta las desordenadas (región amorfa). La característica cristalina de la celulosa se debe a que los componentes moleculares de las microfibrillas están organizados muy compactamente mediante puentes de hidrógeno. La naturaleza estructural de la celulosa cristalina la vuelve insoluble en la mayoría de los solventes, incluyendo el agua, y evita que sea atacada por enzimas microbianas. A este fenómeno se le conoce como recalcitrancia (Himmel M. *et al.*, 2007).

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; dos terceras partes de la celulosa están en forma cristalina y la mayoría de la celulosa se encuentra en la capa S2 de la pared celular que no está expuesta a los agentes externos. Esto supone la existencia de sucesivas barreras protectoras que dificultan el acceso de agentes químicos y enzimas a las cadenas de celulosa. (Martín C. y P. Manzanares, 1994).

Las estructuras fibrilares están estabilizadas lateralmente por puentes de hidrógeno entre grupos hidroxilo intra e intermoleculares y todos los átomos de carbono están

fijados en una posición concreta respecto a los otros. Las regiones donde las microfibrillas presentan una estructura altamente ordenada se llaman regiones cristalinas y las regiones con una estructura menos ordenada se denominan amorfas, por ello la celulosa se considera un polímero semicristalino. Cuanto más ordenada y cristalina es la celulosa resulta menos soluble y más difícil de hidrolizar (Zhang H. y Lynd L., 2004; Laureano-Pérez L. *et al.*, 2005).

### **Hemicelulosa**

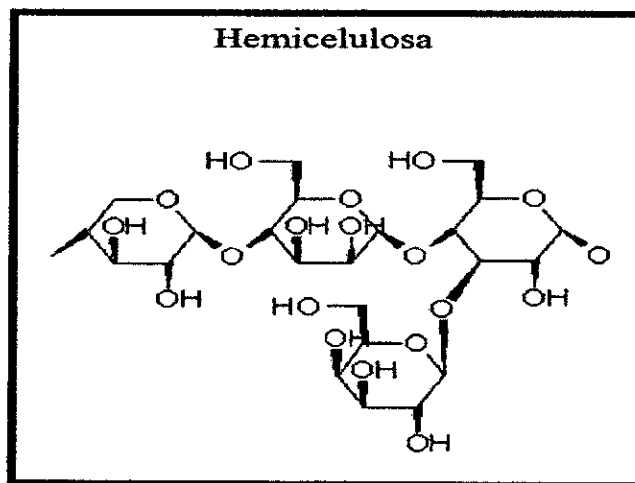
La hemicelulosa es un polímero complejo de heteropolisacáridos formado por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) que forman cadenas ramificadas y los ácidos 4- O-metilglucurónico, D-galacturónico y D-glucurónico, los azúcares están unidos por enlaces  $\beta$ -1,4 y ocasionalmente por enlaces  $\beta$ -1,3 (Pérez J. *et al.*, 2002).

La cadena principal recibe el nombre de xilano: polímero de xilas unidas por enlaces  $\beta$ -1,4, sustituidos con residuos del ácido  $\alpha$ -D-glucurónico y de  $\alpha$ -L-arabinosa, fácilmente hidrolizables (Mathews, C., K.E. Van Holde y K.G. Ahern, 2004).

La hemicelulosa por su parte, es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza. A diferencia de la celulosa su estructura no es homogénea. Está formada de pentosas (xilosa y arabinosa), hexosas (glucosa, galactosa y manosa) y compuestos fenólicos (como el ácido ferúlico y p-cumárico). Las hemicelulosas son polidispersas (lo que significa que tienen un grado de polimerización variable) y altamente ramificadas, con sustituyentes de diferentes tipos (Saha B., 2003). La frecuencia y composición de las cadenas depende de cada especie vegetal en particular y del método con el que fueron extraídas (Puls J. *et al.*, 2005).

En la Figura N° 4.3 se muestra la estructura de la hemicelulosa.

**FIGURA N° 4.3**  
**ESTRUCTURA DE LA HEMICELULOSA**



Fuente: Mathews, C.K., K.E. Van Holde Y K.G. Ahern. 2004.

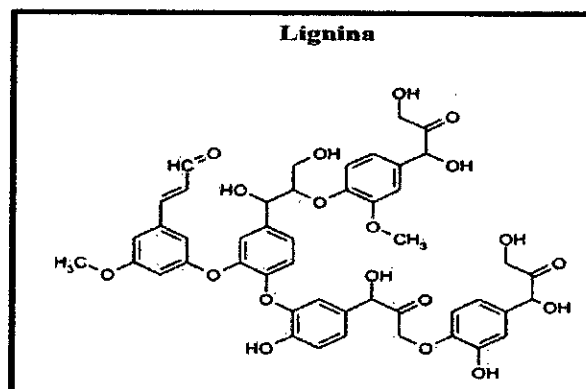
Se han identificado dos tipos de hemicelulosa: en las maderas duras ésta existe mayormente en forma de xilanos, en las que los esqueletos homopoliméricos del xilano son cadenas de residuos de -D-xilopiranososa con uniones 1,4. Mientras que las maderas suaves contienen principalmente glucomanano. Se considera que las moléculas de hemicelulosa se encuentran altamente entrecruzadas mediante puentes diferúlicos formando una red en la que se encuentran embebidas las microfibrillas de celulosa, al tiempo que proteínas de la pared celular también forman puentes con el ácido ferúlico, dándole gran resistencia e insolubilidad a toda la estructura. Estas propiedades, junto con la lignina, contribuyen a la elevada recalcitrancia de los materiales celulósicos. (Saha B., 2003).

## Lignina

Es un heteropolímero amorfo, tridimensional y ramificado formado por alcoholes aromáticos que da soporte estructural, rigidez, impermeabilidad y protección a los polisacáridos estructurales (celulosa y hemicelulosa) y es altamente resistente a la degradación química y biológica (Pérez J. *et al.*, 2002).

La lignina es la tercera fracción mayoritaria de los materiales lignocelulosicos la constituye un polímero de naturaleza heterogénea que varía en la proporción de sus monómeros constitutivos y el tipo de enlaces entre ellos, dependiendo del tipo de vegetal, tejido del que se trate o incluso capa de la pared celular considerada. En general, su estructura puede definirse como un polímero tridimensional constituido por la asociación de unidades monoméricas de estructura básica de tipo fenilpropano ligadas por diferentes tipos de enlaces que se alternan de manera desordenada (Figura N°4.4). Basándose en su posible biogénesis, La lignina se ha definido como un polímero tridimensional cuya estructura básica es el resultado de la polimerización de unidades de alcohol p-hídrosi cinámico con diferente contenido de sustituyentes metoxilo. (Martín C. y P. Manzanares, 1994).

**FIGURA N° 4.4**  
**ESTRUCTURA DE LA LIGNINA**



Fuente: Mathews, C.K., K.E. Van Holde y K.G. Ahern. 2004.

b. **Otras sustancias.**

Son aquellas que no hacen parte de la estructura de la pared celular, ejemplo de estas son: grasas, ceras, alcaloides, proteínas, fenoles simples y complejos, azúcares simples, pectinas, mucílagos, gomas, resinas, terpenos, etc. Estas pueden ser intermediarios metabólicos o que simplemente aportan propiedades físicas.

En la Tabla N° 4.4 se muestra la composición química proximal de la cáscara de piña seca y fresca.

**TABLA N° 4.4**  
**COMPOSICIÓN QUÍMICA PROXIMAL DE LA CÁSCARA DE PIÑA SECA Y FRESCA**

<b>Parámetros</b>	<b>Húmeda</b>	<b>Seca</b>
Humedad (%)	71.07	27.43
Sólidos totales (%)	29.03	72.57
Sólidos volátiles (%)	96.12	95.90
pH	4.70	4.70
Cenizas (%)	3.88	4.10
<i>% en base seca</i>		
Celulosa	11.20	12.00
Hemicelulosa	7.00	6.50
Pectina	6.70	7.10
Sólidos en éter solubles	6.10	6.70
Proteína	3.13	3.30
Azúcares reductores	25.80	27.80
Azúcares no reductores	5.70	4.90
Lignina	11.52	11.00
Ácidos grasos volátiles (mg/L)	800	650

Fuente: Swaroopa R. & Krishna N., 2004.

La cáscara de piña está compuesta principalmente por fibra (77.61), proteína cruda (6.56%) y carbohidratos no estructurales (12%). (Montilla, M., & Álvarez, C., 2007).

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).

#### **4.4: Pretratamientos de la biomasa lignocelulósica**

En los últimos años, se ha avanzado en el desarrollo de procesos de pretratamiento e hidrólisis más efectivos que conducen a un mayor rendimiento de azúcares. (Talebnia *et al.*, 2010).

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

Para poder procesar adecuadamente los materiales lignocelulósicos es necesario someterlos a pretratamientos para poder favorecer la hidrólisis de la celulosa para generar azúcares fermentables mediante el uso de celulasas (Medina M. *et al.*, 2011). La lignocelulosa es altamente resistente a hidrólisis, ya que el conjunto de celulosa, hemicelulosa y lignina, están unidos entre sí por enlaces covalentes, diversos puentes intermoleculares y fuerzas de van der Waals (Kumar S. *et al.*, 2010). El fin de someter a pretratamientos al material vegetal es facilitar la hidrólisis principalmente de la celulosa ya que la conformación natural, llamada cristalina, es muy resistente a hidrólisis. Los pretratamientos promueven la generación de regiones amorfas en la celulosa las cuales son más susceptibles a hidrólisis (Hu Z. y Wen Z., 2008).

En la Tabla N° 4.5 se muestran los tipos de pretratamientos para materiales lignocelulosicos con algunos ejemplos de pretratamientos.

**TABLA N° 4.5**  
**PRETRATAMIENTOS PARA MATERIALES LIGNOCELULOSICOS.**

Pretratamiento	Descripción
Físico	Reducción de tamaño de partícula para aumentar el área de superficie de hidrólisis.
Autohidrólisis	Altas temperaturas (150 - 180 °C) y presión, la hemicelulosa y lignina comienzan a solubilizarse dejando a la celulosa más expuesta.
Químicos	Solubilizan la lignina y la hemicelulosa dejando a la celulosa expuesta para ser hidrolizada. Se emplean ácidos y/o bases.
Oxidativos	Se agregan agentes oxidantes como ácido acético, peróxido de hidrogeno u ozono, donde se afecta a la lignina y hemicelulosa.
Biológicos	Utilización de hongos y bacterias capaces de solubilizar la lignina y dejar expuesta la celulosa para ser hidrolizada.

Fuente: Arellano P. 2015.

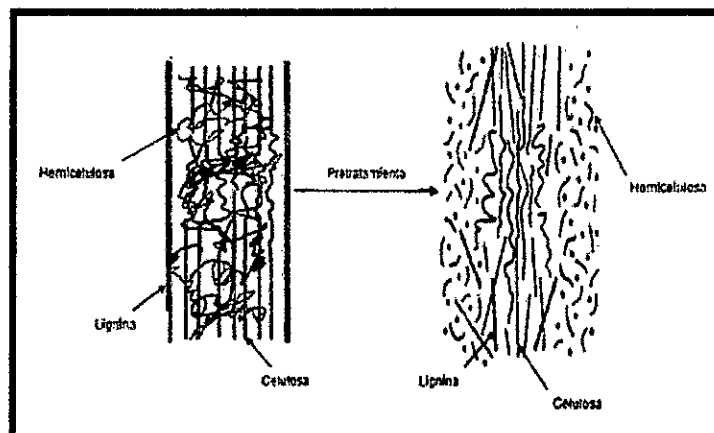
Existen diversos procesos para llegar al mismo fin, donde el proceso va desde un tratamiento mecánico, como la reducción de tamaño de partícula para aumentar el área de superficie de hidrólisis y disminuir el grado de polimerización de los compuestos (Palmowski L. y Mueller J., 1999).



También se usan tratamientos térmicos donde el efecto es que a altas temperaturas (150 – 180 °C) la hemicelulosa y lignina comienzan a solubilizarse dejando a la celulosa más expuesta para ser hidrolizada. Se han usado tratamientos ácidos y alcalinos, los cuales promueven de igual manera la solubilización de la lignina y principalmente la hemicelulosa teniendo el mismo propósito que el tratamiento térmico. También se puede optar por tratamientos oxidativos, donde se agregan agentes oxidantes como ácido peracético, peróxido de hidrógeno u ozono, donde el objetivo es afectar la lignina y hemicelulosa y promover la accesibilidad a la celulosa para su hidrólisis. A excepción de los tratamientos mecánicos, los tratamientos químicos (ácidos, álcalis u oxidación) se pueden combinar con los térmicos para poder aumentar la susceptibilidad de la celulosa al hidrólisis (Hendriks A. y Zeeman G., 2009).

En la Figura N° 4.5 se muestra el esquema del cambio estructural del material lignocelulósico luego de un pretratamiento sobre la biomasa lignocelulósica que es la exposición de la celulosa rompiendo la lignina y hemicelulosa que la cubren (Mosier N. *et al.*, 2005).

**FIGURA N° 4.5**  
**EFFECTO DEL PRETRATAMIENTO SOBRE LA BIOMASA**  
**LIGNOCELULÓSICA**



Fuente: Mosier N. *et al.*, 2005).

Una vez que se haya encontrado el pretratamiento adecuado para el material con el que se va a trabajar, se procede a hidrolizar el material para generar azúcares monoméricos. Medina M. *et al.*, 2011.

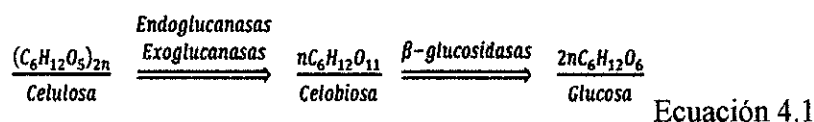
La conversión de biomasa lignocelulósica a etanol es un proceso complejo debido a la estructura química de la pared celular de este material vegetal, por lo tanto, es necesario implementar un tratamiento previo el cual permita pasar de un complejo celulósico a azúcares fermentables que contengan principalmente glucosa (Han M. *et al.*, 2011).

Como proceso de pretratamiento se han explorado diferentes métodos como la hidrólisis ácida concentrada (Liao W. *et al.*, 2006), ácida diluida (Cara C. *et al.*, 2008), tratamiento alcalino (Carrillo F. *et al.*, 2005), tratamiento con solventes orgánicos (Xu F. *et al.*, 2006) entre otros.

#### 4.5: Hidrólisis enzimática

En esta etapa se produce la liberación de azúcares simples que provienen del material lignocelulósico degradado por enzimas específicas para este propósito. Las enzimas involucradas en este proceso son principalmente las endoglucanasas, exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas (Talebnia F. *et al.*, 2010), que trabajan sinérgicamente en la liberación de glucosa. Las endoglucanasas atacan sitios internos de las regiones de baja cristalinidad de la fibra de celulosa para transformarla en cadenas de extremos libres. Las exoglucanasas atacan los extremos libres, removiendo unidades de moléculas de celobiosa, las cuales son transformadas en glucosa por la acción de las  $\beta$ -glucosidasas.

La Ecuación 4.1 ilustra el mecanismo utilizado para la transformación de celulosa a simples unidades de glucosa.

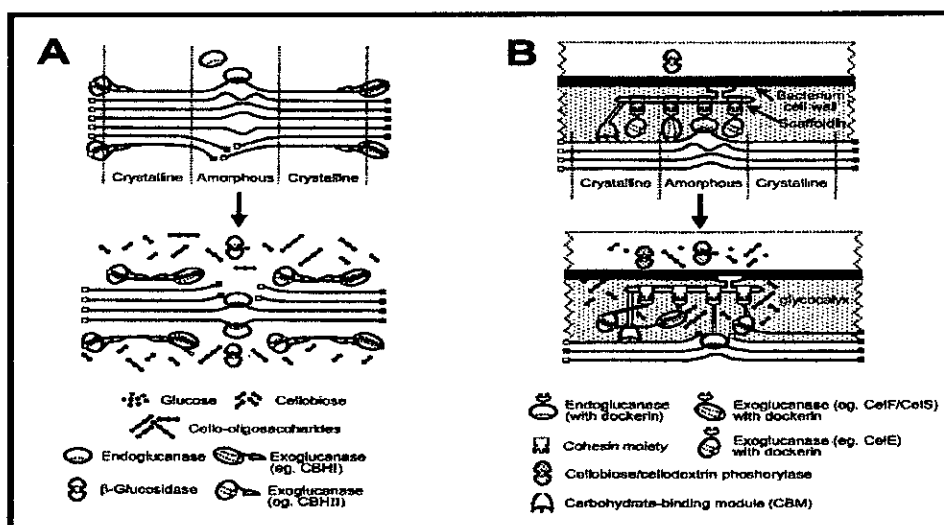


De acuerdo a lo reportado por Talebnia F. *et al.*, (2010); Castro C. *et al.*, (2004), la hidrólisis enzimática sufre de inhibición por sustrato y por producto final, lo que puede afectar importantemente la liberación de glucosa.

La hidrólisis enzimática de carbohidratos de plantas ha emergido como la tecnología más prominente para la conversión de biomasa en monómeros de azúcares para la subsecuente fermentación y generación de bioetanol (Liscano M., 2014).

En la Figura N° 4.6 se muestra la representación esquemática de hidrólisis de la celulosa amorfa y microcristalina por celulosa no complejada (A) y complejada (B) sistemas. Los cuadrados sólidos representan extremos reductores, y los cuadrados abiertos representan extremos no reductores. se indican las Regiones amorfas y cristalinas. La celulosa, las enzimas y los productos hidrolíticos no se muestran a escala. (Lynd R. *et al.*, 2002).

**FIGURA N° 4.6**  
**REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE HIDRÓLISIS DE LA CELULOSA**  
**MICROCRISTALINA Y AMORFA POR EL COMPLEJO CELULOSA**



Fuente: (Lynd R. *et al.*, 2002).

*Handwritten signature*

Durante el pretratamiento el sustrato lignocelulósico aumenta la digestibilidad con el incremento de la porosidad permitiendo la accesibilidad de las celulasas a la celulosa. (Bohorquéz C. y Herrera S., 2005).

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 (Bohorquéz C. y Herrera S., 2005).

Actualmente se propone 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 (Krogh K. *et al.*, 2004; Wen N. *et al.*, 2005; Sehnem Z *et al.*, 2006).

Paredes M. *et al.*, (2011), informan que la especificidad de hidrólisis hace que las celulasas actúen a condiciones bastante específicas u óptimas de pH y temperatura, 5,3 y 50 °C respectivamente. A la temperatura de 50°C produce la mayor cantidad de glucosa en 1000 ml de sustrato y que a las temperaturas superiores e inferiores a la óptima, la enzima produce menor cantidad de azúcares. (ver en anexos, Grafico N° 10.1 y N°10.2 de la página 122.

En la Tabla 4.6 se encuentran los parámetros de operación más relevantes a los que se trabaja para la hidrólisis enzimática en condiciones óptimas, lo que permite obtener altos rendimientos de glucosa. (Juri S. 2011; Talebnia *et al.*, 2010).

**TABLA N° 4.6**  
**RANGO ÓPTIMO DE OPERACIÓN DE LOS PARÁMETROS EN LA**  
**HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA**

<b>PARÁMETRO</b>	<b>RANGO ÓPTIMO DE OPERACIÓN</b>
Temperatura	45 -55°C
pH	4 - 5
Dosis de Celulasa	10 – 30 [FPU/g material lignocelulósico]
Tiempo de acción	48 -72 horas

Fuente: Juri S. 2011; Talebnia *et al.*, 2010

La celulasa fúngica consta de tres compuestos enzimáticos principales: 1) endoglucanasas (EC 3.2.1.4) que hidrolizan al azar enlaces glicosídicos en regiones amorfas de la celulosa generando oligosacáridos, lo que causa la disminución en la longitud de las cadenas y un incremento de los azúcares reductores, 2) celobiohidrolasas o exoglucanasas (EC 3.2.1.74) que actúan sobre los extremos no-reductor y reductor de las cadenas de celulosa liberando glucosa o celobiosa, y 3)  $\beta$ -glucosidasas (EC 3.2.1.21) que hidrolizan la celobiosa, no fermentable, en glucosa. Entre las hemicelulasas fúngicas destacan las enzimas hidrolíticas del xilano como la xilanasa y la  $\beta$ -xilosidasa que rompen la cadena principal (Shallom D. y Shoham Y., 2003) y enzimas que rompen las ramificaciones como las  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55),  $\alpha$ -D-glucuronosidasas, acetixilano esterasas, ferúlico esterasas y  $\beta$ -galactosidasas (Saha B., 2005).

Los hongos filamentosos capaces de producir enzimas hidrolíticas son: *Sclerotium rolfsii*, *P. chrysosporium* y especies de *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* y *Penicillium* (Duff S. y Murray W., 1996). Las enzimas producidas por el hongo *Trichoderma reesei* son las mejor caracterizadas y es por ello que se usan a menudo para la sacarificación enzimática de materiales lignocelulósicos (Esterbauer H. *et al.*, 1991). No obstante, en el caso de la obtención de bioetanol a partir de los residuos industriales de la piña, los estudios se han descartado por el empleo de celulasa y hemicelulasa provenientes de *Aspergillus niger* (Martínez C. *et al.*, 2008; Conesa C. *et al.*, 2010).

Las sustancias celulósicas se convierten en azúcares fermentables por hidrólisis con ácidos inorgánicos, principalmente residuos lignocelulósicos. (Martínez T., 2002).

Las celulasas son glicosil hidrolasas, y utilizan dos mecanismos de hidrólisis del enlace glucosídico que generan dos posibles configuraciones estereoquímicas finales. Un tipo de enzimas llevan a cabo una reacción en la que el carbono anomérico mantiene su posición (mecanismo de retención) y otro tipo en la que se pierde (mecanismo de inversión) (Withers S., 2001). Las glicosil hidrolasas se clasifican en base a su secuencia de aminoácidos. Este tipo de clasificación, por familias, permite identificar características estructurales de las enzimas, inferir su mecanismo de acción y determinar relaciones evolutivas entre ellas (Martínez C. *et al.*, 2008). De acuerdo al sitio en el que cortan la fibrilla de celulosa se dividen en tres grandes grupos. Endocelulasas. También denominadas endoglucanasas. Éstas son 1,4--D-glucan glucanohidrolasas (EC 3.2.1.4) que se agrupan en las familias 5, 6, 8, 9 y 12 principalmente, de las glicosil hidrolasas (Baldrian P. & Valaskova V., 2008).

Las endocelulasas actúan de forma azarosa sobre las regiones de celulosa amorfa en el interior del polisacárido, generando oligosacáridos de diferentes tamaños y, por lo tanto, nuevas cadenas terminales. Exocelulasas. Son también conocidas como

exoglucanasas, y actúan procesivamente en los extremos terminales del polímero liberando ya sea moléculas de glucosa, las glucohidrolasas (1,4--D-glucan glucohidrolasa, EC 3.2.1.74); o celobiosa, las celobiohidrolasas (1,4- -D-glucan celobiohidrolasas, EC 3.2.1.91) (Baldrian P. & Valaskova V., 2008). -glucosidasas. Son enzimas -D-glucósido glucohidrolasas (EC 3.2.1.21), pertenecientes a las familias 1 y 3 de las glicosil hidrolasas y se encargan de degradar la celobiosa a monómeros de glucosa (Baldrian P. & Valaskova V., 2008; Lynd L. *et al.*, 2002).

Para la efectiva digestión de la celulosa las enzimas fúngicas han evolucionado mecanismos sinérgicos que les permiten contender con su recalcitrancia (Henrissat *et al.*, 1985). Este fenómeno se refiere a la observación de que la actividad máxima de degradación de la celulosa no se da por enzimas individuales, sino por mezclas de tres o más enzimas (Martínez C. *et al.*, 2008).

Llenque L *et al.*, (2015), logró producir celulasas de *Aspergillus niger* de Bagazo-caña desde el segundo día de incubación y obtuvo una producción final de 0,025 UE/mL a los 20 días de incubación, con tendencia a ir incrementando, lo que permitió concluir que, si fue posible producir celulasas utilizando el bagazo de caña de azúcar tratado, a pH 6,0 en un biorreactor aireado. (ver en Anexos el Gráfico N° 10.3 de la página 123.

