

Estudio cinético de la producción de bioetanol a partir de residuos agroindustriales de la cáscara de banano maduro

HUGO ROMERO BONILLA¹
CINTHIA MACÍAS BALÓN²
ARACELLY PALACIOS MORENO³
FELIPE REDROVAN PESANTEZ⁴

RECIBIDO: 15/01/2018 ACEPTADO: 08/02/2019

RESUMEN

Esta investigación aborda la aplicación de un compuesto de polietilenglicol (PEG) de masa molecular 1500, cuyo objetivo es degradar los compuestos inhibidores presentes durante la hidrólisis enzimática de la cáscara de banano maduro de la variedad Cavendish. Asimismo, se realizaron tres experimentos al 60% de cáscara de banano molida, en los que se adicionó PEG a diferentes concentraciones: 0,01; 0,02; 0,03 g/g biomasa. La hidrólisis enzimática se realizó con conidios del hongo *Trichoderma viride* y su posterior fermentación alcohólica fue con levadura activa seca comercial de *Saccharomyces cerevisiae*, que previamente fue activada. El mejor resultado corresponde al experimento PEG3 (0,03 g/g biomasa), con el que se obtuvo un mayor incremento de azúcares reductores. Además, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,5$) para la glucosa obtenida entre los tres tratamientos hidrolíticos. Los resultados demuestran que, a partir de los residuos lignocelulósicos de la cáscara de banano maduro, se puede obtener bioetanol, cuyo rendimiento obtenido de 7% v/v se aproxima a otros reportados en el mismo campo de estudio. Finalmente, el análisis de los costos variables del pretratamiento, aplicado a la cáscara de banano en la producción de etanol obtenido, permite estimar que el método planteado en este artículo es menos costoso comparado con los demás procedimientos, demuestra un mayor rendimiento de bioetanol y se obtiene en menor tiempo.

Palabras-claves: Cáscara de banano; polietilenglicol; hidrólisis enzimática; fermentación alcohólica; bioetanol.

INTRODUCCIÓN

Las crecientes demandas de combustible derivado del petróleo, debido al rápido desarrollo de la industria automotriz, junto con los problemas de contaminación ambiental, han inspirado los esfuerzos en la exploración de combustibles alternativos (Than-gavelu, Saleh y Nasir, 2016). Desde esta perspectiva, se ha fomentado la producción y el consumo de energías renovables, sostenibles y respetuosas con el medioambiente, a través de la biomasa lignocelulósica, la cual puede obtenerse a partir de materiales de desecho de las actividades agrícolas (Conesa, Segui y Fito, 2013). Las fuentes de biocombustibles están distribuidas geográficamente de manera más uniforme que los combustibles fósiles, lo que las convierte en una opción ideal para cumplir con los requerimientos de manera sostenible. Varios promotores de esta alternativa energética subyacen a los crecientes intereses de los biocombustibles, a causa de la creciente incertidumbre de los suministros de petróleo por el aumento de la demanda, la disminución de las reservas conocidas, la preocupación por el calentamiento global y las emisiones de gases de efecto invernadero asociadas con el uso de combustibles fósiles (Saini, Saini y Tewari, 2015).

Los sustratos vegetales están compuestos por celulosa, hemicelulosa y lignina, los cuales eran considerados la materia prima del futuro para la producción de biocombustibles, por su bajo costo y disponibilidad (Abril y Navarro, 2012). La producción y el uso de dichos combustibles ayudan a minimizar las emisiones de gases de efecto invernadero, ya que son obtenidos de fuentes de energía alternativa; asimismo, la producción de bioetanol a partir de materia lignocelulósica implica diferentes etapas: pretratamiento, hidrólisis, fermentación (Silva y Oliveira, 2014).

Por esos motivos, en este estudio se utilizará la cáscara de plátano, la cual es una fuente abundante de material celulósico, que es el constituyente externo del banano, representa alrededor

- 1 Docente investigador y jefe del Laboratorio de Electrónica y Bioenergía de la Universidad Técnica de Machala. Machala, Ecuador. ORCID: 0000-0002-7846-0512.
E-mail: hromero@utmachala.edu.ec
- 2 Investigadora e ingeniera química de la Universidad Técnica de Machala. Machala, Ecuador.
E-mail: cmacias2@utmachala.edu.ec
- 3 Investigadora e ingeniera química de la Universidad Técnica de Machala. Machala, Ecuador.
E-mail: apalacios3@utmachala.edu.ec
- 4 Investigador e ingeniero en alimentos de la Universidad Técnica de Machala. Machala, Ecuador.
E-mail: fredrovan2@utmachala.edu.ec

del 40% en peso y tiene el potencial de producir alcohol; sin embargo, es necesario un procesamiento químico y bioquímico para convertir estos polímeros en azúcares monoméricos (Quintero, Martínez, Velasco et al., 2015). Una vez en forma monomérica, los azúcares pueden convertirse mediante microorganismos fermentativos en bioetanol; además, durante la etapa de pretratamiento e hidrólisis, se producen compuestos no deseables que afectan negativamente la tasa de fermentación de la levadura. También, la toxicidad de estos compuestos, llamados inhibidores, sobre los microorganismos es uno de los principales factores limitantes en el rendimiento de bioetanol durante la fermentación (Jaramillo, Gómez y Fontalvo, 2012). Por ello, debe realizarse un pretratamiento antes de la hidrólisis para remover la lignina, hidrolizar la hemicelulosa a azúcares fermentables, y reducir la cristalinidad de la celulosa para liberar la glucosa (Morales, 2012). Esto determina el rendimiento que se obtendría después de la fermentación alcohólica.

En ese sentido, Saval (2012) manifiesta que la hidrólisis enzimática se aplica una vez que los residuos han sido tratados. Así, las cadenas poliméricas son más expuestas para que la generación de compuestos tóxicos no aumente y se evite la adición de compuestos químicos. El proceso se lleva a cabo mediante la adición de enzimas celulíticas al biorreactor (Zhao, Cao, Wang et al., 2013). El uso de la *Trichoderma* en la industria biotecnológica se debe a su capacidad de producir diversos metabolitos y por su adaptación a diversas condiciones ambientales y sustratos. Por otro lado, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es usada frecuentemente en la fermentación alcohólica (Sotelo, Avilez y Ginés-Carbajal, 2015), por ser un microorganismo anaeróbico facultativo que tiene la capacidad de fermentar la glucosa y no presentar muchas exigencias en cuanto a nutrientes. Por tal motivo, el objetivo de la presente investigación fue hidrolizar la celulosa y hemicelulosa presente en la cáscara de banano maduro a azúcares reductores y su posterior fermentación alcohólica para obtener bioetanol de segunda generación.

METODOLOGÍA

Materiales

Las cáscaras utilizadas fueron de bananos maduros de la variedad Cavendish. Estas habían sido desechadas de las líneas de producción de la empresa Diana Food S. A., que tiene su planta de procesamiento ubicada en Pasaje, provincia de El Oro, en Ecuador. Asimismo, se empleó polietilenglicol de

peso molecular 1500 (PEG 1500) de Sigma-Aldrich (Alemania). El hongo fue obtenido de la marca comercial Trichobeb, proporcionado por Ecu Biológica (Ecuador); y la levadura activa seca fue proporcionada por Levapan (Ecuador).

Pretratamientos

Se molió la cáscara, con la finalidad de aumentar su área de contacto con el hongo, luego se procedió a realizar un tratamiento térmico en una autoclave All American 25X a 121 °C durante 15 minutos.

Diseño del experimento

Se prepararon tres soluciones al 60% de cáscara molida de