#### **4.6: Azúcares Reductores y Equivalente de Dextrosa**

##### **Azúcares Reductores**

Los azúcares reductores son aquellos azúcares que poseen su grupo carbonilo (grupo funcional) intacto, y que a través del mismo pueden reaccionar como reductores (dadores de electrones) con otras moléculas que actuarán como oxidantes (aceptando electrones). Esta propiedad permite determinar la

concentración de una disolución de azúcar midiendo la cantidad de agente oxidante que es reducido. (Badui, 2006).

Todos los monosacáridos son azúcares reductores, ya que al menos tienen un  $-OH$  hemiacetálico libre, por lo que dan positivo a la reacción con reactivo de Fehling, a la reacción con reactivo de Tollens, a la Reacción de Maillard y la Reacción de Benedict. (Sierra A., 2010).

Otras formas de decir que son reductores es decir que presentan equilibrio con la forma abierta, presentan muta rotación (cambio espontáneo entre las dos formas cicladas  $\alpha$  (alfa) y  $\beta$  (beta), o decir que forma *osa* zonas. La reactividad de los distintos azúcares está dada por la disponibilidad de su grupo carbonilo. Se sabe que la forma abierta o extendida de los azúcares no es muy estable, a tal punto que, por ejemplo, en la glucosa representa solo el 0,002%. Las moléculas de azúcar consiguen estabilizarse a través de un equilibrio entre dicha forma abierta y por lo menos dos formas cerradas (anómeros cíclicos) en las que el grupo carbonilo ha desaparecido. (Fennema O., 2000).

El método refractométrico, se basa en la propiedad óptica que tiene la sacarosa al hidrolizarse para desviar el ángulo de la radiación incidente en la interfase de dos medios de densidades diferentes, tomando como medio de referencia el aire, por cambio en la velocidad de la radiación (refracción), que se mide con el índice de refracción y es específico para sustancias puras y en soluciones acuosas puras (Sierra A., 2010).

En el análisis de sacarosa, el índice de refracción de soluciones acuosas de sacarosa depende de la cantidad de material disuelto y puede desde luego servir como medida del contenido de sacarosa presente. (Badui S., 2006).



### **Equivalente de Dextrosa (ED)**

El valor de Equivalente Dextrosa (ED), es utilizado como un indicador del grado de hidrólisis de un jarabe. El ED del almidón es cero y el de la dextrosa es 100 (Quaglia G. & L. Gennaro, 2003).

Se define como el porcentaje de azúcares reductores de un jarabe, calculado como dextrosa en base seca (Badui S., 2006); en consecuencia, el ED de un producto de hidrólisis es igual a su poder reductor como porcentaje del poder reductor de la dextrosa pura (D-Glucosa), y, por tanto, el ED está inversamente relacionado con el peso molecular medio (Fennema O., 2000).

Los jarabes de glucosa son una mezcla entre una solución acuosa de D-glucosa, maltosa y otros oligosacáridos llamados dextrinas. Estos son caracterizados y clasificados por su “equivalente de dextrosa” (ED) que está definido como: el porcentaje en peso de glucósidos reductores presentes en el jarabe con respecto al peso de los sólidos totales de oligosacáridos o que su poder es similar al de una solución con % de glucosa igual al ED. (BeMiller J. y R. Whistle, 2009).

Los jarabes de glucosa se pueden clasificar según su contenido de dextrosa. Los jarabes del tipo I consisten principalmente de segmentos de peso molecular alto y dextrinas lineales. Los jarabes del tipo II contienen 50 – 75% de sacáridos de bajo peso molecular, incluyendo D-Glucosa, maltosa y maltotriosa. Los jarabes del tipo III, denominados como jarabes de glucosa altamente fermentables o de alta conversión, contienen entre 75-85% de D-glucosa, maltosa y maltotriosa. Los jarabes del tipo IV, contienen principalmente D-Glucosa. (BeMiller J. y R. Whistle, 2009).

En la Tabla N° 4.7 se muestra la clasificación de los jarabes de glucosa según su equivalente de dextrosa (DE)

**TABLA N° 4.7**  
**CLASIFICACIÓN DE LOS JARABES DE GLUCOSA SEGÚN SU**  
**EQUIVALENTE DE DEXTROSA (DE)**

<b>TIPO DE JARABÉ</b>	<b>DE</b>
I	20-38
II	38-58
III	58-73
IV	73

Fuente: (BeMiller J. y R. Whistle, 2009).

La hidrólisis de dispersiones de almidón, tanto con ácidos como con enzimas, produce maltodextrinas. Las maltodextrinas son descritas y clasificadas normalmente de acuerdo con su equivalencia en dextrosa (ED). El ED está relacionado con el grado de polimerización (GP) a través de la siguiente ecuación:  $ED = 100/GP$  (tanto ED como GP son valores medios de las poblaciones de moléculas). En consecuencia, el ED de un producto de hidrólisis es igual a su poder reductor como porcentaje del poder reductor de la dextrosa pura (D-glucosa), y, por tanto, el ED está inversamente relacionado con el peso molecular medio. Las maltodextrinas se definen como productos cuyos valores de ED son medibles, pero inferiores a 20. (Beltrán Mondragón A. y L. Herreño Téllez, 2010).

Químicamente las maltodextrinas son un oligosacárido (carbohidrato complejo soluble), o sea un polímero de unos pocos monosacáridos condensados con un grado de polimerización que va de dos a diez aproximadamente. Las maltodextrinas son clasificadas dependiendo de su equivalencia en dextrosa (ED), es decir, el grado de polimerización (GP) o su poder reductor. (López M. *et al.*, 2009).

Las maltodextrinas de menor ED no son higroscópicas, mientras que las de mayor ED (es decir, las de menor peso molecular medio) tienden a absorber humedad. Las maltodextrinas son más bien insípidas y prácticamente sin sabor dulce, y son excelentes para contribuir al cuerpo o volumen de muchos sistemas alimenticios. La hidrólisis hasta valores de ED de 20-60 proporciona mezclas de moléculas que, cuando son desecadas, se llaman sólidos de jarabe de maíz. Estos sólidos de jarabe de maíz se disuelven muy rápidamente y poseen un ligero sabor dulce. La hidrólisis continua del almidón produce una mezcla de D-glucosa, maltosa y otros maltooligosacáridos. Los jarabes con esta composición se producen en la industria en enormes cantidades. Uno de los más comunes tiene un ED de 42. Estos jarabes son estables a causa de que la cristalización no se produce con facilidad en tales mezclas complejas. (López M. *et al.*, 2009).

$$DE = \frac{\% \text{ Azúcar reductor}}{\% \text{ Sólidos}} \times 100$$

#### **4.7: Sólidos Solubles (Grados Brix)**

El contenido de sólidos solubles o grados Brix proporcionan una medida objetiva de la concentración de azúcares disueltos en un producto y de la idea del nivel de dulzura del mismo (Hernández D. y C. Martínez 2012).

El grado brix es el índice de refracción que da una disolución del 1% de sacarosa en peso, 1° brix, corresponde a 1 gramo de azúcar en 100 gramos de solución azucarada (es decir el peso de la solución una vez hecha la mezcla y este tipo de relación se la conoce como peso en peso). Grados brix=Grados baumé x 1.8 (Amerine M.A. & Ough C.S., 2001).

La determinación de la concentración de azúcares en soluciones acuosas, jarabes, almibares, se realiza mediante un refractómetro de azúcares llamado también brixometro. Los grados Brix se expresan como °Bx y miden la cantidad de sólidos solubles presentes en un jugo, pulpa o cualquier solución azucarada, expresados en porcentaje de sacarosa. (Sierra A. *et al.*, 2010)

En esta prueba se mide la cantidad de elementos solubles presentes en la muestra, mediante la refractometría, la cual está dada por la desviación de ángulo luminoso, los azúcares, ácidos orgánicos y alcoholes hacen parte de estos elementos solubles. La concentración en sólidos solubles de una solución se expresa en grados Brix. Originariamente, los grados Brix son una medida de densidad. Un grado Brix es la densidad que tiene, a 20° C, una solución de sacarosa al 1 %, y a esta concentración corresponde también un determinado índice de refracción. (Sierra A. *et al.*, 2010).

Para cualquier muestra que contiene sacarosa o fructosa la medición de Brix se puede hacer para obtener el componente sólido de azúcar. Brix se define como el porcentaje de peso que contiene en solución de sacarosa pura. Para otros azúcares distintos de la sacarosa, se llama "Brix aparente" y es siempre un valor relativo. Aunque la designación de Brix es estrictamente válida sólo para soluciones cuyos sólidos son totalmente sacarosa, la industria utiliza la medición libremente para referirse a cualquier sólido dulce en un producto. (Badui S., 2006).

Como los sólidos no son solamente sacarosa, sino que hay otros azúcares, ácidos y sales, un grado Brix no equivale a una concentración de sólidos disueltos de 1g/10ml. Los grados Brix son, por tanto, un índice comercial, aproximado, de esta concentración que se acepta convencionalmente como si todos los sólidos disueltos fueran sacarosa. La concentración en sólidos solubles de una solución se expresa en grados Brix. Originariamente, los grados Brix son una medida de densidad. Un grado Brix es la densidad que tiene, a 20° C, una solución de sacarosa al 1 %, y a esta concentración corresponde también un determinado índice de refracción. (Fennema O., 2000).

#### **4.8: Antecedentes del Estudio**

Los residuos sólidos han ocasionado impactos ambientales negativos por su disposición inadecuada y porque cada vez son más, asunto asociado al incremento de la población humana, a los procesos de transformación industrial (globalización), y a los hábitos de consumo de los individuos. (Jaramillo G. y L. Zapata, 2008).

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 R., 2010). Por ejemplo, en la hidrólisis de residuos lignocelulósicos como la cáscara de frutas que en su gran mayoría son consideradas biomásas desvalorizadas (Tejeda L. *et al.*, 2010), se puede obtener jarabes glucosados para obtener bioetanol.

Desde hace varias décadas los residuos agroindustriales han sido un foco de atención para varios investigadores a nivel mundial, debido a que parte de sus constituyentes pueden ser materia prima para generar diversos productos de interés, esta situación sigue prevaleciendo en la actualidad y se prevé que continuará en el futuro. (Saval S. 2012).

Para mitigar los efectos ambientales y económicos de fuentes no renovables de energía, a nivel mundial se ha impulsado el uso de materiales renovables que no presenten problemas de seguridad alimentaria y de contaminación ambiental. De esta forma los materiales lignocelulósicos se han convertido en el objetivo de investigación de la comunidad científica que trabaja en la producción de etanol. Sin embargo, la estructura compleja de los materiales lignocelulosicos, hace difícil el acceso a los azúcares fermentables, por lo tanto, se implementan pretratamiento adecuado, junto a estrategias de sacarificación y fermentación eficientes. (Liscano M. 2014).

En Chile, Juri S. (2011), estudió la estrategia de sacarificación y fermentación simultánea (SSF) para residuos forestales (eucalipto y lenga) que fueron pretratados mediante estrategias alternativas: líquidos iónicos (LI) reciclados y hongos de pudrición blanca (HPB). La primera parte del trabajo consistió en estudiar la factibilidad de utilizar el líquido iónico reciclado y luego ver los resultados en la sacarificación enzimática, compararlo con el pretratamiento de líquido iónico puro, con distintas cargas de material y líquido iónico (1:3, 1:5, 1:9, 1:10 p/p). Para eucalipto el mejor pretratamiento se logró con una carga de 1:3 p/p a 150°C por 30 minutos como condiciones de operación con un rendimiento de glucosa/celulosa del 67% respecto al líquido iónico puro (185,1 mg de glucosa por gramo de material). El mejor resultado se dió con una carga 1:5 a 150°C por 15 minutos de pretratamiento, lográndose un 94% del rendimiento glucosa/celulosa respecto al líquido iónico puro (408,3 mg de glucosa por gramo de material).

Albernas Y. *et al.*, (2015), determinaron los parámetros fundamentales de la cinética enzimática a partir de un modelo cinético pseudo-homogéneo de Michaelis Menten, previamente estudiado con otros materiales lignocelulósicos; para determinar la velocidad de producción de Azúcares Reductores Totales (ART) en el tiempo. Para ello se emplearon los resultados obtenidos a nivel de laboratorio, en el cual se llevó a cabo la hidrólisis enzimática del bagazo previamente pretratado de forma ácida y básica. Se

emplearon las enzimas Celulolíticas Novozyme CellicRCTec2 y  $\beta$ -glucosidasa con código NS50010, en un experimento con un diseño factorial 23 haciendo réplicas al azar. Los valores de la constante de Michaelis Menten y constante de inhibición determinados (KM y KI) son intrínsecos al sistema de celulosa y celulasa dado, y son independientes de las variables de operación empleadas.

En Colombia, Monsalve G., J., Medina de Pérez, V., & Ruiz Colorado, A. (2006) evaluaron la hidrólisis ácida del almidón presente en yuca y de la celulosa presente en cáscara de banano y su posterior fermentación a etanol, se ajustaron los medios de fermentación para los microorganismos *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-2034 y *Zymomonas mobilis* CP4. Se caracterizó la cáscara de banano, la cual posee un contenido de almidón, celulosa y hemicelulosa que representan más del 80 % de la cáscara ameritando el estudio de ésta como fuente de carbono. Reportaron que la hidrólisis ácida de cascara de banano produce 20 g/l de azúcares reductores. Para la Yuca con 170 g/l de almidón a; pH 0.8 en 5 horas se logra conversión completa a azúcares reductores. Para la fermentación realizada con *Sacharomyces cerevisiae* se logra una concentración de etanol de  $7.92 \pm 0.31\%$  y no se aprecia una producción considerable de etanol (menor de 0.1 g/l) para ninguno de los medios fermentados con *Zymomonas mobilis*.

Salcedo M. J., Montes M. E. y Pajaro S. J. (2009), realizaron un estudio que tuvo como objetivo la producción y evaluación del rendimiento de jarabes de fructosa a nivel de laboratorio, a partir de jarabes de glucosa obtenidos por medio de hidrólisis enzimática de almidones extraídos de dos variedades de yuca, C. Orense y C. M Tai-8. Para el desarrollo del trabajo, se implementó un diseño experimental de múltiple factor categórico completamente al azar con dos factores, el factor concentración de sustrato en cinco niveles (10, 20, 30, 40 y 50 % p/v de concentración de almidón) y el factor variedad de yuca en dos niveles (C. Orense y C. M Tai-8), con tres repeticiones, en un total de 30 unidades experimentales. De acuerdo al análisis estadístico realizado a los

datos experimentales, se presentan diferencias estadísticas a un nivel de significancia del 5% para la variable rendimiento de fructosa por variedades de yuca, y por concentraciones de almidón para la misma variedad, siendo obtenidos rendimientos máximos de 635.86 y Kg de fructosa/tonelada de almidón para la C. Orense y 674.707 Kg de fructosa/tonelada de almidón para C. M Tai-8 con respecto a la concentración inicial de almidón del 30% p/v.

Por otro lado, Conesa C. *et al.*, (2010). Comprobaron que la adición de celulasa de cualquier origen tiene un mayor poder hidrolítico sobre el residuo que la hemicelulasa, y que esta última favorece la acción de las celulasas. Además, la adición de una misma cantidad de celulasa procedente de *T. reesei* en comparación con la celulasa procedente de *A. niger* produce en general un mayor efecto hidrolítico.

Rodríguez Reinoso, C.E. (2011), realizó un estudio comparativo entre los métodos de hidrólisis ácida y enzimática de banano (*Musa cavendish*) para la obtención de jarabe de glucosa y demostró que, para elaborar jarabe de glucosa a partir de almidón de banano *Musa cavendish* se requiere utilizar banano en estado verde con un grado Brix máximo de 1.2. El proceso de hidrólisis ácida se evaluó haciendo un estudio del efecto de la temperatura y tiempo sobre el rendimiento del proceso, así como de la cristalinidad del jarabe de glucosa. Los tratamientos fueron dispuestos en un diseño completamente al azar (DCA), con arreglo factorial 2x3. Obteniéndose el mayor rendimiento (53.14%) al utilizar una temperatura de 120° C y 30 min de hidrólisis. Este valor fue mucho menor que el obtenido a través de hidrólisis enzimática (90.14%). Respecto a la cristalinidad del jarabe de glucosa, indica que se observó que los tratamientos más cristalinos fueron aquellos en los que se empleó menor tiempo y temperatura en el proceso de hidrólisis. La cristalinidad que se obtuvo con el método ácido fue mayor, que la que se obtuvo por medio del tratamiento enzimático. El análisis de cromatografía de permeación en gel (GPC) mostró que el jarabe de glucosa producto de hidrólisis ácida tuvo un porcentaje aproximado de 46% en dextrinas de 11, 10 y 8



unidades de glucosa, mientras que el del proceso enzimático reveló alta pureza de glucosa.

Quitiguiña C. y Santa Cruz S. (2012), informan que el banano (*Musa cavendish*) es una fruta que se produce en el Ecuador y una parte de su producción está siendo desechada. Por lo que estudió la utilización de este recurso para la conversión de su almidón en jarabe de glucosa, por medio enzimático. Previo a la hidrólisis se preparó un sustrato mediante lavado y secado. El proceso de hidrólisis se realizó en dos etapas. En la primera se utilizó  $\alpha$  amilasa proveniente de *Bacillus amyloliquefaciens*; la cual permitió degradar el almidón hasta dextrinas. En esta etapa se realizaron pruebas para calcular el tiempo óptimo de hidrólisis, el cual fue de 2 horas. También se analizaron las dextrinas obtenidas de hidrólisis mediante cromatografía de permeación en gel, siendo estas de 9, 10 y 11 unidades de glucosa. En la segunda etapa del proceso se utilizó amiloglucosidasa proveniente de *Aspergillus niger*. En esta etapa se realizó un diseño experimental completamente al azar con modelo factorial de  $3^2$  correspondiente a la combinación de tiempo y cantidad de enzima, con dos repeticiones. Las variables estudiadas fueron rendimiento y cristalinidad. El tratamiento recomendado fue de 1,5 ml de enzima y 14 horas de hidrólisis. Tratamiento que corresponde a un rendimiento de glucosa del 90,14%.

## V. MATERIALES Y METODOS

### 5.1: Metodología de la investigación

Para el presente estudio de investigación “Obtención de jarabes glucosados a partir de cáscaras de *Ananas comosus* (Piña) mediante hidrólisis enzimática de Celulasas”, 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 durante el presente estudio para la hidrólisis enzimática 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 para el proceso de elaboración de jarabes glucosados. Las variables dependientes fueron porcentaje de azúcares reductores y porcentaje de Dextrosa Equivalente (D.E.) de las muestras hidrolizadas enzimáticamente. También se evaluaron los grados Brix y el pH. El diseño experimental fue completamente al azar con modelo factorial de 3<sup>2</sup>.

Para llevar a cabo el presente trabajo, el estudio se segmentó en tres etapas. Se estableció los métodos específicos para cada una de ellas, descritos a continuación:

**ETAPA 1:** Tratamiento y estandarización de las cáscaras de piña.

**ETAPA 2:** Hidrólisis enzimática de las cáscaras de piña por celulasas.

**ETAPA 3:** La determinación de la calidad del jarabe a partir de las cáscaras de piña (*Ananas comosus*). Se realizó mediante la evaluación del contenido de % de azúcares reductores y % de Equivalente de Dextrosa (DE). También se evaluaron las características físicas del jarabe.

En cuanto a la delimitación del proyecto, el tratamiento y estandarización de las cáscaras de piña, la Hidrólisis enzimática, la obtención de los jarabes glucosados y el

estudio de la calidad del jarabe se realizó en las instalaciones de los laboratorios de la Facultad de Ingeniería Pesquera y de Alimentos de la Universidad Nacional del Callao.

## **Instrumentación**

### **a. Materiales**

#### **Materiales de vidrio y otros:**

- Vasos de precipitado de 50, 100, 250, 500 y 1000 ml.
- Probetas de 100, 250, 500 y 1000 ml.
- Fiolas de 50, 100 y 250ml.
- Buretas de 25 y 50 ml.
- Pipetas volumétricas de 2, 5 y 10 ml.
- Placas petri
- Recipientes pyrex
- Recipientes de porcelana
- Cuchillos de acero inoxidable.
- Lienzo de tela de nylon
- Frascos de vidrio
- Morteros
- Papel filtro Whatman N° 1 y N° 4
- papel pH indicador con escala
- Pipetas volumétricas de 2, 5 y 10 ml.
- Embudos de vidrio
- Cocinas eléctricas
- Luna de reloj
- Espátulas

- Varilla de vidrio
- Termómetro
- Pro-pipetas
- Tubos de ensayo de vidrio (1,5 x 16,0 cm)
- Soporte Universal con pinzas
- Cronómetro.
- Picetas
- Gradilla y otros.

#### **Material biológico**

- Cáscaras de piña
- Enzima Celulasa fungal
- Mostos de cáscaras de piña hidrolizados por Celulasa

#### **Reactivos**

- Agua potable
- Agua destilada
- Solución de yodo diluida (1:5),
- Hidróxido de sodio 0,1 y 1 N y al 1%
- Indicador de azul de metileno al 1%
- Reactivo de Benedict
- Reactivo de Fehling A y Fehling B
- Solución amortiguadora de Fosfato sódico
- Solución de Fenolftaleína al 1%
- Acetato de Plomo Neutro al 25%
- Carbonato de Sodio anhidro
- Solución de Ácido cítrico al 1% (p/v).
- Solución de Bicarbonato de sodio al 1% (p/v).

## **Equipos**

- Balanza de precisión DT-300A
- Balanza Analítica Adam
- Agitador magnético Fratom
- Refractómetro 0 - 32% Brix RHB-32/ATC
- Refractómetro 28 - 62% Brix RHB-62/ATC
- Medidor portátil de pH Hanna
- Estufa
- Incubadora
- Refrigeradora
- Autoclave

Las fotos experimentales de los materiales y equipos utilizados se muestran en el apéndice en la Figura N° 9.1 de la página N° 110.

### **5.2: Población y procedimiento muestral**

La Etapa 1 del tratamiento y estandarización de las cáscaras de piña se realizó durante los meses de enero a marzo del 2018 en condiciones de laboratorio a partir de cáscaras de piña (*Ananas comosus*) variedad Golden acopiada en puestos de jugos de frutas del pabellón de frutas y verduras, ubicados en el mercado de Lima y Callao. Durante el periodo del estudio se llegaron a utilizar 10 kilos de cáscaras de piña.

La Etapa 2 de la Hidrólisis enzimática de las cáscaras de piña luego del tratamiento y estandarización se realizó durante los meses de abril a junio del 2018 en condiciones de laboratorio utilizando la enzima Granozyme Celulasa Fungal adquirida en la Empresa GRANOTEC y que fue utilizada en diferentes niveles de concentración

(0.5%, 1% y 1.5% (p/v)) y con tiempos de incubación para el hidrolisis de 18, 24 y 30 horas a una temperatura controlada de 50°C.

La Etapa 3 de la determinación de la calidad del jarabe glucosado mediante la evaluación del contenido de azúcares reductores y equivalente de dextrosa se realizó durante los meses de abril a junio del 2018 en condiciones de laboratorio.

### **5.3: Métodos de análisis**

La metodología seguida se basó en el conocimiento científico y tecnológico disponible. Se utilizaron los siguientes métodos de análisis:

1. Determinación del contenido de azúcares reductores. Método de Eynon-Lane. NTP 203.OO2-1979 y NTP 208.102:2014
2. Determinación de humedad. Método gravimétrico. NTP 209.264. 2001.
3. Determinación de la acidez (INDECOPI, NTP 203.070. 1977. Revisada el 2012; INDECOPI, NTP 211.040. 2012).

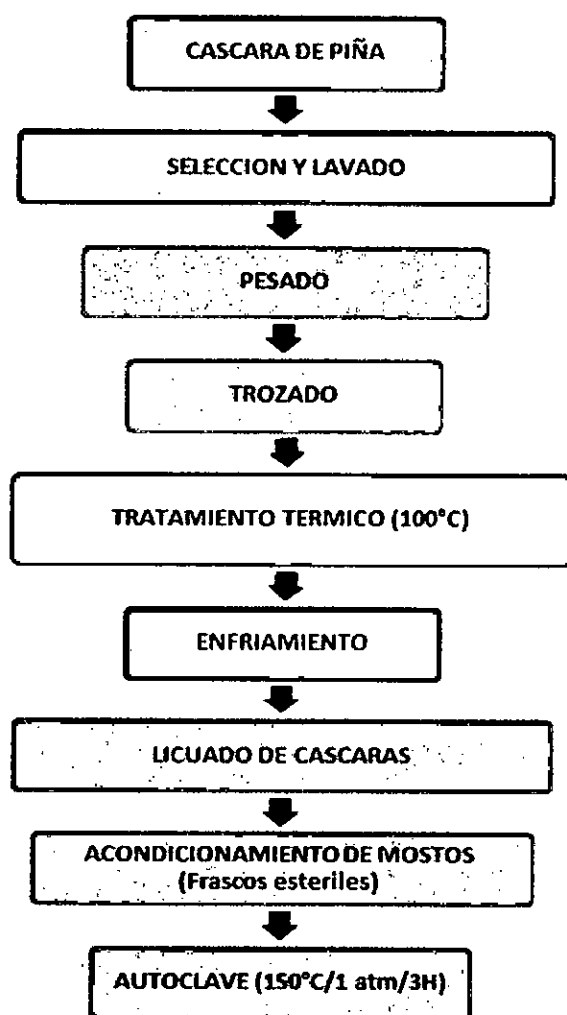
### **Procedimiento de cada etapa de la investigación**

#### **a. Etapa 1: Tratamiento y estandarización de las cáscaras de piña.**

Es necesario el pre-tratamiento de la lignocelulosa de las cáscaras de piña de la variedad Golden. Se realizó un tratamiento mecánico (Físico) de reducción de tamaño y un tratamiento térmico (autohidrólisis) para generar desprendimiento de la lignina y que la celulosa sea más susceptible al hidrólisis.

En la Figura N°5.1 se muestra el diagrama del procedimiento metodológico aplicado para el tratamiento y estandarización de las cáscaras de piña (Etapa 1).

**FIGURA N° 5.1**  
**DIAGRAMA DEL PROCEDIMIENTO METODOLÓGICO**  
**APLICADO PARA EL TRATAMIENTO Y ESTANDARIZACIÓN DE**  
**LAS CÁSCARAS DE PIÑA (ETAPA 1)**



Fuente: Elaboración propia.

*Handwritten signature*

El procedimiento completo desarrollado fue el siguiente:

- Las cáscaras de piña de la variedad Golden fueron seleccionadas descartando aquellas que presentaban daño causado por insectos o presencia de enfermedades.
- Se procedió luego al pesado de las cáscaras de piña, y posterior lavado de las mismas con agua potable para eliminar las impurezas y tierra adherida en las cáscaras.
- Los residuos de cáscara de piña luego fueron sometidos a un proceso de trozado fino para la reducción a un tamaño entre 0,3 y 0,5 cm, con el fin de disminuir el tamaño de la materia prima y así tener una mayor área de contacto entre la enzima celulasa y los reactivos químicos que se van a utilizar para facilitar la hidrólisis enzimática que sigue el proceso.
- Luego las cáscaras (30% p/v) fueron sometidos a un tratamiento térmico en agua a punto de ebullición durante 1 hora, para facilitar el desprendimiento de la lignina presente en estos y producir el ablandamiento de las cáscaras. Para el mantenimiento de la temperatura del agua se utilizaron cocinas eléctricas como fuente de calor.
- Este procedimiento también permitía la muerte o eliminación de la flora microbiana acompañante no deseable en las cáscaras de piña y preservar de esta manera el sustrato en buenas condiciones para su hidrólisis enzimática y evitar la competencia microbiana por los nutrientes del medio.
- Después del tratamiento térmico se dejó enfriar y posteriormente se licuaron las cáscaras de piña.
- Se midieron los volúmenes de los mostos licuados de las cáscaras de piña y se colocaron en frascos de vidrio de borosilicato (resistentes al calor) previamente esterilizados de 1 litro de capacidad.



- Luego los frascos conteniendo los mostos de las cáscaras de piña fueron colocadas en la autoclave a 150°C y 1 atmosfera de presión por 3 horas con el propósito de que las altas temperaturas y presión provoquen una autohidrolisis térmica y permitan que la hemicelulosa y lignina empiecen a solubilizarse dejando a la celulosa más expuesta y se pueda facilitar su hidrolisis en la siguiente etapa del estudio.
- También se determinó la humedad de las cáscaras de piña inicial antes de pretratamiento.

Las fotos experimentales del procedimiento desarrollado para esta primera etapa del presente estudio del tratamiento y estandarización de las cáscaras de piña (*Ananas comosus*) variedad Golden se muestran en el apéndice en la figura N° 9.2, 9.3 y 9.4 de las páginas N° 111, 112 y 113 respectivamente.

#### **Procedimiento para la determinación del porcentaje de Humedad de la cáscara de piña**

Se determinó la humedad de la cáscara de piña. Se utilizó el método gravimétrico de determinación de humedad (NTP 209.264. 2001).

El método para determinar la cantidad de agua presente en la muestra se basa en la pérdida de peso de la muestra por calentamiento en una estufa, refiriendo su peso al peso total de la muestra y expresada como porcentaje.

Para el cálculo del porcentaje de humedad se empleó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100$$

Donde  $P_i$ , es el peso inicial de la muestra antes de colocarla en la estufa,  $P_f$  es el peso de la muestra después de someterla en la estufa.

El procedimiento fue el siguiente:

- Se pesó 10 gramos de cáscaras de piña en una placa Petri (se hicieron tres repeticiones).
- Se colocó en la estufa a 100 – 110 °C por 24 horas.

Las fotos experimentales del procedimiento desarrollado para la determinación del porcentaje de humedad de la cáscara de piña (*Ananas comosus*) variedad Golden se muestran en el Apéndice en la Figura N° 9.5 de la página N° 114.

#### **b. Etapa 2: Hidrólisis enzimática de las cáscaras de piña por Celulasas**

Esta etapa experimental de la investigación se realizó luego del tratamiento y estandarización de las cáscaras de piña que posteriormente se filtraron.

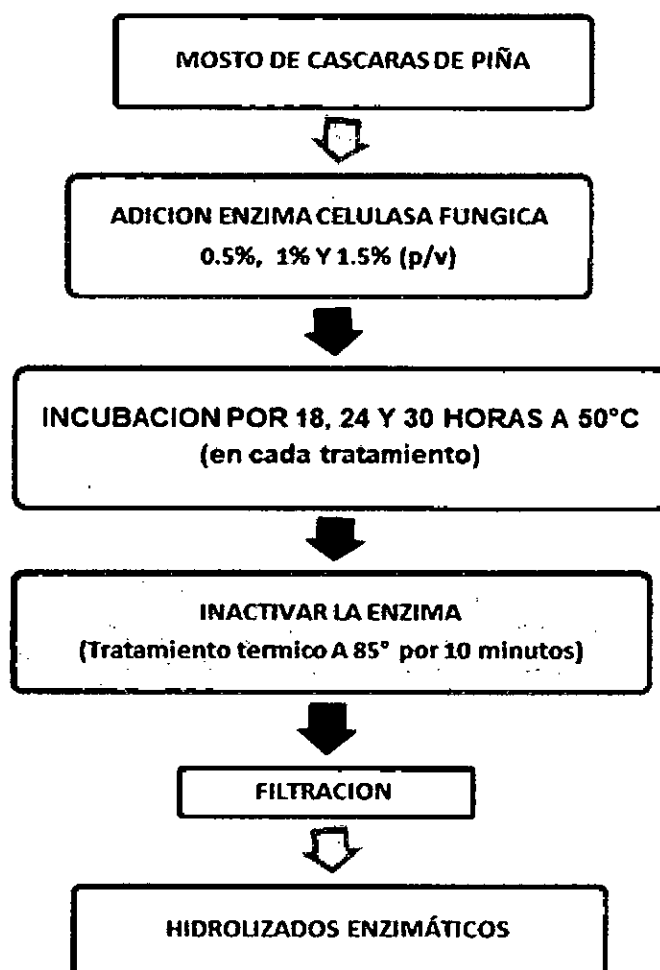
Consistía en la obtención del jarabe empleando los mostos de las cáscaras de piña (*Ananas comosus*) que se obtuvieron en la Etapa experimental 1 y se realizó mediante el método de hidrólisis enzimática con celulasa fungal (Gramozyme Celulasa) en diferentes concentraciones (0.5%, 1% y 1.5% p/v).

La Ficha Técnica de Gramozyme Celulasa (Granotec - Perú) y el Certificado de Análisis Gramozyme Celulasa se muestran en anexos en la Tabla N° 10.1 y 10.2 de las páginas N° 118 y 119 respectivamente.

Las fotos experimentales del procedimiento desarrollado para esta segunda etapa del presente estudio se muestran en las figuras N° 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9 y 5.10 de las paginas N° 58, 59, 60, 61, 62 y 63 respectivamente.

En la Figura N° 5.2 se muestra el diagrama del procedimiento metodológico aplicado para la hidrólisis enzimática por la enzima celulasa a partir de mostos de cáscara de piña (*Ananas comosus*).

**FIGURA N° 5.2**  
**DIAGRAMA DEL PROCEDIMIENTO METODOLÓGICO PROCESO**  
**APLICADO PARA LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA POR LAS ENZIMAS**  
**CELULASAS A PARTIR DE MOSTOS DE CÁSCARA DE PIÑA. (ETAPA 2)**



Fuente: Elaboración propia.

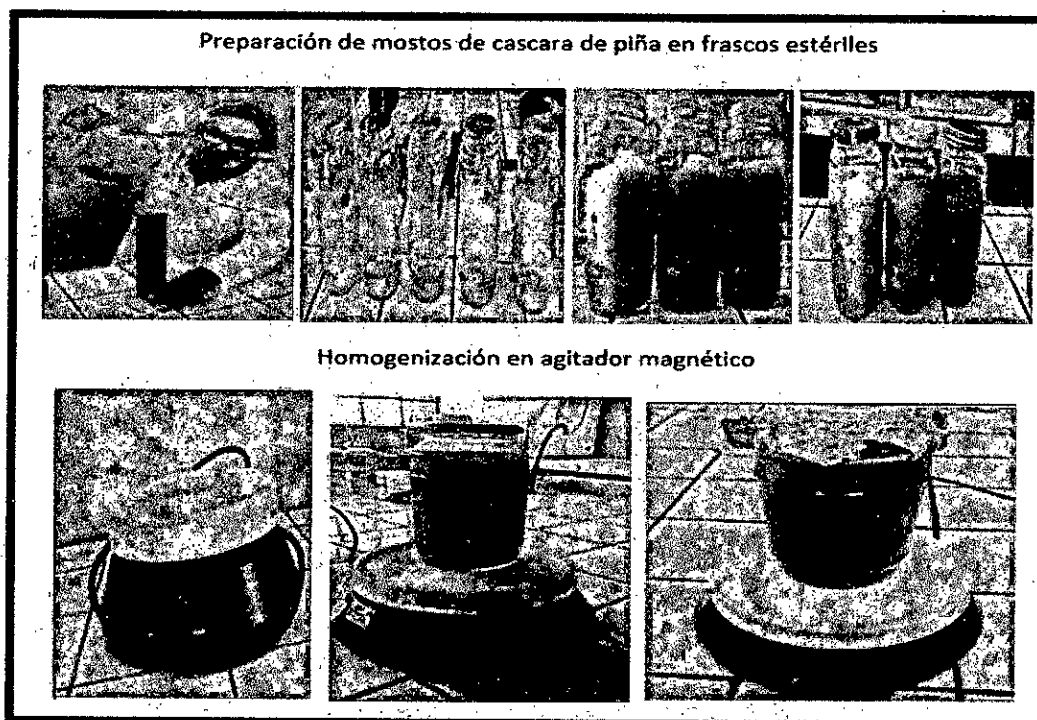
El procedimiento desarrollado en la segunda etapa del estudio fue el siguiente:

- Para los procesos de licuefacción y sacarificación se adaptaron frascos de 1000 ml como biorreactores, en los cuales se depositó 800 ml la solución de los mostos de las cascaras de piña (*Ananas comosus*) que se obtuvieron en la etapa experimental 1.
- El proceso de hidrólisis enzimática es bastante reproducible, siempre y cuando se mantengan constantes los parámetros de tiempo y temperatura (50°C a 18, 24 y 30 horas).
- Se utilizó la enzima celulasa (Gramozyme) de origen fúngico en polvo de color crema, en concentraciones de 0.5%, 1% y 1.5% (p/v) para la Hidrólisis enzimática y obtención de azúcares simples.
- Se colocaron las soluciones en un agitador magnético durante 3 minutos para que se pueda homogeneizar completamente.
- Se midió el grado Brix y pH inicial. La medida de los grados °Brix iniciales se realizó mediante un Refractómetro de 0 - 32% Brix RHB-32/ATC, para ello se colocó la muestra en el foco del prisma, mirando por el ocular, dirigiéndose hacia la luz hasta visualizar una línea definida en el espacio de observación y se procedió a leer el índice de refracción en la escala superior. Para comprobar el nivel de pH se utilizaron el medidor portátil de pH Hanna y papel pH indicador con escala mediante inmersión directa en la muestra.
- Se colocaron en incubación los frascos de los mostos preparados a partir de cáscaras de piña por 18, 24 y 30 horas a 50°C (en cada tratamiento). Luego se midió el pH y grado Brix para comprobar cuales tratamientos permitían la óptima de actividad enzimática de la enzima.
- Se anotó el tiempo de inicio de hidrólisis enzimática por el aumento de los grados Brix de los mostos. En la incubadora se mantuvo la temperatura a 50°C en los diferentes tiempos de incubación.

- Posterior a cada tiempo de incubación evaluado en el estudio se llevó a baño maría cada solución, a una temperatura de 85° durante 10 minutos para inactivar la enzima y bloquear su actividad.
- Luego se procedió a filtrar los jarabes. Se separó el sobrenadante y se midieron los pH y los grados Brix de los mismos.
- Se anotaron los resultados de la prueba de hidrólisis enzimática.

A continuación, se muestran las fotografías del proceso de hidrólisis enzimática indicadas anteriormente en la página N° 52.

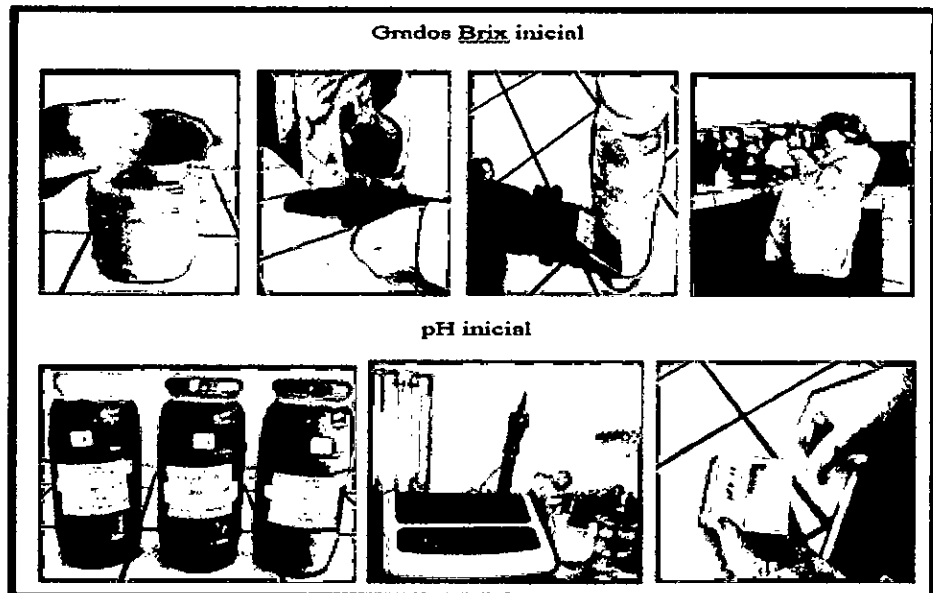
**FIGURA N° 5.3**  
**PREPARACION DE MOSTOS DE CÁSCARA DE PIÑA Y**  
**HOMOGENIZACION**



Fuente: Elaboración propia.

*Revisado*

**FIGURA N° 5.4**  
**MEDIDA DE pH Y GRADO BRUX INICIAL DE MOSTOS DE**  
**CÁSCARA DE PIÑA**



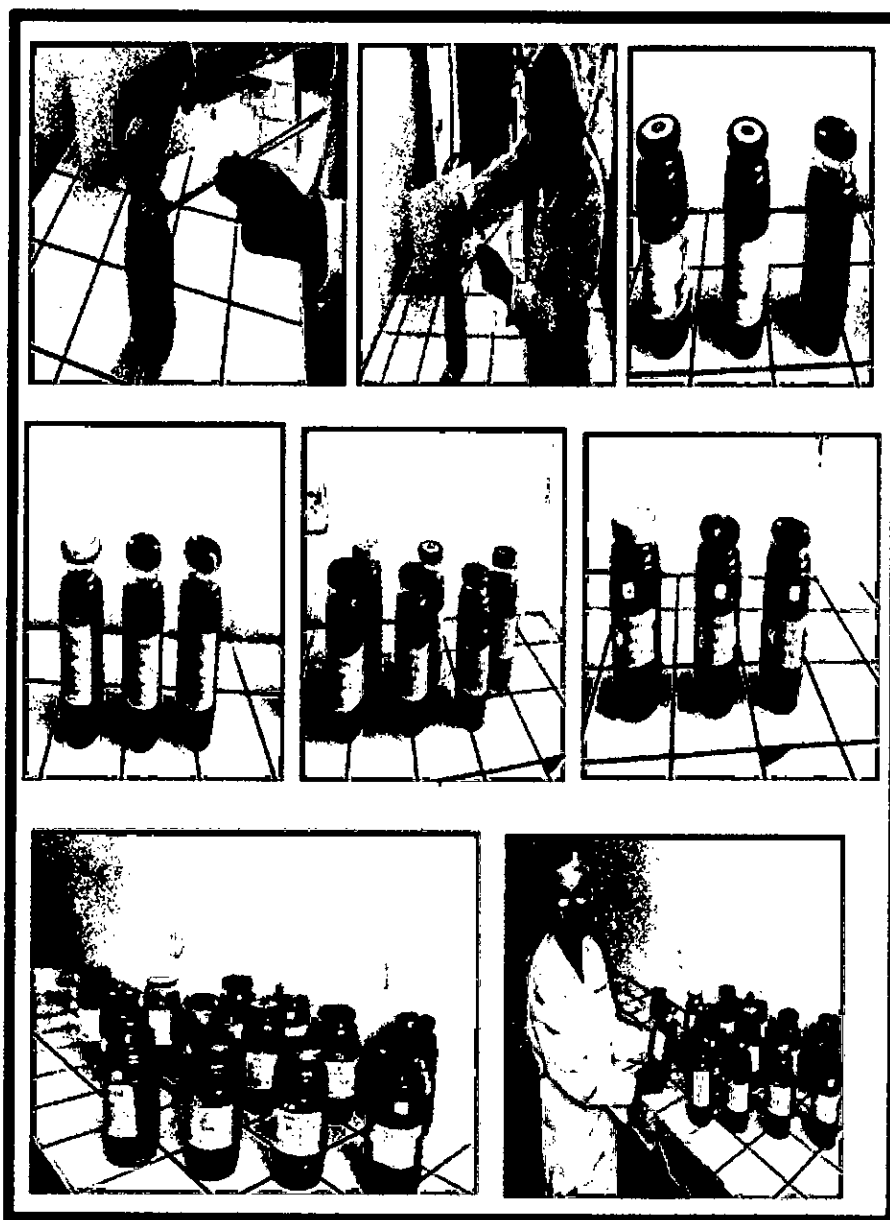
Fuente: Elaboración propia.

**FIGURA N° 5.5**  
**PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN ENZIMÁTICA DE CELULASA AL**  
**0.5%, 1% Y 1.5% (p/v) Y HOMOGENIZACION**



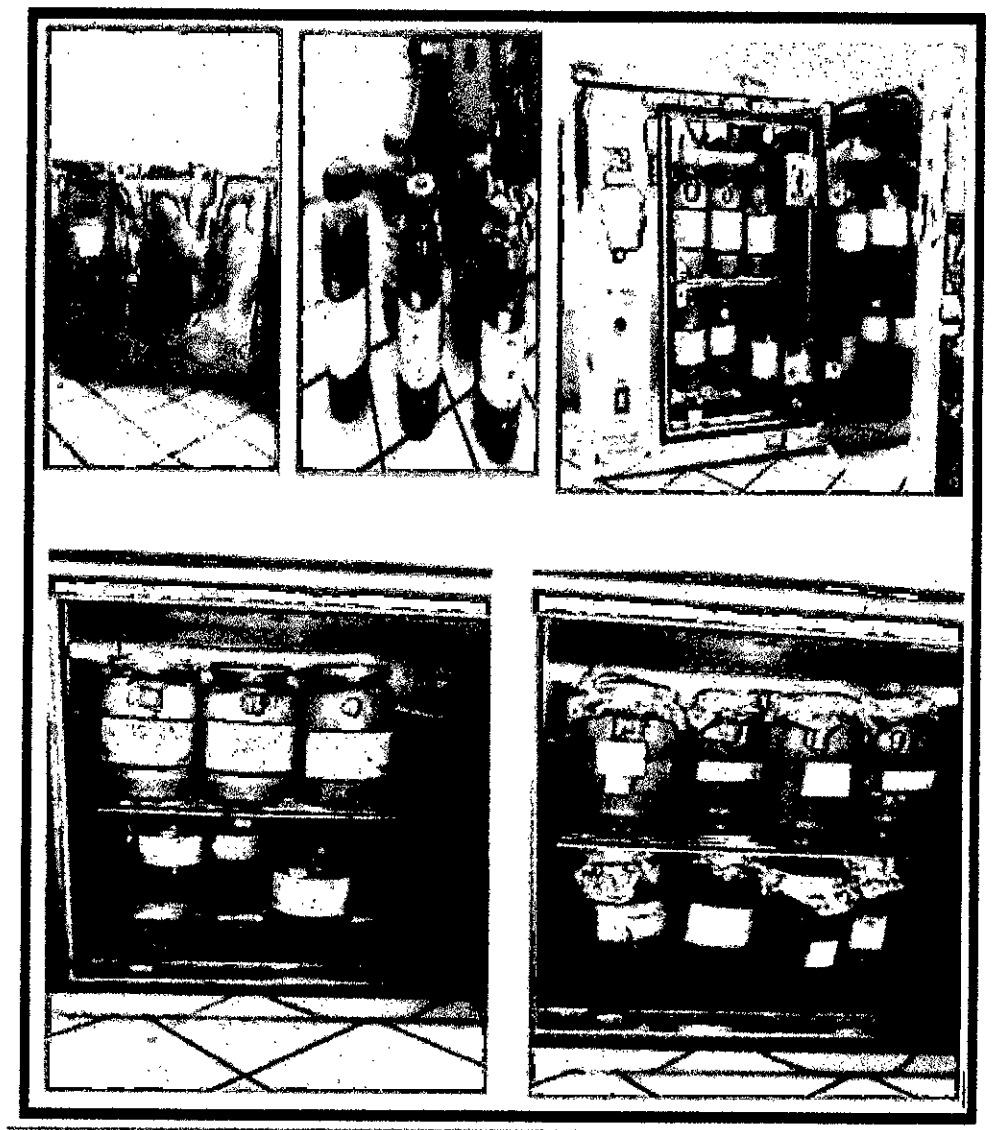
Fuente: Elaboración propia.

**FIGURA N° 5.6**  
**ADICIÓN DE SOLUCIÓN ENZIMÁTICA DE CELULASA AL 0.5%,**  
**1% Y 1.5% (p/v)**



Fuente: Elaboración propia.

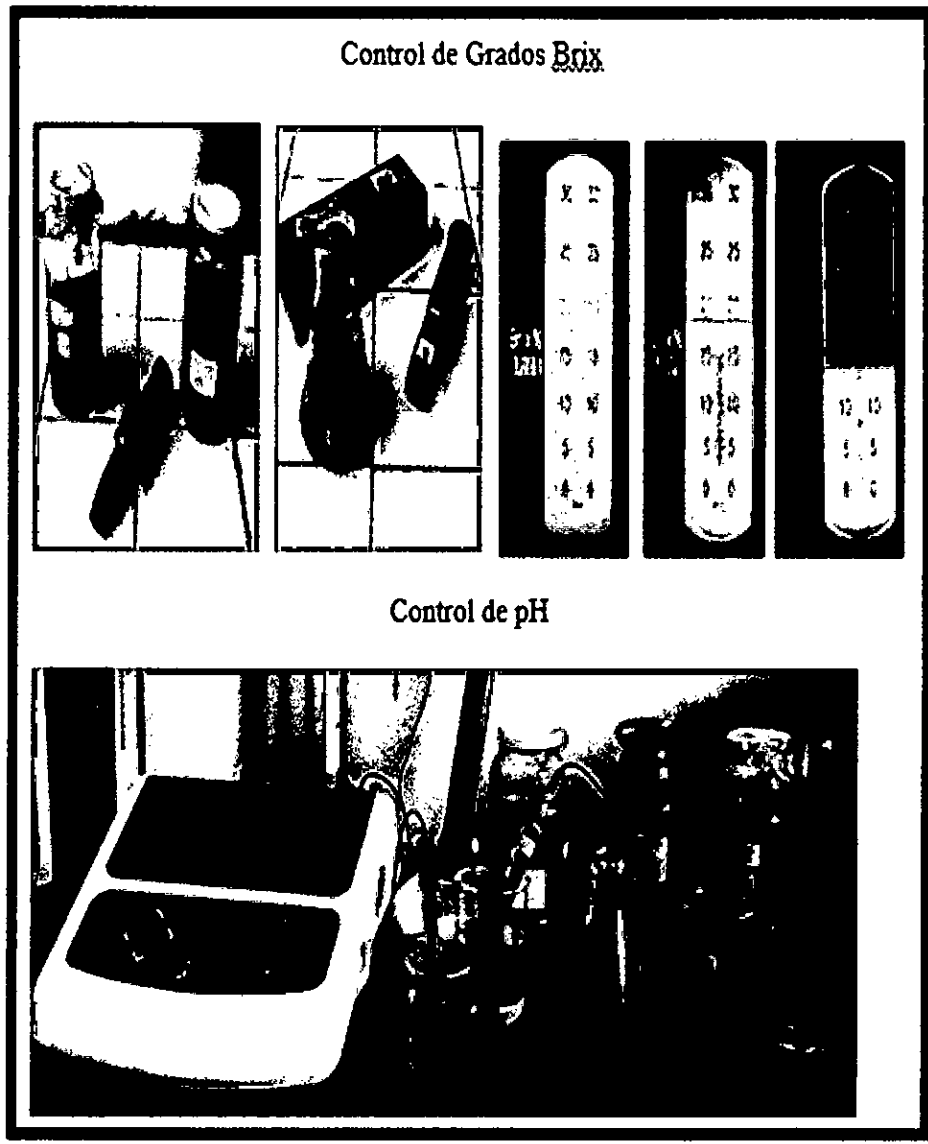
**FIGURA N° 5.7**  
**INCUBACIÓN DE MOSTOS CON CELULASA A 50°C**  
**POR 18, 24 Y 30 HORAS (EN CADA TRATAMIENTO)**



Fuente: Elaboración propia.



**FIGURA N° 5.8**  
**CONTROL DE GRADOS BRUX Y pH DE LOS HIDROLIZADOS ENZIMÁTICOS**



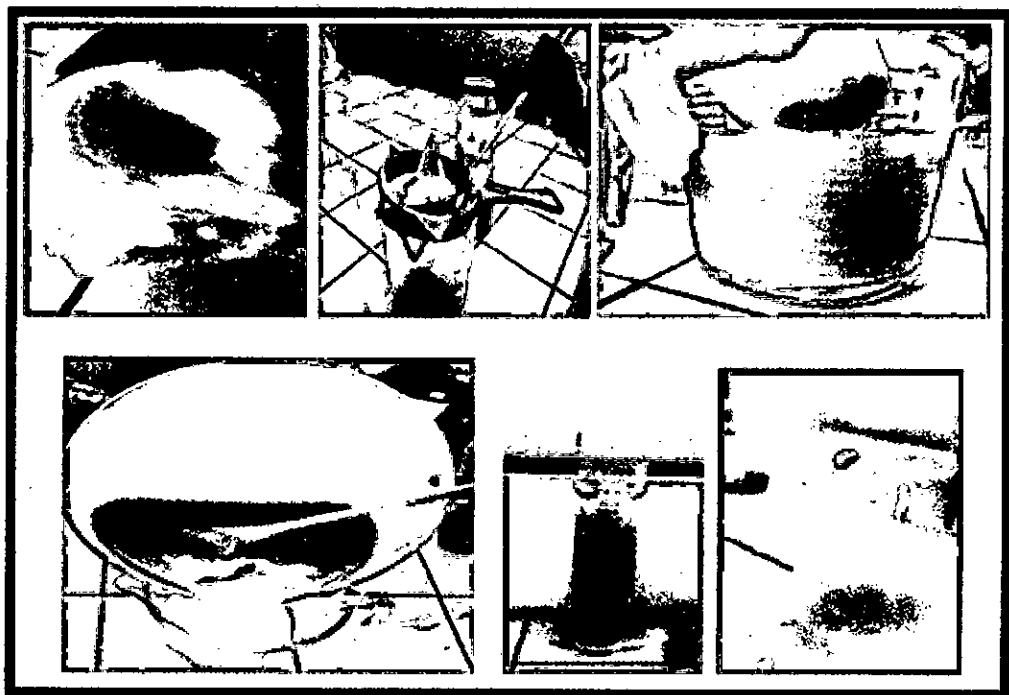
Fuente: Elaboración propia.

**FIGURA N° 5.9**  
**TRATAMIENTO TÉRMICO DE JARABES A 85°C POR 10 MINUTOS**  
**PARA INACTIVAR LA ENZIMA CELULASA**



Fuente: Elaboración propia.

**FIGURA N° 5.10**  
**FILTRACIÓN DE LOS JARABES**



Fuente: Elaboración propia.

**c. Determinación de la calidad del jarabe a partir de las cáscaras de piña (*Ananas comosus*).**

La determinación de la calidad del jarabe a partir de mostos de cáscaras de piña (*Ananas comosus*) variedad Golden hidrolizados anteriormente empleando enzimas Gramocyme Celulasas Se realizó mediante la evaluación del contenido de azúcares reductores, el Equivalente de Dextrosa (DE). También se evaluaron las características físicas del jarabe.

El procedimiento desarrollado en la segunda etapa del estudio fue el siguiente:

- El líquido hidrolizado se traspasó a un vaso de precipitación, separándose 45 ml para la determinación cuantitativa de azúcares reductores (método volumétrico de Eynon-Lane (NTP 203.002-1979, NTP 208.102-2014), utilizando el reactivo de Fehling.
- El reactivo de Fehling está formado por una mezcla de partes iguales de una solución de Sulfato de Cobre Pentahidratado (Fehling A) y otra solución alcalina de Tartrato de sodio y Potasio (Sal de Rochelle, Fehling B).
- En el método de Eynon-Lane se hace reaccionar sulfato cúprico con azúcar reductor en medio alcalino, formándose óxido cuproso, el cual forma un precipitado rojo ladrillo. Este método utiliza azul de metileno como indicador, el cual es decolorado una vez que todo el cobre ha sido reducido, lo que indica el fin de la titulación. (NTP 203.002-1979, NTP 208.102-2014)
- Antes de realizar la determinación cuantitativa de azúcares reductores se tuvo que clarificar las muestras agregando 10 ml de un agente clarificante que fue la Solución saturada de Acetato de Plomo Neutro al 25%, se agitó y posteriormente se añadió 0.5 gr. de Carbonato de sodio anhidro, se volvió a agitar la solución y se filtró y vertió el filtrado en un matraz volumétrico de 100 mL. Luego se debe llevar

a marca de aforo con agua destilada y cargar la bureta con la disolución previamente preparada.

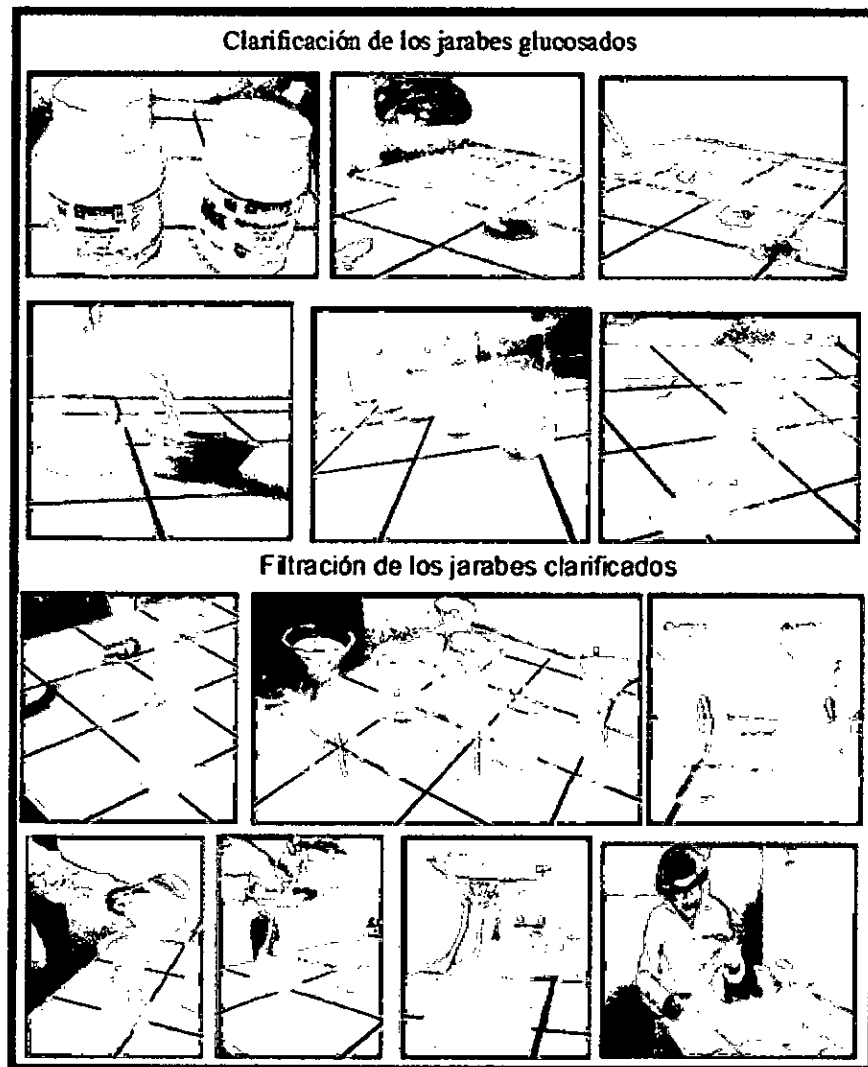
- Los agentes clarificantes son utilizados ya que para casi todos los análisis de azúcares es necesario que las disoluciones de muestras a utilizar se encuentren claras y transparentes. El uso de los diferentes agentes clarificantes varía según las muestras.
- Las fotos experimentales del procedimiento desarrollado para evaluación del contenido de azúcares reductores se muestran en las figuras N° 5.11 y 5.12 de las páginas N° 66 y 67 respectivamente.

Para la determinación de azúcares reductores se procedió de la siguiente manera:

- Se tomó una alícuota de 25 ml de las muestras clarificadas de los jarabes, se colocan en un matraz aforado de 100 ml, aforar con agua, mezclar bien y colocar la solución en una bureta.
- Se colocó en un Erlenmeyer de 250 ml 7.5 ml de solución de Fehling A y 7.5 ml de solución de Fehling B.
- Se calentó a ebullición la solución de Fehling y añadió 4 gotas de solución de azul de metileno al 1%.
- Se diluyó con aproximadamente 30 ml de agua destilada y agregó 5 perlas de vidrio.
- Se llevó a ebullición la solución de Fehling.
- Se tituló con la solución de azúcares solubles obtenida a partir de la muestra clarificada (filtrado) que se encontraba en la bureta.
- También se realizó la prueba cualitativa de azúcares reductores utilizando el reactivo de Benedict que se añadió a las muestras de 5 ml de los jarabes en tubos de ensayo a baño maría por 2 minutos a 80°C (reacción térmica). Esta prueba se basa en la reducción de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  en medio básico débil tornándose naranja si es positivo y verde si es negativa la presencia de azúcares reductores.

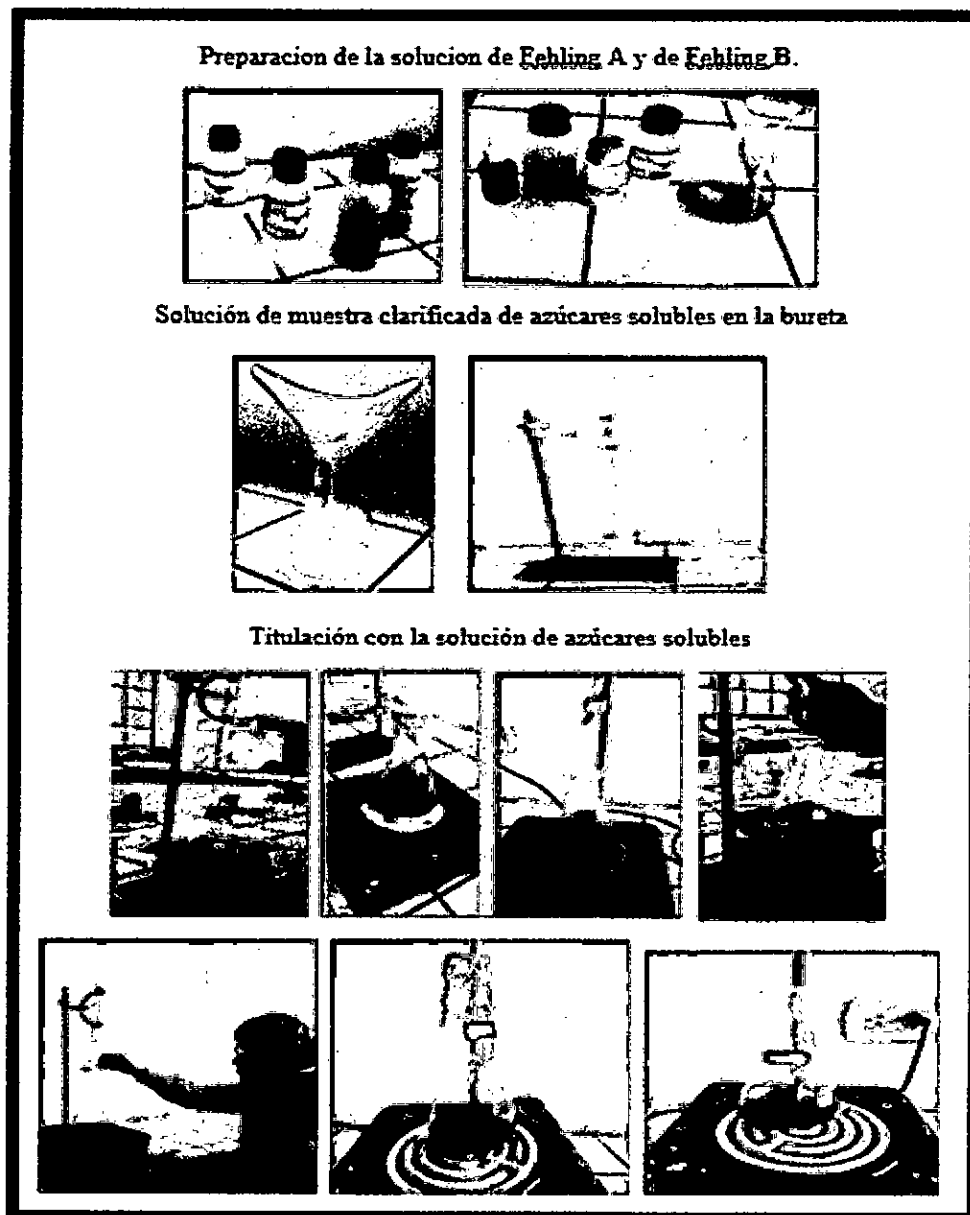
Las fotos experimentales del procedimiento desarrollado para la prueba de Benedict se muestran en el Apéndice en la figura N° 9.6 de las pagina N° 115.

**FIGURA N° 5.11**  
**PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA ANALIZAR**  
**AZÚCARES REDUCTORES (METODO EYNON-LANE)**



Fuente: Elaboración propia.

**FIGURA N° 5.12**  
**PRUEBA CUANTITATIVA DE DETERMINACIÓN DE AZÚCARES**  
**REDUCTORES MÉTODO VOLUMÉTRICO DE EYNON-LANE**



Fuente: Elaboración propia.

- Luego de la determinación cuantitativa de azúcares reductores con el líquido hidrolizado se determinó el valor de Equivalente Dextrosa (ED), que es utilizado como un indicador del grado de hidrólisis de la solución. El ED del almidón es cero y el de la dextrosa es 100 (Quaglia & Gennaro, 2003). Se obtuvo por modificación del procedimiento para Azúcares Reductores según el método Eynon-Lane (NTP 203.002-1979, NTP 208.102-2014).
- Se anotaron los resultados de la prueba de la determinación de la calidad del jarabe empleando mostos hidrolizados de cascaras de piña variedad Golden.

El método consiste en determinar la acidez por medio de una titulación ácido-base con una solución de álcali estandarizado, expresando los resultados de la acidez titulable como el equivalente en masa de ácido cítrico por ser el ácido predominante de la piña.

Para las mediciones de acidez titulable se colocaron 10 ml del alcohol destilado y se le añadieron 2 gotas de fenolftaleína al 1% como indicador.

Posteriormente se tituló con NaOH 0.1N hasta observar el primer tono rosado en el destilado. Se realizó para todos los tratamientos evaluados por triplicado. La acidez fue reportada como porcentaje de ácido cítrico según el método NTP 203.070:1977 (REVISADA EL 2012) y NTP 211.040. 2012.

Para el cálculo de la acidez Titulable se empleó la siguiente ecuación:

$$\% \text{Acido} : \frac{N \times Vb \times \text{Meq. ácido}}{Vm} \times 100$$

N = Normalidad de la base (NaOH) usada para titular

Vb = Volumen de la solución de la base usada para titular (gasto)

Meq = Miliequivalente del ácido

Vm = Volumen de la muestra

El miliequivalente para el ácido cítrico es de 0.064

Las fotos experimentales del procedimiento desarrollado para la determinación de acidez Titulable de los jarabes glucosados de la cáscara de piña (*Ananas comosus*) variedad Golden se muestran en el Apéndice en la Figura N° 9.7 de la página N° 116.



## VI. RESULTADOS

### 6:1. Características de la Cáscara de Piña

Para elaborar jarabes glucosados a partir de cáscara de piña *Ananas comosus* de la variedad Golden se requiere utilizar cáscaras previamente seleccionadas descartando aquellas que presentaban daño causado por insectos, hongos o presencia de enfermedades para obtener mejores resultados en el proceso de hidrólisis enzimática.

En la Tabla N°6.1, se muestran los balances de materia en la obtención de jarabes glucosados de cáscaras de piña de la variedad Golden a partir de 10 kilogramos de cáscaras que se utilizaron en el presente estudio.

**TABLA N° 6.1**  
**BALANCES DE MATERIA EN LA OBTENCIÓN DE JARABES**  
**GLUCOSADOS DE CÁSCARA DE PIÑA.**

<b>Característica evaluada</b> <b>cáscara de Piña.</b>	<b>Valor</b>
Peso de la cáscara (Kg.)	10.00
Humedad (%)	71.84.
Acidez Titulable (%)	1.5
pH	4.7

Fuente: Elaboración propia.

## **6.2: Hidrólisis enzimática de la cáscara de piña**

El proceso de hidrólisis enzimática de la cáscara de piña de la variedad Golden es bastante reproducible, siempre y cuando se mantengan constantes los parámetros de pH y temperatura.

Al añadir la enzima Gramozyme Celulasa al 0.5%, 1.0% y 1.5% luego del pretratamiento mecánico y térmico de la cáscara de piña al 30% p/v, la solución aumento gradualmente el grado Brix, lo que no ocurrió en el control sin celulasa y sin pre-tratamiento que siguió sus características iniciales todo el proceso.

Esto puede deberse a que hubo una fragmentación de la celulosa de la cáscara de piña por hidrolisis enzimática liberando azúcares solubles lo que ocasionó el aumento de los grados Brix.

### **A. Relación entre la Concentración de la enzima Gramozyme Celulasa y el Tiempo de Hidrólisis con los Grados Brix y el porcentaje de Azúcar Reductor**

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%, p/v., 1% p/v. y 1,5% p/v) y los tiempos de incubación (18, 24 y 30 horas) para la obtención de jarabes glucosados.

En la Tabla N°6.2 de la página 72, se muestra la relación entre la concentración de la enzima celulasa y el tiempo de hidrólisis con los Grados Brix y % Azúcares Reductores obtenidos al final del tratamiento en la hidrólisis enzimática de las cáscaras de piña de acuerdo a los tiempos de fermentación.

**TABLA N° 6.2**  
**RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE LA ENZIMA CELULASA Y**  
**EL TIEMPO DE HIDRÓLISIS CON LOS GRADOS BRUX Y PORCENTAJE**  
**DE AZÚCAR REDUCTOR**

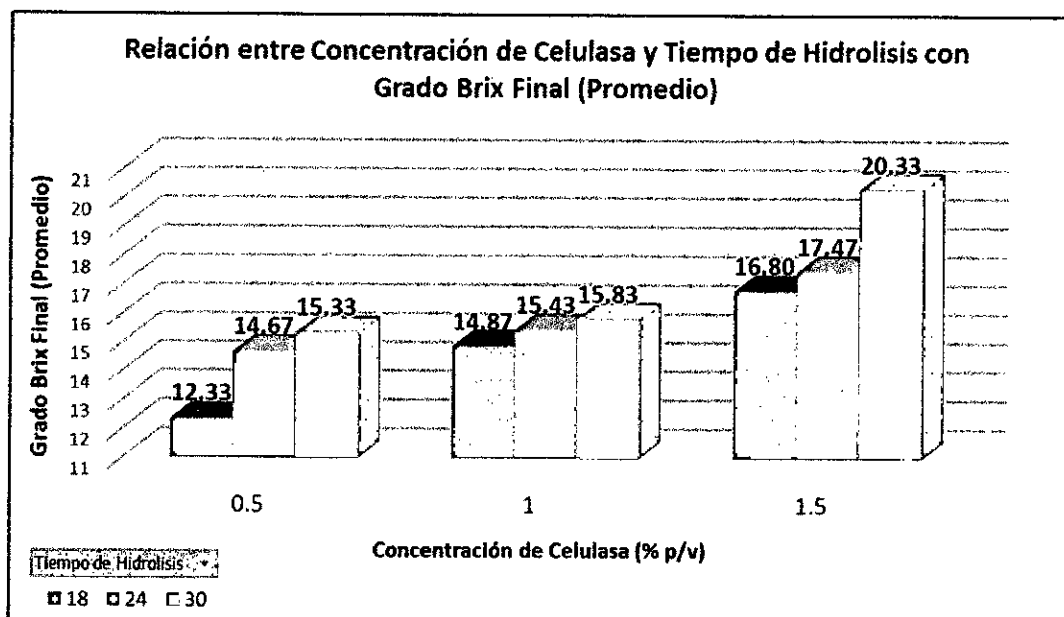
<b>Celulasa % (p/v)</b>	<b>Tiempo Incubación (H)</b>	<b>°Brix Final</b>	<b>°Brix final Prom.</b>	<b>%Azúcar Reductor</b>	<b>% Azúcar Reductor Prom</b>
0.5	18	12.4	12.3	3.0	3.3
0.5	18	12.2		3.5	
0.5	18	12.4		3.8	
0.5	24	14.2	14.7	6.0	6.8
0.5	24	15.0		7.4	
0.5	24	14.8		7.0	
0.5	30	15.0	15.3	8.1	7.8
0.5	30	15.5		7.7	
0.5	30	15.5		7.5	
1	18	14.5	14.9	7.8	8.2
1	18	15.2		8.4	
1	18	14.9		8.5	
1	24	15.2	15.4	11.3	11.2
1	24	15.5		10.6	
1	24	15.6		11.6	
1	30	15.9	15.8	12.2	11.6
1	30	15.9		11.9	
1	30	15.7		10.8	
1.5	18	16.6	16.8	9.5	9.6
1.5	18	17.0		10.0	
1.5	18	16.8		9.3	
1.5	24	17.0	17.5	12.4	13.1
1.5	24	18.2		13.6	
1.5	24	17.2		13.2	
1.5	30	19.5	20.3	13.7	14.5
1.5	30	20.5		14.0	
1.5	30	21.0		15.8	

Fuente: Elaboración propia.

La concentración enzimática de la Gramozyme Celulasa fungal de mayor intensidad 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 mayores porcentajes de azúcares reductores. (Gráfico N° 6.1).

**GRÁFICO N° 6.1**

**RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE LA ENZIMA CELULASA Y EL TIEMPO DE HIDRÓLISIS CON EL GRADO BRUX FINAL PROMEDIO.**



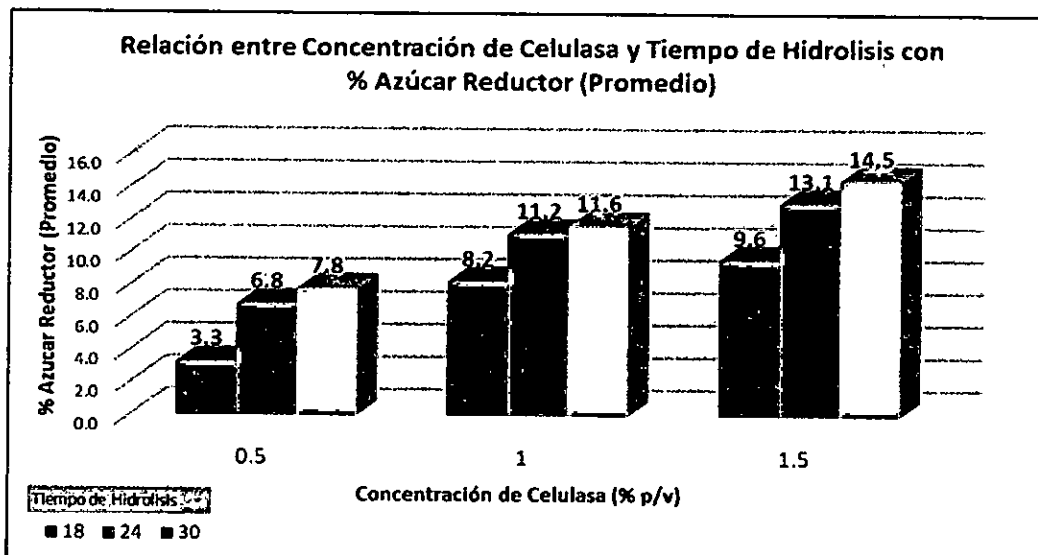
Fuente: Elaboración propia.

Al finalizar los tiempos de hidrólisis enzimática estudiados con la aplicación de Gramozyme Celulasa fungal, el líquido filtrado tenía una tonalidad naranja amarillenta. Los porcentajes de azúcares reductores y porcentajes de equivalente de dextrosa obtenidos al final del tratamiento tuvieron diferentes niveles de acuerdo a la concentración enzimática (0,5%, p/v., 1% p/v. y 1,5% p/v) a la temperatura controlada de 50 °C.

*Handwritten signature*

Los mayores porcentajes de ambos parámetros se presentaron en las concentraciones de Gramozyme Celulasa fungal de 1.5% durante un tiempo de 30 horas con valores promedio de 14.5 % de Azúcar reductor. (Gráfico N°6.2)

**GRÁFICO N°6.2**  
**RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE LA ENZIMA CELULASA Y**  
**EL TIEMPO DE HIDRÓLISIS CON EL PORCENTAJE AZÚCAR**  
**REDUCTOR**



Fuente: Elaboración propia.

**B. Relación entre la Concentración de la enzima Celulasa y el Tiempo de Hidrólisis con el Porcentaje de Azúcar Reductor y el Porcentaje de Equivalente de dextrosa.**

En la Tabla N°6.3 de la página 75, se muestra la relación entre la concentración de la enzima Celulasa y el tiempo de hidrólisis con el porcentaje de Azúcar Reductor y el porcentaje de Equivalente de dextrosa obtenidos al final del tratamiento en la hidrólisis enzimática de las cáscaras de piña de acuerdo a los tiempos de fermentación.

*Handwritten signature*

**TABLA N° 6.3**  
**RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE LA ENZIMA CELULASA Y**  
**EL TIEMPO DE HIDRÓLISIS CON EL PORCENTAJE AZÚCAR**  
**REDUCTOR Y PORCENTAJE EQUIVALENTE DE DEXTROSA**

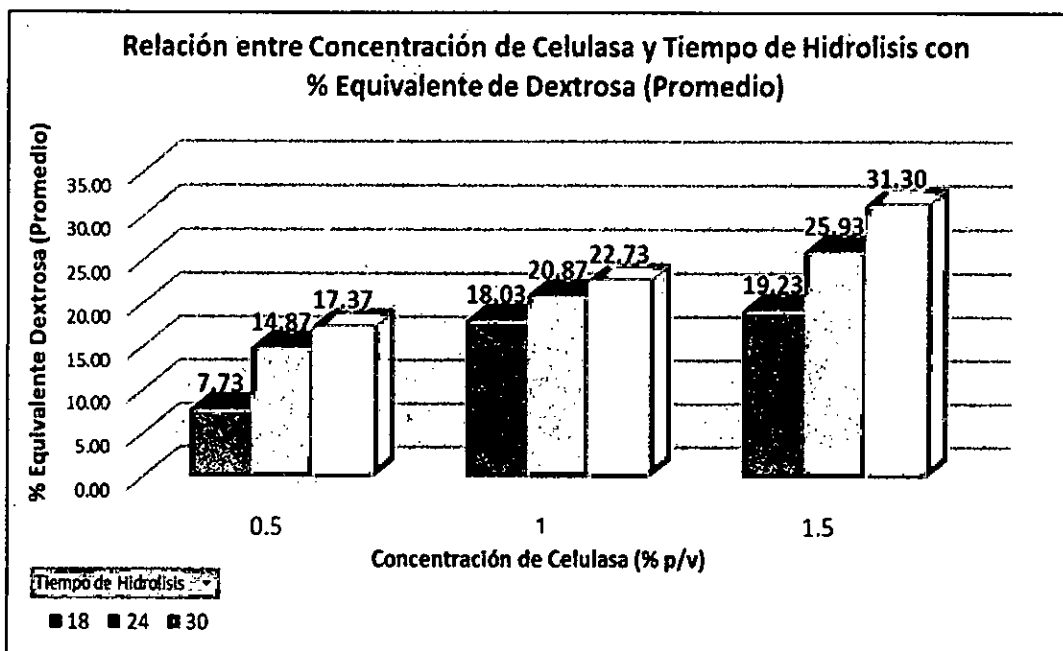
<b>% Amilasa</b>	<b>Tiempo (minutos)</b>	<b>%Azúcar Reductor</b>	<b>% Azúcar Reductor Prom</b>	<b>% Equivalente Dextrosa</b>	<b>% Equivalente Dextrosa Prom.</b>
0.5	18	3.0	3.3	7.2	7.7
0.5	18	3.5		7.7	
0.5	18	3,8		8.3	
0.5	24	6.0	6.8	13.1	14.9
0.5	24	7.4		16.3	
0.5	24	7.0		15.2	
0.5	30	8.1	7.8	18.9	17.4
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	

Fuente: Elaboración propia.

La concentración enzimática de la Gramozyme Celulasa fungal de mayor intensidad de la reacción de hidrólisis fue del 1.5% durante una incubación de 30 Horas ya que se obtuvieron hidrolizados con mayores porcentajes de Azúcares Reductores y mayores porcentajes de Equivalente de Dextrosa mayores (Tabla N° 6.3, página N° 75).

Los mayores porcentajes de ambos parámetros se presentaron en las concentraciones de Gramozyme Celulasa fungal durante un tiempo de 30 horas con valores promedio de 31.3 de % de Equivalente Dextrosa. (Gráfico N°6.3).

**GRÁFICO N°6.3**  
**RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE LA ENZIMA CELULASA Y**  
**EL TIEMPO DE HIDRÓLISIS CON EL PORCENTAJE DE EQUIVALENTE**  
**DE DEXTROSA.**



Fuente: Elaboración propia.

*Handwritten signature*

Por lo tanto, la concentración de la enzima Gramozyme Celulasa fungal para una mayor hidrólisis tiene un óptimo de actividad al 1.5%, ya que al 0.5% o 1%, los °Brix, porcentaje de Azúcar Reductor y el porcentaje de Equivalente de Dextrosa obtenidos al final del tratamiento en la hidrólisis enzimática de las cáscaras de piña de la variedad Golden son bajos. Es importante que se mantenga la agitación constante en el proceso de hidrólisis para mejores resultados.

La variación en el pH no es considerable ya que en todas las pruebas realizadas no varió mucho estando en un rango de pH de 4.5 a 5,5 apropiados para que la enzima Gramozyme Celulasa fungal pudiera hidrolizar la cascara de piña luego del proceso de deslignificación.

Los hidrolizados obtenidos en la hidrólisis enzimática fueron poco viscosos, naranja amarillento y con brillo moderado. Una mayor fluidez se observó en los hidrolizados obtenidos a una concentración de la enzima Gramozyme Celulasa fungal al 1.5% y con un tiempo de incubación de 30 horas.

De acuerdo a la clasificación de BeMiller J. y R. Whistle (2009), las dextrinas y jarabes glucosados obtenidos fueron de tipo I para la hidrólisis enzimática de Gramozyme Celulasa fungal al 1% y al 1.5%.

Las dextrinas y jarabes glucosados obtenidos, se pueden considerar aptos para su consumo adicionándolo en bebidas naturales, energéticas o vitamínicas, de diferente composición, ricos en oligosacáridos de cadenas lineales cortas o maltodextrinas que pueden ser utilizados en la industria por sus propiedades funcionales.



Se recomienda almacenar el producto de 0 a 10°C en envase intacto, en lugar seco y protegido de la luz solar. El producto fue pasteurizado para mantener una estabilidad óptima e inactivar las enzimas.

En la obtención de las dextrinas y jarabes glucosados puede resultar necesario aumentar la concentración enzimática y/o los tiempos de acción o incubación enzimática, si la enzima ha experimentado un almacenamiento prolongado o condiciones adversas, incluyendo temperatura o humedad alta.

Se sugiere realizar la determinación del tiempo de vida útil de las dextrinas y jarabes glucosados a base de cáscara de piña, ya que en el presente proyecto solo se aplicaron como métodos de conservación la pasteurización y refrigeración sin verificar las ventajas y desventajas de los mismos sobre el producto.

La hidrólisis enzimática es importante en la industria alimentaria por los efectos fisicoquímicos u organolépticos que produce, tales como la disminución de la viscosidad, mejora de la filtrabilidad, disminución de la tendencia a la cristalización, clarificación y estabilización de los líquidos con vistas a su conservación, insolubilización de macromoléculas por formación de coágulos, mejora en la fermentabilidad, mejora de la estabilidad bacteriológica, corrección de las deficiencias enzimáticas de origen natural, mejora de la textura y las características organolépticas, aumento del poder edulcorante y otros.

## VII. DISCUSION

### 7.1: Comparación de la concentración de Celulasa y el Tiempo de hidrólisis con respecto al porcentaje de Azúcar Reductor

Esto se comprueba al analizar estadísticamente los efectos de la concentración de la enzima Celulasa fungal sobre la conversión de la lignocelulosa de la cascara de piña con respecto del porcentaje de azúcares reductores mediante el análisis de varianza de la relación entre la concentración de Celulasa (0.5 %, 1% y 1.5% (p/v)) y el tiempo de hidrólisis (18, 24 y 30 horas) con respecto del porcentaje de azúcar reductor producido. (Tabla N°7.1).

TABLA N°7.1.

#### ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE CELULASA Y EL TIEMPO DE HIDRÓLISIS CON EL PORCENTAJE DE AZÚCAR REDUCTOR

<i>RESUMEN</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Celulasa 0.5 % (p/v)	3	18.0	6.0	5.2
Celulasa 1.0 % (p/v)	3	31.0	10.3	3.4
Celulasa 1.5 % (p/v)	3	37.2	12.4	6.3
T. Hidrólisis 18 Horas	3	21.3	7.1	10.5
T. Hidrólisis 24 Horas	3	31.0	10.3	10.3
T. Hidrólisis 30 Horas	3	33.9	11.3	11.4

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
% 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

Fuente: Elaboración propia.

De acuerdo a los análisis realizados se encontró:

- A una significancia de  $0.05 > 0.000$ , podemos concluir que existe diferencias significativas de los porcentajes de Azúcar Reductor encontrados respecto a la Concentración de Celulasa fungal utilizado (0.5 %, 1% y 1.5% (p/v)).
- A una significancia de  $0.05 > 0.000$ , podemos concluir que existe diferencias significativas de los porcentajes de azúcar reductor encontrados respecto al tiempo de hidrolisis estudiado (18, 24 y 30 horas).

Por lo tanto, los análisis estadísticos demostraron que existieron diferencias significativas entre la concentración de celulasa y los tiempos de hidrolisis versus el porcentaje de azúcar reductor ya que el valor de probabilidad es menor a 0.05 (criterio estadístico escogido).

Sin embargo, es necesario llevar a cabo un diseño de optimización para evaluar más rigurosamente cómo se comportan estas interacciones.

#### **a. Contrastación de la Hipótesis Específica 1**

Hipótesis Específica 1: La concentración de celulasas que actúa en el mosto de cáscaras de *Ananas comosus* (Piña) influye en la producción de jarabes glucosados).

De acuerdo a la Correlación de Spearman de las Medidas simétricas Celulasa versus el porcentajes Azúcar reductor (Tabla N° 7.2 y Gráfico N° 7.1 de la página 81), como se puede observar en la tabla la concentración de celulasas y el porcentaje de Azúcar Reductor se relacionan de manera significativa al obtener un valor de correlación Rho de Spearman de 0.833 existiendo una fuerte correlación de las variables, así mismo la relación es significativa puesto que la significancia de  $p = 0,000$  indica que es menor a

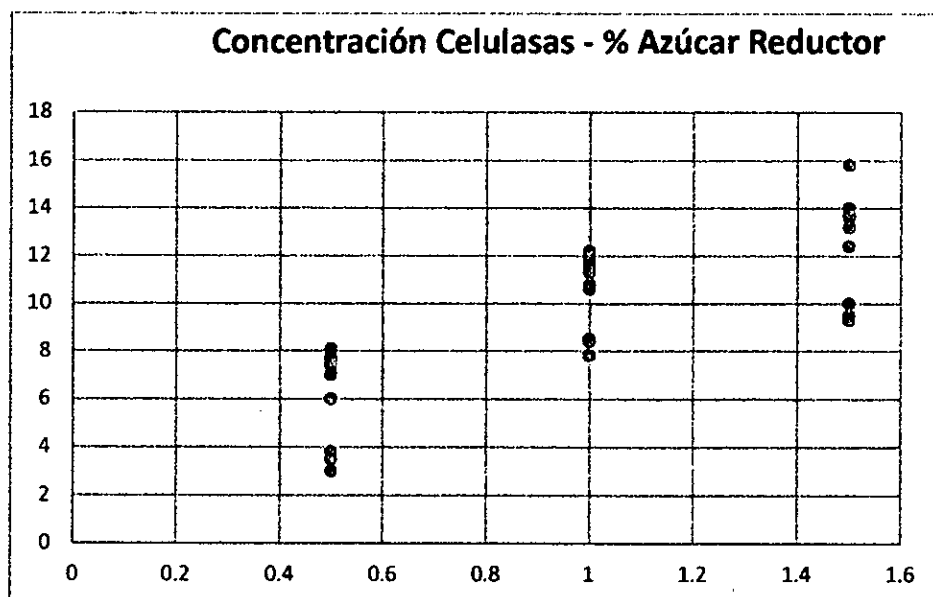
0,05, aceptando la hipótesis específica 1. La concentración de Celulasas influye con un 69.4% sobre el porcentaje de Azúcar Reductor.

**TABLA N° 7.2**  
**CONCENTRACIÓN DE CELULASA VERSUS PORCENTAJE AZÚCAR**  
**REDUCTOR. MEDIDAS SIMÉTRICAS**

	Valor	Sig. aproximada
Correlación de Spearman	.833	.000
N de casos válidos	27	

Fuente: Elaboración propia.

**GRAFICO N° 7.1**  
**CONCENTRACIÓN DE CELULASA VERSUS EL PORCENTAJE**  
**AZÚCAR REDUCTOR**



Fuente: Elaboración propia.

## b. Contratación de la Hipótesis Especifica 2

Hipótesis Especifica 2: El tiempo de hidrólisis enzimática de cáscaras de *Ananas comosus* (Piña) influye en la producción de jarabes glucosados.

De acuerdo a la Correlación de Spearman de las Medidas simétricas del tiempo de hidrólisis (18, 24 y 30 horas) versus el porcentaje de azúcar reductor, como se puede observar en la tabla N° 7.3, el tiempo de hidrólisis y el porcentaje de azúcar reductor se relacionan de manera significativa al obtener un valor de correlación Rho de Spearman de 0.472 existiendo una moderada correlación de las variables, así mismo la relación es significativa puesto que la significancia de  $p = 0,013$  indica que es menor a 0,05, aceptando la hipótesis especifica 2.

El tiempo de hidrólisis influye con un 22.3% sobre el porcentaje de azúcar. (Ver Gráfico N° 7.2 de la página 83).

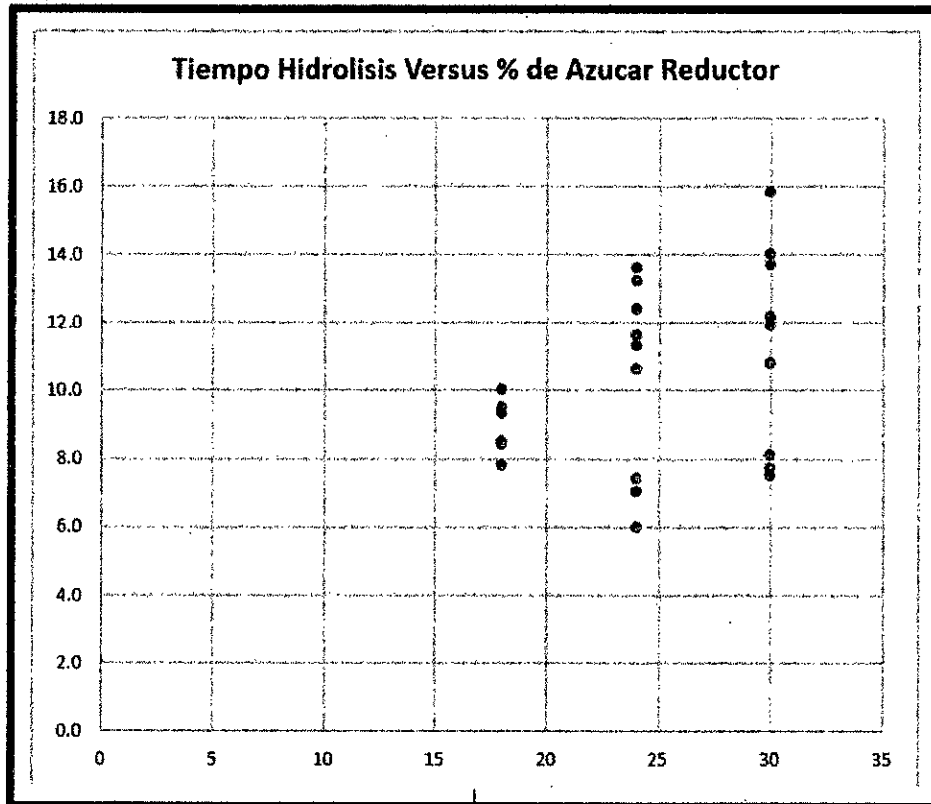
**TABLA N° 7.3**  
**TIEMPO DE HIDROLISIS VERSUS PORCENTAJE AZÚCAR REDUCTOR**  
**MEDIDAS SIMÉTRICAS**

	Valor	Sig. aproximada
Correlación de Spearman	.472	.013
N de casos válidos	27	

Fuente: Elaboración propia.

2024/6

**GRAFICO N° 7.2**  
**TIEMPO DE HIDRÓLISIS VERSUS EL PORCENTAJE AZÚCAR REDUCTOR**



Fuente: Elaboración propia.

**7.2: Comparación de la Concentración de Celulosa y el Tiempo de hidrólisis con respecto al Porcentaje de Equivalente de Dextrosa**

Esto se comprueba al analizar estadísticamente los efectos de la concentración de la Celulasa fungal sobre la conversión de la lignocelulosa de la cáscara de piña sobre el porcentaje de equivalente de dextrosa mediante el análisis de varianza de la relación entre la Concentración de Celulasa y el tiempo de hidrólisis con el porcentaje de Equivalente de Dextrosa. (Tabla N° 7.4 de la página 84).

*Handwritten signature or mark*

**TABLA N° 7.4**  
**ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA RELACIÓN ENTRE LA**  
**CONCENTRACIÓN DE CELULASA Y EL TIEMPO DE HIDRÓLISIS CON**  
**EL PORCENTAJE DE EQUIVALENTE DE DEXTROSA**

<i>RESUMEN</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Celulasa 0.5 % (p/v)	3	40.0	13.3	25.0
Celulasa 1.0 % (p/v)	3	61.6	20.5	5.6
Celulasa 1.5 % (p/v)	3	76.5	25.5	36.5
T. Hidrólisis 18 Horas	3	45.0	15.0	40.0
T. Hidrólisis 24Horas	3	61.7	20.6	30.7
T. Hidrólisis 30 Horas	3	71.4	23.8	49.4

**ANÁLISIS DE  
VARIANZA**

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F<sub>1</sub></i>
% Celulasa (p/v)	224.64	2.00	112.32	<u>29.08</u>	0.00	<u>6.94</u>
Tiempo de Hidrólisis	118.83	2.00	59.42	<u>15.39</u>	0.01	<u>6.94</u>
Error	15.45	4.00	3.86			
Total	358.91	8.00				

Criterio estadístico: 95% de confianza

Fuente: Elaboración propia.

De acuerdo a los análisis realizados se encontró:

- Los análisis estadísticos demostraron que existieron diferencias significativas entre la concentración de Celulasa fúngal utilizada y los tiempos de hidrólisis versus el porcentaje de Equivalente de Dextrosa.
- A una significancia de  $0.05 > 0.000$ , podemos concluir que existe diferencias significativas del porcentaje de Equivalente de Dextrosa encontrados respecto a la concentración de celulasa fúngal utilizado (0.5 %, 1% y 1.5% (p/v)).
- A una significancia de  $0.05 > 0.000$ , podemos concluir que existe diferencias significativas de los porcentajes de Equivalente de Dextrosa encontrados respecto al tiempo de hidrólisis estudiado (18, 24 y 30 horas).

Por lo tanto, los análisis estadísticos demostraron que existieron diferencias significativas entre la concentración de celulasa utilizada y los tiempos de hidrólisis versus el porcentaje de Equivalente de Dextrosa (ED) ya que el valor de probabilidad es menor a 0.05 (criterio estadístico escogido).

Sin embargo, es necesario llevar a cabo un diseño de optimización para evaluar más rigurosamente cómo se comportan estas interacciones.

#### **a. Contrastación de la Hipótesis Específica 1**

Hipótesis Específica 1: La concentración de celulasas que actúa en el mosto de cáscaras de *Ananas comosus* (Piña) influye en la producción de jarabes glucosados.

De acuerdo a la Correlación de Spearman de las Medidas simétricas Celulosa versus el porcentaje de Azúcar Reductor, como se puede observar en la Tabla N° 7.5 de la página 86, la concentración de Celulasa y el porcentaje de Equivalente de Dextrosa se relacionan de manera significativa al obtener un valor de correlación Rho de Spearman



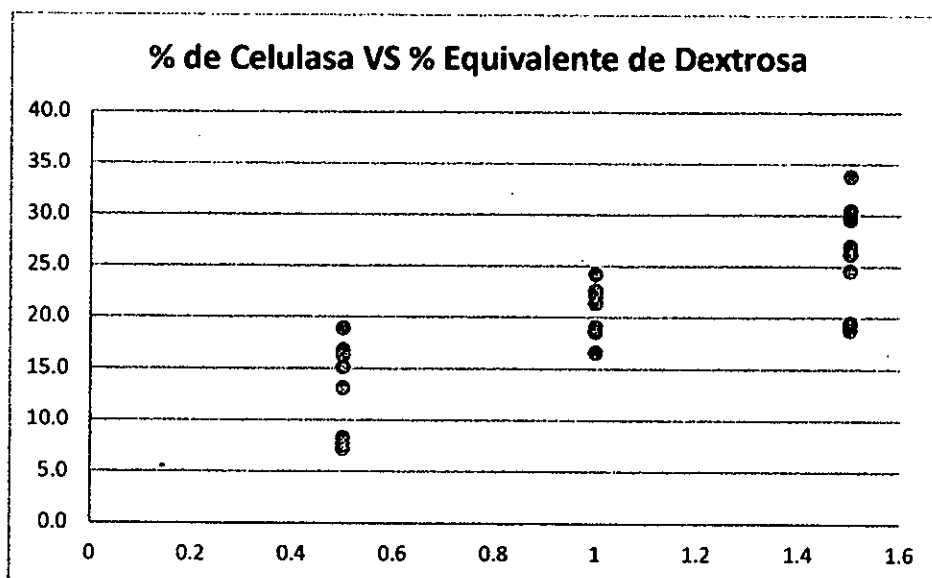
de 0.813 existiendo una fuerte correlación de las variables, así mismo la relación es significativa puesto que la significancia de  $p = 0,000$  indica que es menor a 0,05, rechazando la hipótesis nula, aceptando la alterna. La concentración de Celulasas influye con un 66.1% sobre el porcentaje de Equivalente de Dextrosa. (Gráfico N° 7.3).

**TABLA N° 7.5**  
**CONCENTRACIÓN DE CELULASA VERSUS PORCENTAJE**  
**EQUIVALENTE DE DEXTROSA. MEDIDAS SIMÉTRICAS**

	Valor	Sig. aproximada
Correlación de Spearman	.813	.000
N de casos válidos	27	

Fuente: Elaboración propia.

**GRAFICO N° 7.3**  
**PORCENTAJE DE CELULASA VERSUS EL PORCENTAJE**  
**EQUIVALENTE DE DEXTROSA**



Fuente: Elaboración propia.

*Alfredo*

### a. Contrastación de la Hipótesis Especifica 2

Hipótesis Especifica 2: El tiempo de hidrólisis enzimática de cáscaras de *Ananas comosus* (Piña) influye en la producción de jarabes glucosados.

De acuerdo a la Correlación de Spearman de las Medidas simétricas del tiempo de hidrólisis versus el porcentaje Equivalente de Dextrosa, como se puede observar en la Tabla N° 7.6 el tiempo de hidrolisis y el porcentaje de Equivalente de Dextrosa se relacionan de manera significativa al obtener un valor de correlación Rho de Spearman de 0.504 existiendo una moderada correlación de las variables, así mismo la relación es significativa puesto que la significancia de  $p = 0,007$  indica que es menor a 0,05, aceptando la Hipótesis especifica 1.

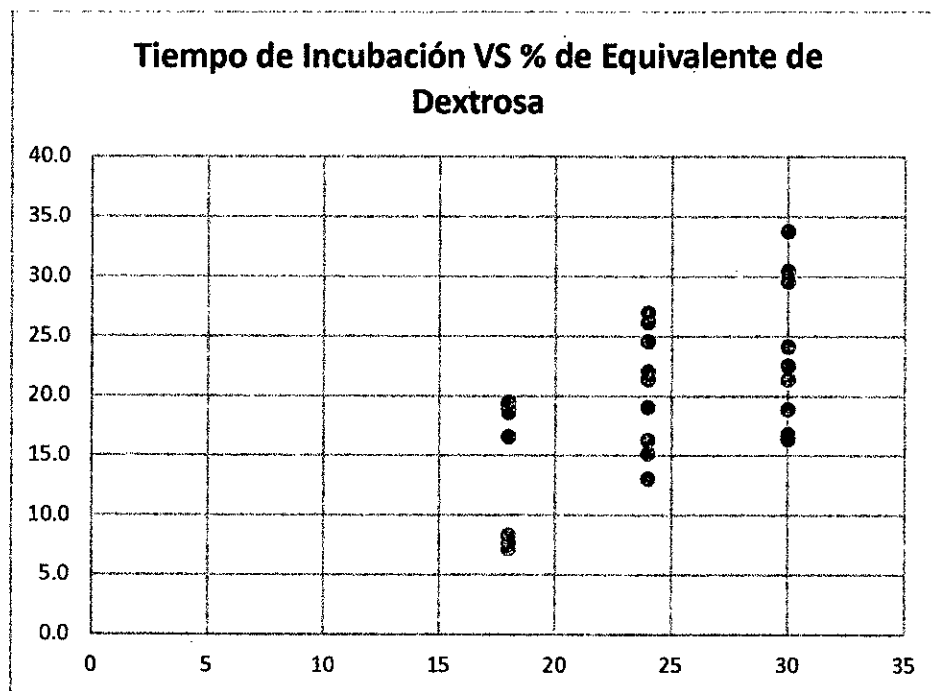
El tiempo de incubación influye con un 25.4% sobre el porcentaje de Equivalente de Dextrosa. (Grafico N° 7.4 de la página 88).

**TABLA N° 7.6**  
**TIEMPO DE HIDRÓLISIS VERSUS PORCENTAJE EQUIVALENTE DE**  
**DEXTROSA. MEDIDAS SIMÉTRICAS**

	Valor	Sig. aproximada
Correlación de Spearman	.504	.007
N de casos válidos	27	

Fuente: Elaboración propia.

**GRAFICO N° 7.4**  
**TIEMPO DE HIDRÓLISIS VERSUS PORCENTAJE EQUIVALENTE DE DEXTROSA**



Fuente: Elaboración propia.

Por lo tanto, se puede concluir:

- Existe diferencia significativa entre el porcentaje de azúcares reductores y porcentaje de Equivalente de Dextrosa (ED) medida para distintas concentraciones de enzima siendo la concentración de mayor actividad para la hidrólisis enzimática la de 1.5% p/v.
- Existe diferencia significativa entre el porcentaje de azúcares reductores y porcentaje de equivalente de dextrosa (ED) medida para los distintos tiempos de hidrólisis enzimática siendo el tiempo de hidrólisis de 30 horas donde se produjo la mayor hidrólisis enzimática.

- Se aceptan la Hipótesis General (la aplicación del proceso de transformación de las cáscaras de *Ananas comosus* (Piña) por hidrólisis enzimática permitirá obtener jarabes glucosados evaluando la concentración de Celulasas y el tiempo de hidrólisis del mosto).
- Se acepta la Hipótesis Específicas 1 (la concentración de Celulasas que actúa en el mosto de cáscaras de *Ananas comosus* (Piña) influye en la producción de jarabes glucosados).
- Se acepta la Hipótesis Específicas 2 (el tiempo de hidrólisis enzimática de cáscaras de *Ananas comosus* (Piña) influye en la producción de jarabes glucosados).

Se pudo aprovechar un recurso nacional que ha sido subutilizado como la cáscara de piña (*Ananas comosus*). Se obtuvieron dextrinas y jarabes glucosados a partir de cáscara de piña (*Ananas comosus*) por la hidrólisis enzimática por la celulasa fúngal, al respecto, Swaroopa R. & Krishna N., (2004), informan que 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.

Para el presente estudio se utilizó la enzima Gramozyme Celulasa fúngal que provocó la hidrólisis del polisacarido 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.

Para elaborar jarabe de glucosa a partir de cáscara de piña (*Ananas comosus*), se requiere seleccionar previamente las cáscaras descartando aquellas que presentaban daño causado por insectos o pudrición para obtener resultados confiables al realizar las pruebas de hidrólisis enzimática de los componentes lignocelulosicos de las cáscaras.

Para la obtención de jarabes glucosados a partir de cascara de piña es muy importante un tratamiento previo de las cáscaras lo que concuerda con diferentes investigadores que manifiestan que para poder procesar adecuadamente los materiales lignocelulósicos es necesario someterlos a pretratamientos para poder favorecer la hidrólisis de la celulosa para generar azúcares fermentables mediante el uso de celulasas (Medina M., 2011). La lignocelulosa es altamente resistente a su hidrólisis, ya que el conjunto de celulosa, hemicelulosa y lignina, están unidos entre sí por enlaces covalentes, diversos puentes intermoleculares y fuerzas de van der Waals (Kumar S. *et al.*, 2010). El fin de someter a pretratamientos al material vegetal es facilitar la hidrólisis principalmente de la celulosa ya que la conformación natural, llamada cristalina, es muy resistente a su hidrólisis. Los pretratamientos promueven la generación de regiones amorfas en la celulosa las cuales son más susceptibles a hidrólisis (Hu Z. y Wen Z., 2008). Durante el pretratamiento el sustrato lignocelulósico aumenta la digestibilidad con el incremento de la porosidad permitiendo la accesibilidad de las celulasas a la celulosa. (Bohorquéz C. y Herrera S., 2005).

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 celulosa puestos que no fueron suficientes los tratamientos mecánicos y térmicos aplicados en este estudio. Esto

concuerta 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; dos terceras partes de la celulosa están en forma cristalina y la mayoría de la celulosa se encuentra en la capa S2 de la pared celular que no está expuesta a los agentes externos. Esto supone la existencia de sucesivas barreras protectoras que dificultan el acceso de agentes químicos y enzimas a las cadenas de celulosa.

Por su parte Arellano C. (2015) encontró que el pretratamiento alcalino de *Pennisetum sp* y de la cascara de *Jatropha curcas* permite solubilizar esencialmente lignina, permitiendo así una mejor disponibilidad de las fracciones celulósicas para la acción enzimática, en comparación de las condiciones empleadas durante el pretratamiento ácido.

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.

Por otro lado, Palmowski L. y Mueller J., (1999), informan que existen diversos procesos para llegar al mismo fin, donde el proceso va desde un tratamiento mecánico, como la reducción de tamaño de partícula para aumentar el área de superficie de hidrólisis y disminuir el grado de polimerización de los compuestos.

A su vez, Hendriks A. y Zeeman G., (2009) informan que también se usan tratamientos térmicos donde el efecto es que a altas temperaturas (150 – 180 °C) la hemicelulosa y lignina comienzan a solubilizarse dejando a la celulosa más expuesta para ser hidrolizada. Se han usado tratamientos ácidos y alcalinos, los cuales promueven de igual manera la solubilización de la lignina y principalmente la hemicelulosa teniendo el mismo propósito que el tratamiento térmico. También se puede optar por tratamientos oxidativos, donde se agregan agentes oxidantes como ácido peracético, peróxido de hidrógeno u ozono, donde el objetivo es afectar la lignina y hemicelulosa y promover la accesibilidad a la celulosa para su hidrólisis. A excepción de los tratamientos mecánicos, los tratamientos químicos (ácidos, álcalis u oxidación) se pueden combinar con los térmicos para poder aumentar la susceptibilidad de la celulosa al hidrólisis.

Los jarabes glucosados obtenidos, se pueden considerar aptos para su consumo adicionándolo en bebidas naturales, energéticas o vitamínicas, de diferente composición, ricos en oligosacáridos de cadenas lineales cortas o maltodextrinas que pueden ser utilizados en la industria por sus propiedades funcionales.

Se recomienda almacenar el producto de 0 a 10°C en envase intacto, en lugar seco y protegido de la luz solar. El producto fue pasteurizado para mantener una estabilidad óptima e inactivar las enzimas.

## CONCLUSIONES

- Se pudo aprovechar un recurso nacional que ha sido subutilizado como la cáscara de piña (*Ananas comosus*).
- El proceso de hidrólisis enzimática de la cáscara de piña es bastante reproducible, siempre y cuando se mantengan constantes los parámetros de tiempo y temperatura.
- Se obtuvieron jarabes glucosados a partir de cáscara de piña (*Ananas comosus*) por la hidrólisis enzimática de la enzima Celulasa fúngal.
- Existe diferencia significativa entre el porcentaje de Azúcares Reductores y porcentaje de Equivalente de Dextrosa (ED) medida para distintas concentraciones de enzima siendo la concentración de mayor actividad para la hidrólisis enzimática la de 1.5% (p/v).
- Existieron diferencias significativas entre los porcentajes de Celulasa fúngal utilizados y los tiempos de hidrolisis versus el porcentaje de Azúcar Reductor.
- Los análisis estadísticos demostraron que existieron diferencias significativas entre los porcentajes de la enzima Celulasa fúngal utilizados y los tiempos de hidrolisis versus el porcentaje de Equivalente de Dextrosa.
- La variación en el pH no es considerable ya que en todas las pruebas realizadas no varió mucho estando en un rango de pH de 4.5 a 5,5 apropiados para que la enzima Celulasa fúngal pudiera hidrolizar la cáscara de piña luego del proceso de deslignificación.
- Los mayores porcentajes de Azúcar Reductor y de Equivalente de Dextrosa se presentaron en las concentraciones de Celulasa fúngal de 1.5% (p/v). durante un tiempo de 30 horas a 50°C con valores promedio de 14.3% de porcentaje Azúcar Reductor y de 31.3% de porcentaje de Equivalente Dextrosa.



- Los resultados obtenidos en la hidrólisis enzimática correspondieron con un aumento de dicha hidrólisis a lo largo del tiempo. Este aumento fue proporcional.
- Una mayor fluidez se observó en los hidrolizados obtenidos a una concentración de la enzima celulasa fúngal al 1.5% p/v. y con un tiempo de hidrolisis de 30 horas a 50°C.
- Los hidrolizados obtenidos en la hidrólisis enzimática fueron poco viscosos, naranja amarillento y con brillo moderado.

## RECOMENDACIONES

- Es muy importante que todas las fases del proceso puedan ser controladas, para que los resultados sean más eficientes en cuanto a la hidrólisis enzimática por Celulasas.
- Es necesaria más investigación sobre la determinación de la mejor relación enzima-sustrato determinada en la hidrólisis enzimática de las cáscaras de piña.
- Es importante continuar con estudios de evaluación de hidrolisis enzimática de la celulosa tomando en consideración diferentes factores que puedan regularla.
- Se debe estudiar más sobre los tiempos de hidrólisis más convenientes para la hidrólisis enzimática de los componentes lignocelulosicos de la cáscara de piña.
- Realizar un estudio con una mayor concentración de enzima Celulasa comercial para comprobar si es posible efectuar una disminución de tiempos de acción de la misma, de este modo el proceso productivo para la elaboración de jarabe se llevará a cabo en un menor tiempo y por lo tanto disminuirán los costos de producción.
- Realizar un estudio que combine el proceso de hidrolisis química previa al tratamiento de hidrólisis enzimática de la celulasa fungal.
- Hacer un análisis de los costos de producción de jarabe de glucosa para definir la viabilidad o no del uso de enzimas celulasas.
- Realizar pruebas de aceptación y funcionalidad del producto.
- Verificar la calidad microbiológica del producto final.
- Efectuar un refinamiento posterior, en el producto final con el objetivo de clarificar y mejorar las características del jarabe de glucosa.
- Se deben estudiar más las características de los subproductos del procesamiento de cáscara de piña y determinar si se puede dar algún uso a los mismos.

## VIII. REFERENCIALES

ADEGBITE O., O. ONI, y I. ADEOYE. **Competitiveness of pineapple production in Osun State, Nigeria.** *Journal of Economics and Sustainable Development*. Vol. 5(2): 205-214. 2014.

ALBERNAS-CARVAJAL Yaillet, Gabriela CORSANO, Layanis MESA GARRIGA, Ronaldo SANTOS HERRERO y Erenio GONZÁLEZ SUÁREZ. **Estudio de la cinética de la hidrólisis enzimática del bagazo pretratado.** *AFINIDAD LXXII*, 570, Abril – Junio: 127-132. 2015

AMERINE M.A. & OUGH C.S. **Análisis de vinos y mostos.** Zaragoza, España. Editorial Acribia. 2001.

ANTONIO CRUZ Rocío, Ana M. MENDOZA MARTÍNEZ, M. Yolanda CHÁVEZ CINCO, J. Luis RIVERA ARMENTA, M. Javier CRUZ GÓMEZ. **Aprovechamiento del bagazo de piña para obtener celulosa y etanol.** *Afinidad LXVLLL*, 551. México, D.F. Enero – Febrero: 38-43. 2011.

ARAYA SÁNCHEZ, R., (1998). **Utilización del rastrojo de piña (*Ananas comusus*) para la obtención de pulpa para la producción de papel.** Tesis de Licenciatura en Ingeniería Química. Costa Rica. Universidad de Costa Rica. 1998.

ARELLANO PERALES Carla. **Obtención de bioetanol a partir de materiales lignocelulosicos sometidos a hidrólisis enzimática.** Tesis de Maestría en Ciencias en procesos biológicos. Veracruz. Universidad Veracruzana. 2015.

ARIAS VELÁZQUEZ, C. J. y TOLEDO HEVIA, J. (2000). **Manual de manejo poscosecha de frutas tropicales (Papaya, piña, plátano, cítricos). Proyecto FAO.** Disponible en:

[http://www.fao.org/inpho\\_archive/content/documents/vlibrary/ac304s/ac304s00.htm#toc](http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/ac304s/ac304s00.htm#toc). Consultada el 18 de junio de 2017).

BADUI DERGAL Salvador. **Química de los Alimentos.** México. Editorial Pearson, 2006.

BALDRIAN, P. & VALASKOVA, V. **Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi.** *FEMS Microbiol Rev.* Epub ahead of print, doi:10.1111/j.1574-6976.00106. x. 2008.

BEMILLER JAMES AND ROY WHISTLER. **Starch Chemistry and Technology.** Food Science and Technology, International Series. USA. Third Edition. 2009.

BOHÓRQUEZ, C & HERRERA, S. **Determinación de las mejores condiciones de hidrólisis del banano verde de rechazo.** Trabajo de grado (Ingenieros químicos). Medellín. Universidad Nacional de Colombia. 2005.

CÁCERES PALOMINO E. **Manual Técnico para el Cultivo de la Piña.** Proyecto: “Mejoramiento de la Producción del Cultivo de la Piña Mediante Sistemas Agroforestales en el Distrito de Perené – Chanchamayo”. Proyecto Especial Pichis Palcazú. Perú. 2008.

CARA, C., RUIZ, E., BALLESTEROS, M., MANZANARES, P., NEGRO, M. & CASTRO, E. **Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning.** *Fuel* Vol. 87: 692–700. 2008.

CARHUANCHO, P. Mejoramiento de la Producción del Cultivo de Piña, mediante Sistemas Agroforestales en el Distrito de Perené - Chanchamayo. Junín, Perú. 2011.

CARRILLO, F., LIS, M., COLOM, X., VALLDEPERAS, M. & VALLDEPERAS, J. **Effect of alkali pretreatment on cellulase hydrolysis of wheat Straw: Kinetic study.** *Proc Biochem.* Vol. 40. 3360 – 3364. 2005.

CASTRO C., M. VALVERDE, O. PAREDES. **Biocombustibles: biomasa lignocelulósica y procesos de producción.** CONCYTEG, Año 4, Núm. 54, 1246-1269. 2004.

COMITÉ NACIONAL SISTEMA-PRODUCTO PIÑA (CNSPP). Plan Rector Nacional. Veracruz. México. 2009.

COMISIÓN VERACRUZANA DE COMERCIALIZACIÓN AGROPECUARIA (COVECA). *Monografía de la Piña.* Veracruz. México. 2010.

CONESA Claudia, Lucía SEGUÍ y Pedro FITO. **Sacarificación de residuos industriales de piña con mezclas de enzimas comerciales.** Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo. Universitat Politècnica de Valencia. (España). 2010.

DUFF, S. J. y MURRAY, W. D. **Bioconversion of forest products industry waste cellulosic to fuel ethanol: a review.** *Bioresour. Technol.* Vol. 55: 1-33. 1996.

ESTERBAUER, H.; STEINER, W.; LABUDOVA, I.; HERMANN, A. Y HAYN, M. **Production of Trichoderma cellulase in laboratory and pilot scale.** *Bioresour Technol*, 36:51-65. 1991.



FENNEMA O. R. **Química de los Alimentos**. Zaragoza. España. Editorial Acribia. Segunda Edición. 2000.

GARCÍA-ROSALES, G., LONGORIA-GÁNDARA, L. C., MARTÍNEZ-GALLEGO, S. Y GONZÁLEZ-JUÁREZ, J. **Synthesis and Characterization of Carbon Conditioned with Iron Nanoparticles Using Pineapple-Peel**. *Scientific Research, Advances in Nanoparticles*. Vol. 2: 384-390. 2013.

GIL-HORÁN R. H., R. M. DOMÍNGUEZ-ESPINOSA, J. D. PACHO-CARRILLO. **Bioproducción de ácido láctico a partir de residuos de cáscara de naranja: Procesos de separación y purificación**. *Tecnol. Ciencia Ed. (IMIQ)*. Vol. 23(2): 79-90. 2008.

GRANOTEC. **Certificado de análisis. Gramozyme Celulasa. Peru**. 2018.

GRANOTEC. **Ficha Técnica enzima Gramozyme Celulasa**. 2018.

HAN, M., KIM, Y., KIM, YOUNGRAN, CHUNG, B. & CHOI, G. **Bioethanol production from optimized pretreatment of cassava stem**. *Korean J. Chem. Eng., January*, Vol. 28, No.1: 119-125. 2011.

HERNÁNDEZ DUARTE Sandra Yesenia y Carlos Ernesto MARTÍNEZ TORRES. **Obtención de etanol por vía fermentativa a partir de cáscaras de *Ananas comosus* (piña) evaluando dos de sus principales variables (pH y grados Brix) usando como microorganismo productor *Saccharomyces cerevisiae***. Tesis de Licenciatura. El Salvador. Universidad de El Salvador. 2012.

HERNÁNDEZ NERIA G., A. SANTAMARÍA ORTEGA, M. A. RUBIO TOLEDO. **Aprovechamiento concientizado de los residuos como materia**

**prima para el diseño de nuevos productos.** *Revista Iberoamericana de Ciencias.* Vol. 2(5): 71-81. 2015.

HENDRIKS, A. T. W. M., ZEEMAN, G. **Pretreatments to enhance digestibility of lignocellulosic biomass.** *Bioresource technology.* 100: 10-18. 2009.

HENRISSAT, B. & ROMEU, A. **Families, superfamilies and subfamilies of glycosyl hydrolases.** *Biochem J.* 311 (Pt 1), 350-1. 1995.

HIMMEL, M. E., DING, S. Y., JOHNSON, D. K., ADNEY, W. S., NIMLOS, M. R., BRADY, J. W. & FOUST, T. D. **Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production.** *Science.* Vol. 315: 804-7. 2007.

HU, Z., WEN, Z. **Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment.** *Biochemical Engineering Journal.* 38: 369 – 378. 2008.

INDECOPI, NTP 203.070. 1977. (Revisada el 2012). **Productos elaborados a partir de frutas y otros vegetales. Determinación de Acidez.** 1977.

INDECOPI. NTP 203.OO2-1979. **Determinación del contenido de Azúcares reductores.** Método de Eynon-Lane. 1979.

INDECOPI. NTP 209.264. 2001. **Determinación de Humedad.** Método gravimétrico. 1ª Edición. 2001.

INDECOPI, NTP 211.040. 2012. **Bebidas alcohólicas. Método de ensayo. Determinación de Acidez.** 2012.

INDECOPI. NTP 208.102:2014 CONFITERÍA. **Determinación de Azúcares reductores y sacarosa. 1ª Edición. 2014**

JAELANI, A. **Sirup Kulit Nanas Yang Bervitamin dan Ekonomis. Surabaya: Balai Diklat Keagamaan. 2013**

JARAMILLO HENAO G. y L.M. ZAPATA MÁRQUEZ. **Aprovechamiento de los residuos sólidos orgánicos en Colombia.** Monografía de Especialistas en Gestión Ambiental. Colombia: Universidad de Antioquia. 2008.

JIMÉNEZ BUSTAMANTE, José Miguel. **Aprovechamiento de residuos celulósicos de piña para la producción de carbón activado.** Tesis. Veracruz México. Universidad Veracruzana. 2014.

JURI AWAD, Sebastián Andrés. **Sacarificación y fermentación simultánea para la producción de bioetanol de segunda generación, mediante pretratamientos alternativos: líquidos iónicos reciclados y hongos de pudrición blanca.** Tesis. título de Ingeniero Civil en Biotecnología. Chile. Universidad de Chile. 2011.

KROGH, K.B.; MØRKEBERG, A.; JØRGENSEN, H.; FRISVAD, J.C.; OLSSON, L. **Screening genus *Penicillium* for producers of cellulolytic and xylanolytic enzymes.** *Appl Biochem Biotechnol.* Vol. 114: 389-401. 2004.

KUMAR, S., GUPTA., Lee, y. Y., GUPTA, R. B. **Cellulose pretreatment in subcritical water: Effect of temperature on molecular structure and enzymatic reactivity.** *Bioresource technology.* 101: 1337 – 1347. 2010.





LAUREANO-PEREZ, L.; TEYMOURI, F.; ALIZADEH, H.; DALE, B.E. **Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass.** *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1081–1099. 2005.

LLENQUE - DÍAZ Luis A.; Miguel MUÑOZ RÍOS; Eddy ESPEJO VARGAS; Andy MORENO RUIZ. **Producción de celulasas por *Aspergillus niger* a partir de bagazo de caña de azúcar en biorreactor aireado.** *Ciencia y Tecnología*, Año 11, N° 4: 39-49. 2015

LIAO, W., LIU, Y., LIU, C., WEN, Z. & CHEN, S. **Acid hydrolysis of fibers from dairy manure.** *Bioresour. Technol.* Vol. 97. 1687 – 1695. 2006.

LISCANO MARTÍNEZ Yamil. **Producción de bioetanol a partir de tallos de yuca.** Tesis para optar al título de Magister en Ciencias – Biotecnología. Medellín. Universidad Nacional de Colombia. 2014.

LYND, L. R., WEIMER, P. J., VAN ZYL, W. H. & PRETORIUS, I. S. **Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology.** *Microbiol Mol Biol Rev.* Vol. 66: 506-577. 2002.

MADRID A, Y CENZANO J. **Nuevo Manual de Industrias Alimentarias.** España. Editorial Mundi-Prensa Libros. S.A, 2001.

MARTÍN Carmen y Paloma MANZANARES. 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.

MARTÍNEZ T. J. **Ecología de las levaduras, selección y adaptaciones vínicas.** Tesis Doctoral. Tarragona. España. Universitat Rovira I Virgili Departament de Bioquímica I Biotecnología. Facultat D'Enologia. 2002.

MARTÍNEZ-ANAYA, CLAUDIA, EDGAR BALCÁZAR-LÓPEZ, EDGAR DANTÁN-GONZÁLEZ, JORGE L. FOLCH-MALLOL. **Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética.** *Rev Latinoam Microbiol.* Vol. 50 (3-4): 119-131. 2008.

MATHEWS, C.K., K.E. VAN HOLDE y K.G. AHERN. **Bioquímica.** España. Editorial Pearson. Tercera Edición. 2004.

MCKEE, TRUDY & JAMES MCKEE. **Las bases moleculares de la vida.** En *BIOQUÍMICA.* Zaragoza, España. Editorial Mc Graw Hill. Quinta Edición. 2014.

MEDINA-MORALES Miguel A., Lorena LARA-FERNÁNDEZ, Cristóbal N. AGUILAR, Heliodoro DE LA GARZA-TOLEDO. **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.

MERINO Sandra T. y Joel CHERRY. **Progress and Challenges in Enzyme Development for Biomass Utilization.** *Adv Biochem Engin/Biotechnol* 108: 95–120. June 2007.

MOSIER, N., WYMAN, C.E., DALE, B.D., ELANDER, R.T., LEE, Y.Y., HOLTZAPPLE, M., LADISCH, C.M. **Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass.** *Bioresour. Technol.* 96: 673–686. 2005.

MONTILLA, M., & ÁLVAREZ, C. **Producción de alcohol Etilico a partir de cáscara de piña (*Ananás sativus*).** *ALIMENTICA*, Vol. 6:22-25. 2007.

MONSALVE G., J., MEDINA DE PÉREZ, V., & RUIZ COLORADO, A. **Producción de etanol a partir de la cáscara de banano y almidón de yuca.** *Dyna*, Año 73, Nro. 150: 21-27. Medellín, Noviembre de 2006. ISSN 0012-7353. 2006.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI), 2017). Classification: taxonomy. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=4615&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>. Consultada el 19 de marzo de 2018.

MORALES, Madelaide., María Soledad HERNÁNDEZ., Marco CABEZAS., Jaime BARRERA y Orlando MARTÍNEZ. **Caracterización de la maduración del fruto de pina nativa (*Ananas comosus* L. Merrill) CV. India.** En: *Agronomía colombiana*. Vol. 18, No. 1-2, p. 63-69. 2001.

OVANDO CHACÓN S.L. & WALISZEWSKI K.N. **Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos.** *Universidad y Ciencia*, 21: 111-120. 2005.

OLIVARES PÉREZ, R. J. **Influencia de diferentes dosis de productos inductores de la floración (carburo de calcio y Ethrell), en dos variedades de piña (*Ananas comosus* (L) Merril) sobre la calidad poscosecha.** Tesis profesional. Nicaragua.: Universidad Nacional Agraria. 2003.

PALMOWSKI, L., MULLER, J. **Influence of the size reduction of organic waste on their anaerobic digestion. II International symposium on anaerobic digestion of solid waste.** Barcelona, 15 – 17 June, pp. 137 – 144. 1999.

PAREDES MEDINA D., M. ÁLVAREZ NÚÑEZ, M. SILVA ORDOÑES. **Obtención de Enzimas Celulasas por Fermentación Sólida de Hongos para ser Utilizadas en el Proceso de Obtención de Bioalcohol de Residuos del Cultivo de Banano.** *Revista Tecnológica ESPOL – RTE*, Vol. 23, N. 1, 81-88, (Diciembre, 2010).

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.

PULS, J., SCHRÖDER, N., STEIN, A., JANZON, R. & SAAKE, B. **Xylans from Oat Spelts and Birch Kraft Pulp.** *Macromol Symp.* Vol. 232: 85-92. 2005.

QUAGLIA, G.B. & L. GENNARO. **Enzymes. Uses in Food Processing.** En: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition.* Macrae, R., R.K.Robinson, & M.J. Sadler (Eds.). 2125-2139. Academic Press, London. 2003.

QUESADA-SOLÍS, K., ALVARADO-AGUILAR, P., SILBAJA-BALLESTERO, R. y VEGA-BAUDRIT, J. **Utilización de las fibras del rastrojo de piña (*Ananas comusus*, variedad champaka) como material de refuerzo en resinas de poliéster.** *Revista Iberoamericana de Polímeros.* Vol. 6(2): 12-17. 2005.

QUITIGUIÑA, Carla, & SANTA CRUZ, Stalin. **Obtención de jarabe de glucosa a partir de la hidrólisis enzimática de almidón de banano, *Musa Cavendish*.** *Revista Boliviana de Química*. Vol. 29(1): 55-62. 2012.

RAMULU, P. & UDAYASEKHARA Rao, P.. **Total, insoluble and soluble dietary fiber contents of Indian fruits.** *Journal of Foods composition and Analysis* 16(6): 677-685. 2003.

RODRÍGUEZ REINOSO, Carmen Elizabeth. **Estudio comparativo entre los métodos de hidrólisis ácida y enzimática de banano (*Musa cavendish*) para la obtención de jarabe de glucosa.** Tesis de título de Ingeniería de Alimentos. Quito. Universidad San Francisco de Quito, 2011.

SAHA, B. C. **Hemicellulose bioconversion.** *J Ind Microbiol Biotechnol*. 30: 279-91. 2003.

SAHA, B.C.; ITEN, L.B.; COTTA, M.A.; WU Y.V. **Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol.** *Process Biochemistry*. Vol. 40: 3693-3700. 2005.

SÁNCHEZ RIAÑO, G. M. **Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos.** *Tumbaga*, 61-83. 2010.

SALCEDO M. Jairo., MONTES M. Everaldo. y PAJARO S. José. **Producción de jarabes de fructosa por medio de la hidrólisis enzimática del almidón de yuca de las variedades corpoica m tai-8 y corpoica orense.** *Dyna*, (160): 121-130. Diciembre 2009.

SANDOVAL, I. *Guía técnica del cultivo de la piña*. El Salvador: Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal "Enrique Alvarez Córdova". 2011.

SAVAL, S. **Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: Pasado, Presente y Futuro**. *Biotecnología*, Vol. 16(2): 14-46. 2012.

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.

SHALLOM, D. Y SHOHAM, Y. **Microbial hemicellulases**. *Curr Opin Microbiol*. Vol. 6: 219-228. 2003.

SIERRA A., I., PÉREZ QUINTANILLA D., GÓMEZ RUIZ S. *Análisis instrumental para Educación superior*. España. Editorial NETBIBLO, S.L. 2010.

SWAROOPA RANI, R., & KRISHNA, N. **Ensilage of pineapple processing waste for methane generation**. *Science Direct*, 523–528. 2004.

TALEBNIA Farid, Dimitar KARAKASHEV, Irini ANGELIDAKI. **Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation**. *Bioresource Technology Volumen* 101(13):4744-4753. 2010.

TEJEDA 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.

VINCENT, M. **Química Industrial Orgánica**. España: Editorial de la Universidad Politécnica de Valencia. 2006.

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.

WITHERS, S. G. **Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases.** *Carbohydr Polym.* Vol. 44: 325-337. 2001.

XU, F., SUN, J., LIU, F. & SUN, R. **Comparative study of alkali and acidic organic solvent soluble hemicellulosic poly saccharides from sugarcane bagasse.** *Carbohydr. Res.* Vol. 341. 253 -261. 2006.

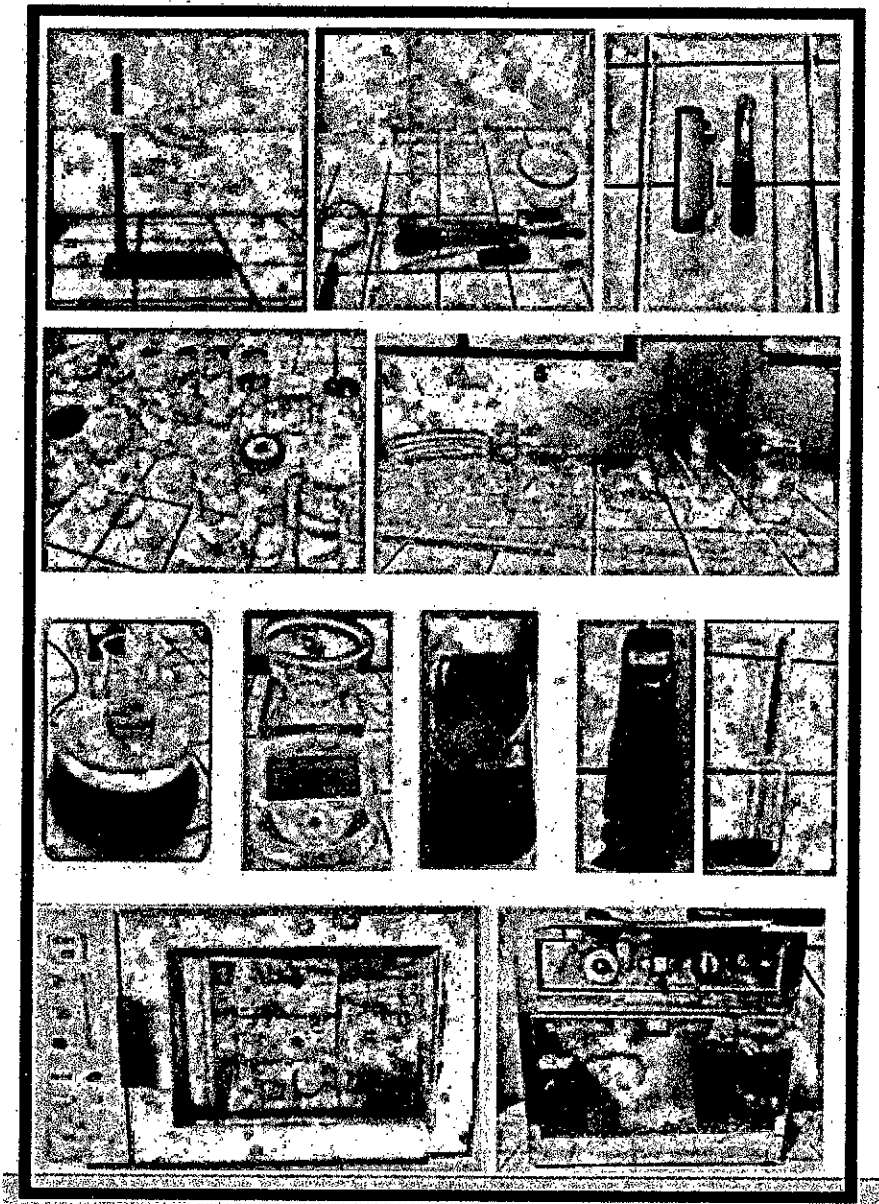
ZHANG H.Y. Y LYND L.R. **Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems.** *Biotechnology and Bioengineering.* Vol. 88: 797-779. 2004.

## IX. APÉNDICE

*Electro*



FIGURA N° 9.1  
MATERIALES Y EQUIPOS UTILIZADOS



Fuente: Elaboración propia.

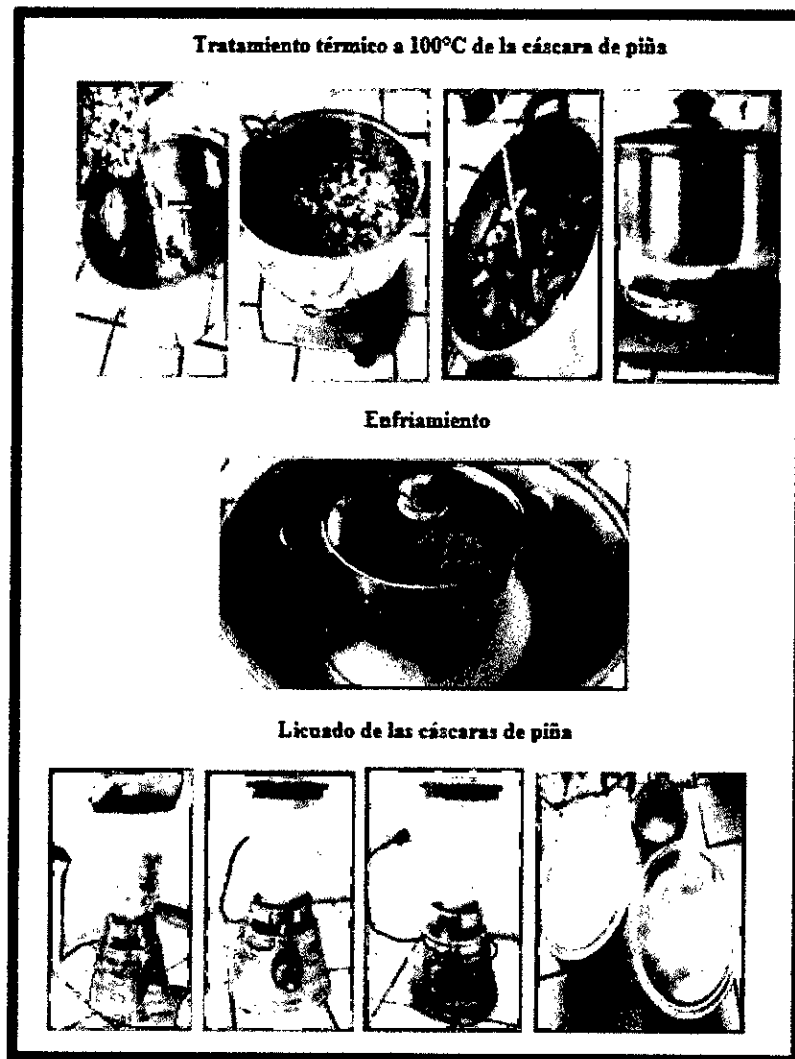
FIGURA N° 9.2

FOTOS EXPERIMENTALES DE LA SELECCIÓN, LAVADO Y PESADO Y TROZADO DE LAS CÁSCARAS DE PIÑA (ETAPA 1)



Fuente: Elaboración propia.

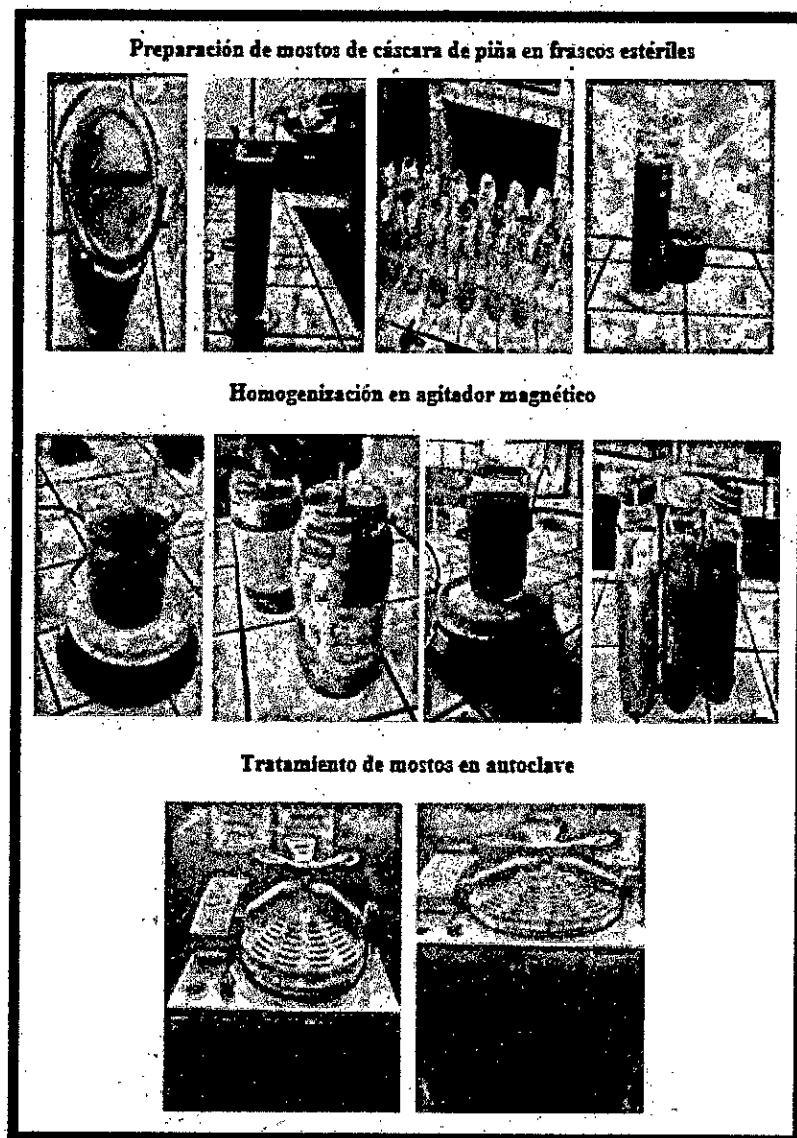
**FIGURA N° 9.3**  
**FOTOS EXPERIMENTALES DEL TRATAMIENTO TÉRMICO,**  
**ENFRIAMIENTO, LICUADO DE LAS CÁSCARAS DE PIÑA (ETAPA 1)**



Fuente: Elaboración propia.

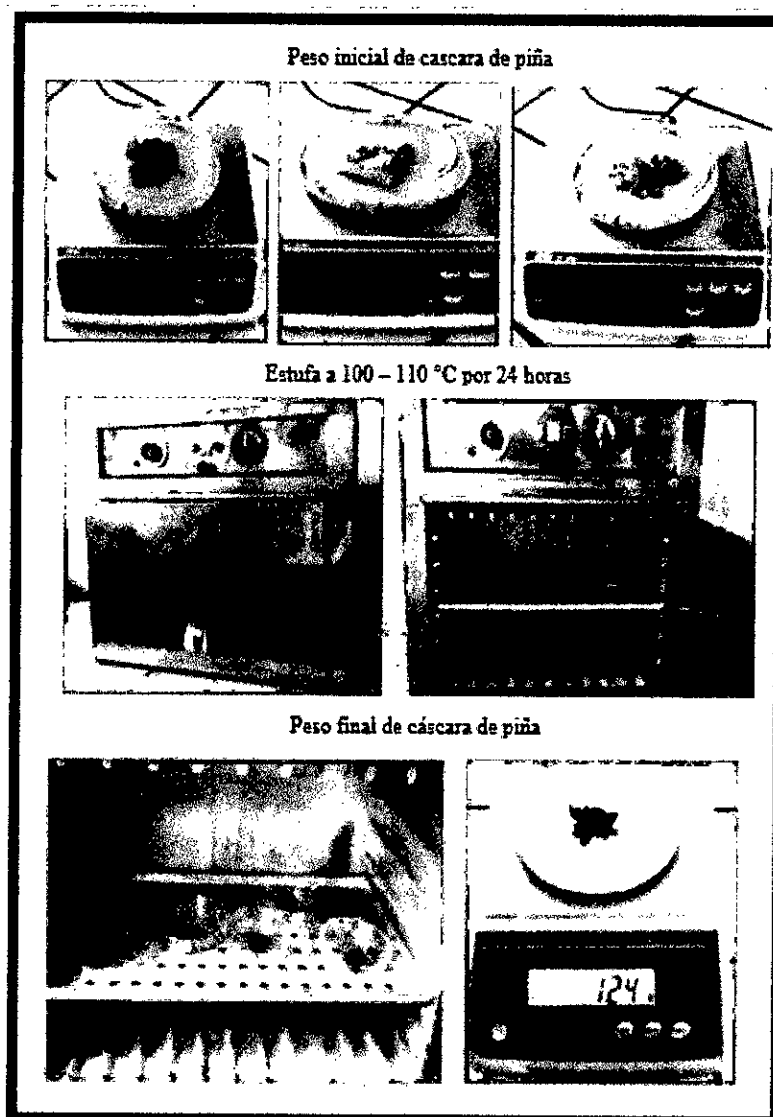
*Handwritten signature or mark.*

**FIGURA N° 9.4**  
**FOTOS EXPERIMENTALES DEL ACONDICIONAMIENTO DE MOSTOS**  
**EN FRASCOS ESTERILIZADOS PARA SU TRATAMIENTO TÉRMICO EN**  
**AUTOCLAVE (ETAPA 1)**



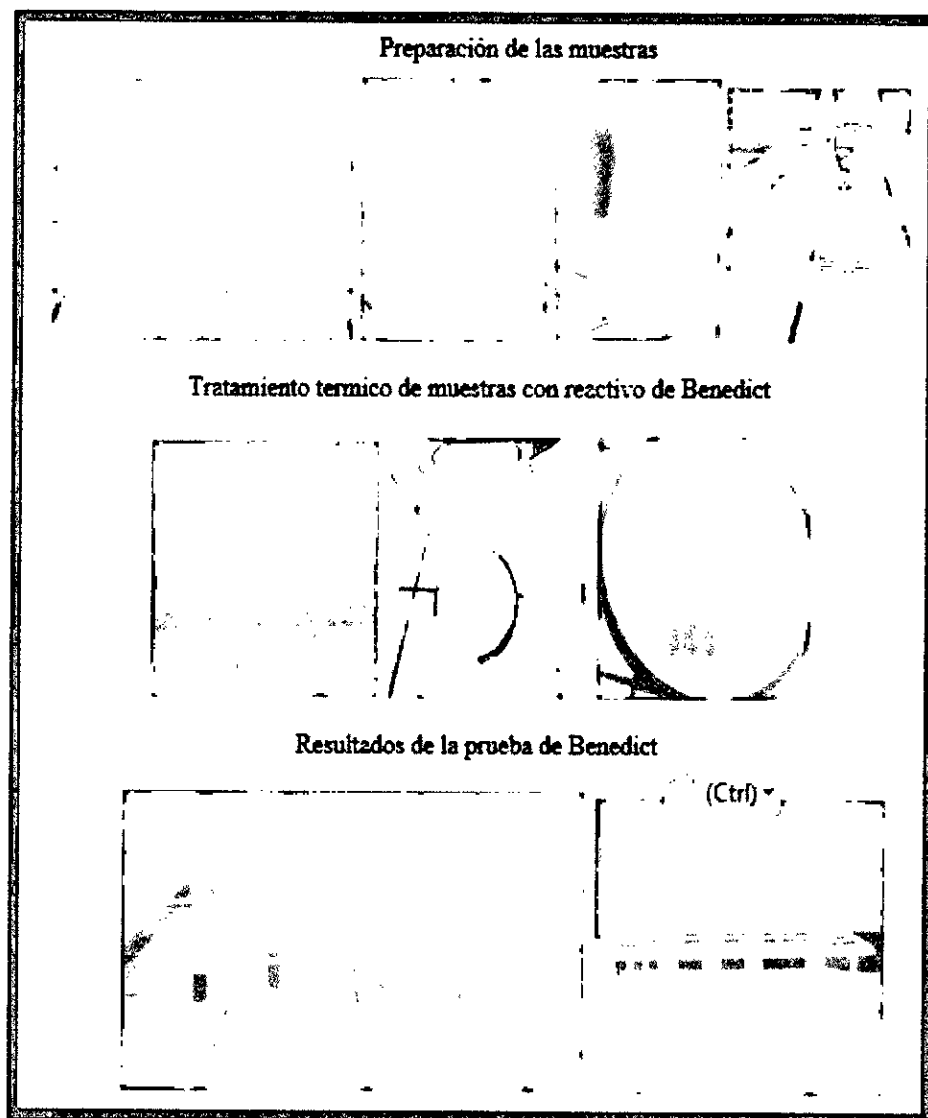
Fuente: Elaboración propia.

**FIGURA N° 9.5**  
**FOTOS EXPERIMENTALES DEL PROCEDIMIENTO DESARROLLADO**  
**PARA LA DETERMINACIÓN DE HUMEDAD DE LA CÁSCARA DE PIÑA**  
**(*Ananas comosus*) VARIEDAD GOLDEN**



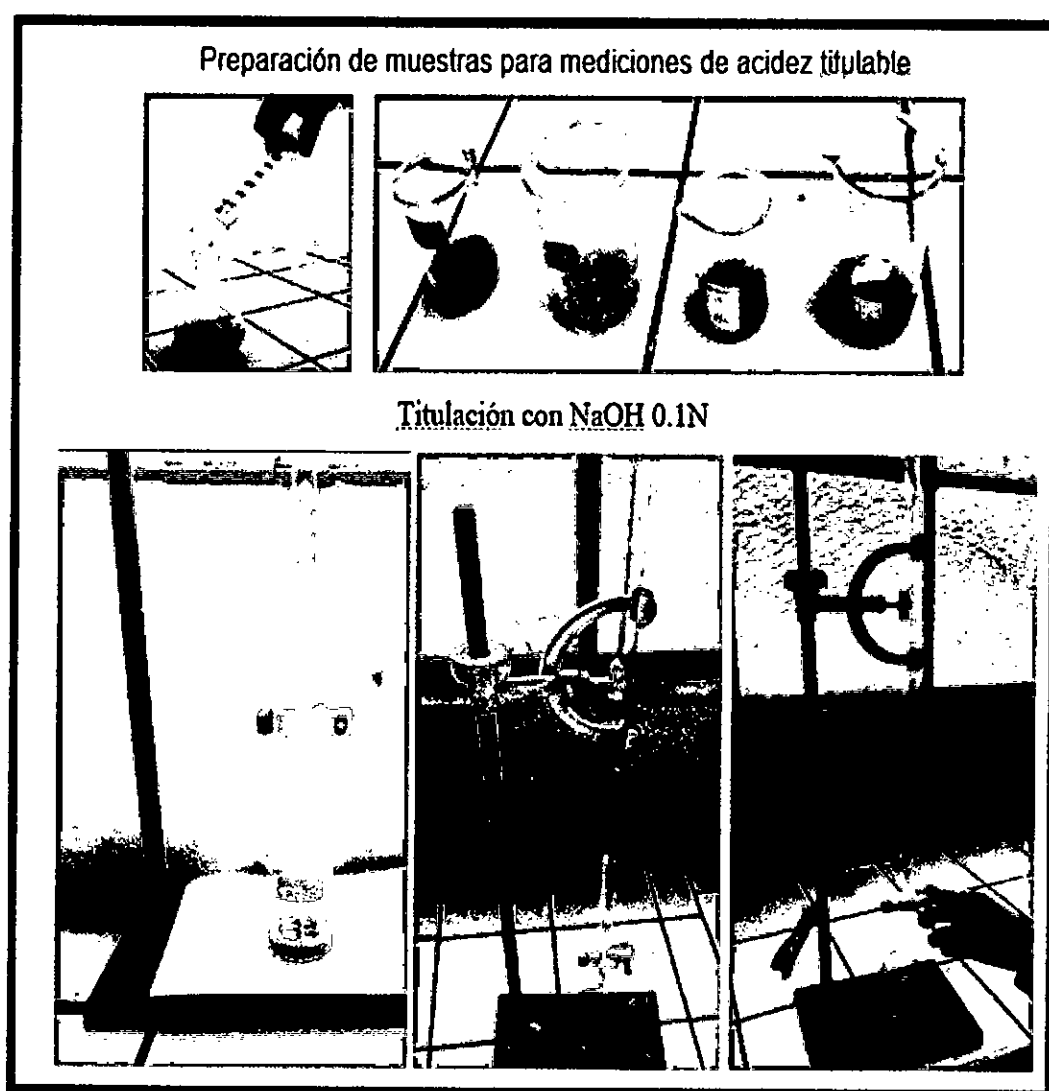
Fuente: Elaboración propia.

**FIGURA N° 9.6**  
**PRUEBA CUALITATIVA DE DETERMINACIÓN DE AZÚCARES**  
**REDUCTORES CON REACTIVO DE BENEDICT EN LOS**  
**DIFERENTES TRATAMIENTOS**



Fuente: Elaboración propia.

**FIGURA N° 9.7**  
**FOTOS EXPERIMENTALES DEL PROCEDIMIENTO DESARROLLADO**  
**PARA LA DETERMINACIÓN DE ACIDEZ TITULABLE DE LOS JARABES**  
**GLUCOSADOS DE CÁSCARA DE PIÑA (*Ananas comosus*) VARIEDAD**  
**GOLDEN**



Fuente: Elaboración propia.

**X. ANEXO**

*[Handwritten signature]*



**TABLA N° 10.1**  
**FICHA TÉCNICA ENZIMA GRAMOZYME CELULASA**

**GRANOTEC**

**FICHA TÉCNICA**

## Granozyme Celulasa

**DESCRIPCIÓN:** Compañita por enzimas Celulasa y haina de trigo como carrier.

**ESPECIFICACIONES:**

Físico Químicas	
Apariencia	Póvco
Color	Cream a amarillo crasozo(*)
Humedad	Máx. 10%
Plomo (Pb)	Mín. 2 ppm (**)
Metales pesados (como Pb)	Máx. 10 ppm
Microbiológicas (***)	
Cultivos Totales	Máx. 30 ufc/g
Escherichia coli	Ausencia en 25 g
Salmonella	Ausencia en 25 g

(\*) El color puede variar de batch a batch.  
 (\*\*) Especificaciones de acuerdo a General Specifications and Considerations for Enzyme Preparations used in Food Processing.  
 (\*\*\*) Especificaciones de acuerdo a General Specifications and Considerations for Enzyme Preparations used in Food Processing.

**APLICACIÓN:** Enzima para el tratamiento de harinas integrales, con alto contenido de fibra. Carga excelente volumen. Muy buena tolerancia en fermentación. Se obtiene masas blandas, no pegajosas. Excelente storage con atmósfera. Aplicado en procesos largos o cortos.

**DOSIFICACIÓN:** La dosificación depende de la cantidad de la harina, formulación y espesamiento del proceso, y debe determinarse mediante ensayos de prueba. Se recomiendan los siguientes rangos:  
 5 - 50 ppm

Código: MG 02 FG 03    Versión: 01

1. Granotec Perú garantiza la calidad de sus productos en el cumplimiento de las especificaciones indicadas en sus fichas técnicas.
2. Cualquier información sobre el contenido, uso, propiedades, etc. de Granotec Perú, sus productos, servicios, en general, o cualquier otro asunto de naturaleza comercial, puede obtenerse directamente de Granotec Perú, en cualquier momento, mediante la solicitud de datos de cualquier de nuestros canales de atención al cliente.
3. El cliente es el responsable del adecuado almacenamiento, manipulación, dosificación, uso, aplicación, proceso, producción, etc. de los productos adquiridos, por lo tanto Granotec Perú no puede ser responsable del cumplimiento de las especificaciones en un producto final del cliente.
4. Este producto ha sido fabricado en una planta que produce grano (harina de trigo), leche y sus derivados, agua y productos a base de soja.

Granotec Perú  
Avenida Independencia N° 115  
P.O. Box 10000 - Lima 10, Perú

M. C. J. S. S. S. S. S.  
Instituto de Promoción

Ministerio de Agricultura  
y Desarrollo Rural

Ministerio de Comercio  
y Turismo

Ministerio de Energía  
y Minas

Ministerio de Salud

Ministerio de Transportes  
y Comunicaciones

UR 0518

Fuente: GRANOTEC. 2018.

CC-BY-SA

**TABLA N° 10.2**  
**CERTIFICADO DE ANÁLISIS. GRAMOZYME CELULASA**

Nutrición y Biotecnología para la Salud

**GRANOTEC**

**CERTIFICADO DE ANALISIS**

## Granozyme Celulasa

Fecha actual : 30/05/18  
 N° Certificado : 1185  
 Lote N° : 180522-05  
 Fecha de producción : 29/05/18  
 Fecha de vencimiento : 29/05/20  
 Presentación : Bolsas

ANÁLISIS	UNID	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
<b>Físico Químicas</b>			
Apariencia	—	Polvo	Cumple
Color	—	Crema – amarillo cremoso	Cumple
Humedad	%	Máx. 10	8.00
Plomo	ppm	Máx. 2.0	< 2
<b>Microbiológicas</b>			
Coliformes Totales	ufc/g	Máx. 30	< 10
Escherichia coli	/25g	Ausencia	Ausencia
Salmonella	/25g	Ausencia	Ausencia

Si necesita mayor información, por favor contactarse al correo [laboratorio@granotec.com.pe](mailto:laboratorio@granotec.com.pe)

**GRANOTEC PERU S.A.**  
 Calle Comercio 1112, Lima 7  
 Teléfono: +51 (0)1 426 7765  
 www.granotec.com

Granotec Perú S.A.  
 Av. Comercio 1112  
 Int. Sur y Avenida 7 Esq. Lima 7

Tel. +51 (0)1 426 7765  
 www.granotec.com

Transferencia  
 Prorrateo  
 Capacitación

Investigación  
 Investigación  
 y Desarrollo

Manufactura y  
 Ingeniería de  
 Procesos

Control de  
 Calidad y  
 Cumplimiento



Fuente: GRANOTEC. 2018.

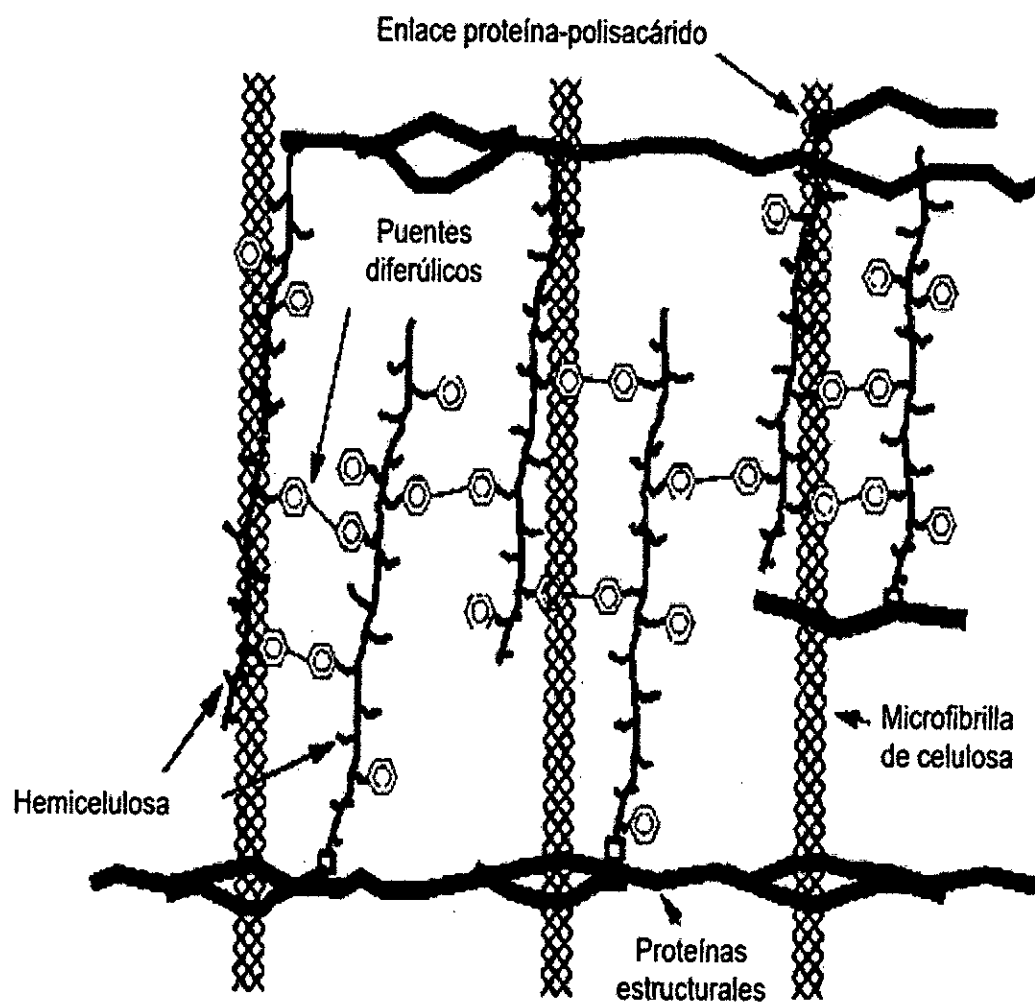
*Handwritten signature or mark*

**TABLA N° 10.3**  
**EJEMPLOS DE PRETRATAMIENTOS A MATERIALES**  
**LIGNOCELULOSICOS**

Métodos	Procedimientos	Referencia
Pulverizado mecánico	Molienda	Sun y Cheng, 2002
Pirólisis	Temp. > 300 °C	Yu y Zhang, 2003
Explosión a vapor	Vapor saturado a 160 - 260 °C, p= 0.69 - 4.85 MPa por unos segundos o minutos y liberación de presión hasta presión atmosférica	Söderström <i>et al.</i> , 2003
Agua líquida caliente	Agua caliente a presión T= 170 - 230 °C 1 - 46 min	Lynd <i>et al.</i> , 2002
Explosión de fibra con amoníaco	1 - 2 Kg de amoníaco/kg de material seco 90 °C/30 min	Chundawat <i>et al.</i> , 2007
Explosión con CO <sub>2</sub>	4 kg de CO <sub>2</sub> /kg de material p= 5.62 MPa	Sun y Cheng, 2002
Ozonólisis	Ozono a temperatura y presión ambiente	Sun y Cheng, 2002
Hidrólisis con ácido diluido	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , HCl, HNO <sub>3</sub> 1-5% (T= 120 - 160 °C 1, MPa)	Rodríguez-Chong <i>et al.</i> , 2004
Hidrólisis con ácido concentrado	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10 - 30%, ácido peracético 21 - 60% (T= 170 - 190 °C)	Teixeira <i>et al.</i> , 1999
Hidrólisis alcalina	NaOH diluido, 24 h/60 °C	Sun y Cheng, 2002
Organosolventes	Solventes orgánicos y su mezcla con 1% de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> y HCl	Lynd <i>et al.</i> , 2002

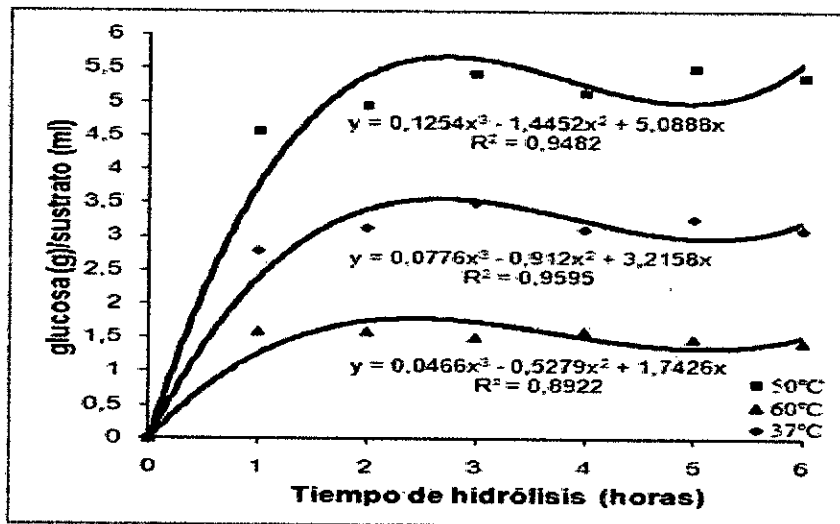
Fuente: Medina. M. *et al.*, 2011

FIGURA N° 10.1  
MODELO DE LA INTERACCIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA PARED  
CELULAR



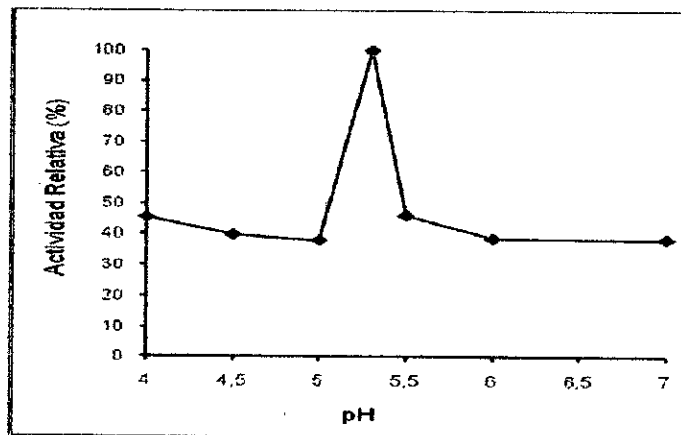
Fuente: Saha B., 2003.

**GRÁFICO N° 10.1**  
**ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS CELULASAS SOBRE SUSTRATO**  
**CARBOXIMETIL CELULOSA A DIFERENTES TIEMPOS Y**  
**TEMPERATURAS**



Fuente: Paredes M. *et al.*, (2011).

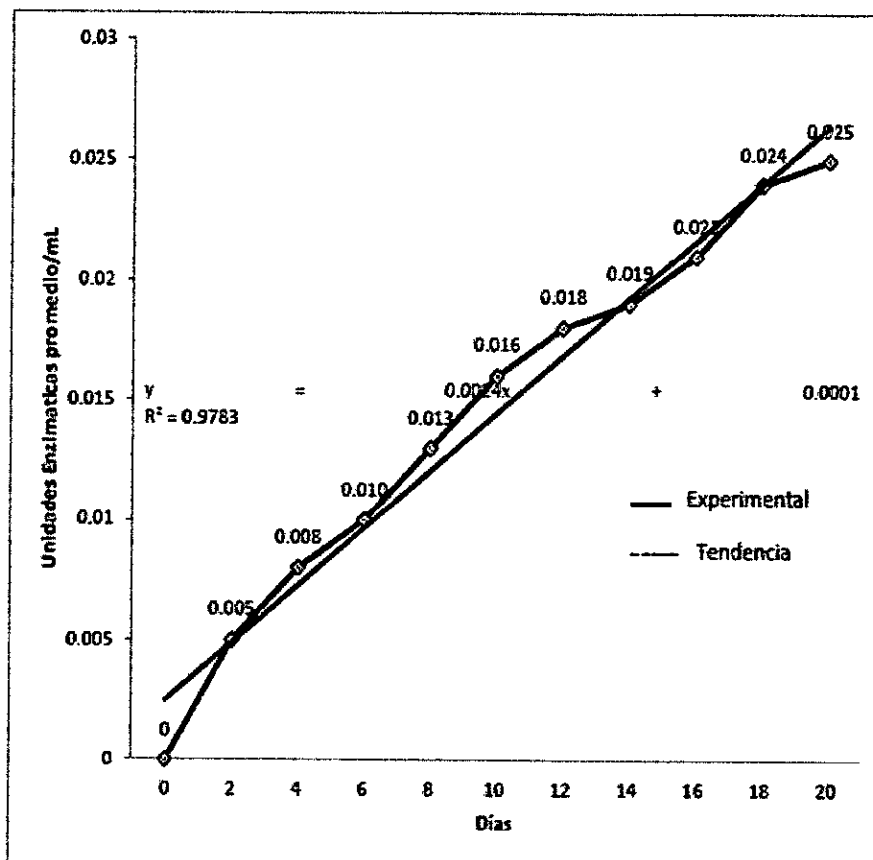
**GRÁFICO N° 10.2**  
**ACTIVIDAD RELATIVA DE ENZIMAS CELULASAS SOBRE SUSTRATO**  
**CARBOXIMETIL CELULOSA A DIFERENTES VALORES DE pH**



Fuente: Paredes M. *et al.*, (2011).

*Handwritten signature*

**GRÁFICO N° 10.3**  
**PRODUCCIÓN DE CELULASAS POR *A. niger*, EXPRESADAS EN**  
**UNIDADES ENZIMÁTICAS PROMEDIO/ML DE EXTRACTO HASTA LOS**  
**20 DÍAS DE INCUBACIÓN (P < 0,05)**



Fuente: Llenque L. *et. al.*, (2015).

*Handwritten signature*

**TABLA 10.4. MATRIZ DE CONSISTENCIA**

<b>PROBLEMA GENERAL Y ESPECIFICOS</b>	<b>OBJETIVO GENERAL Y ESPECIFICOS</b>	<b>HIPOTESIS</b>	<b>VARIABLES E INDICADORES</b>	<b>METODOLOGIA</b>
<p><b>1. Problema General</b> ¿Con que tiempo de hidrólisis enzimática y con qué concentraciones de enzima celulasas obtendremos jarabes glucosados de calidad a partir de cáscaras de <i>Ananas comosus</i> (Piña)?</p> <p><b>2. Problemas Específicos</b> ¿Con que concentraciones de la enzima celulasa obtendremos jarabes glucosados de calidad a partir de cáscaras de <i>Ananas comosus</i> (Piña)? ¿Con que tiempo de hidrólisis enzimática de la celulasa obtendremos jarabes glucosados de calidad a partir de cáscaras de <i>Ananas comosus</i> (Piña)?</p>	<p><b>1. Objetivo General</b> Determinar a nivel de laboratorio el efecto de la aplicación de la enzima celulasa a las cáscaras de piña (<i>Ananas comosus</i>) para la producción de jarabe glucosado.</p> <p><b>2. Objetivo específico</b> Determinar a nivel de laboratorio las concentraciones de enzima celulasa óptimas para obtener jarabe glucosado de calidad a partir de cáscaras de piña.  Establecer a nivel de laboratorio los tiempos óptimos de hidrólisis enzimática de la celulasa para obtener jarabe glucosado de calidad a partir de cáscaras de piña</p>	<p><b>1. Hipótesis General</b> La aplicación del proceso de transformación de las cáscaras de <i>Ananas comosus</i> (Piña) por hidrólisis enzimática permitirá obtener jarabes glucosados evaluando la concentración de celulasas y el tiempo de hidrólisis del mosto.</p> <p><b>2. Hipótesis específicas</b> La concentración de celulasas que actúa en el mosto de cáscaras de <i>Ananas comosus</i> (Piña) influye en la producción de jarabes glucosados.  El tiempo de hidrólisis enzimática de cáscaras de <i>Ananas comosus</i> (Piña) influye en la producción de jarabes glucosados.</p>	<p><b><u>VARIABLE INDEPENDIENTE</u></b> Concentración de la enzima celulasa Tiempo de hidrólisis de la cascara de piña</p> <p><b><u>VARIABLE DEPENDIENTE</u></b> Calidad del mosto alcohólico producido de cascara de piña hidrolizada por celulasas expresado como: Grado alcohólico Porcentaje de etanol</p> <p><b>INDICADORES:</b> Calidad del hidrolizado enzimático de la cascara de piña expresado como: Contenido de azucares reductores Equivalentes de dextrosa</p>	<p><b>TIPO:</b> Experimental y Observacional analítico - correlacional - prospectivo,</p> <p><b>Diseño:</b> Completamente al azar con modelo factorial de 3<sup>2</sup> correspondiente a la combinación de factores (Concentración de la celulasa y Tiempo de hidrólisis) y con tres repeticiones.</p> <p><b>Universo poblacional (N)</b> Diez kilos de cascara de piña obtenido de los frutos de la piña (<i>Ananas comosus</i>) tratado por Hidrólisis enzimática.</p> <p><b>Muestra poblacional (n)</b> Muestra de 1000 ml de solución de cascara de piña tratado por hidrólisis enzimática en tres repeticiones por tratamiento con los 03 diferentes concentraciones de celulasa (0,5%, p/v., 1% p/v. y 1,5% p/v) y 03 diferentes tiempos de hidrólisis (18, 24 y 30 horas) para la obtención de jarabes glucosados.</p> <p><b>Métodos de Análisis</b> 1. Determinación del contenido de azucares reductores. Método de Eynon-Lane. NTP 203.OO2-1979 y NTP 208.102:2014 2. Determinación de humedad. Método gravimétrico. NTP 209.264. 2001. 3. Determinación de la acidez (INDECOPI, NTP 203.070. 1977. Revisada el 2012; INDECOPI, NTP 211.040. 2012).</p>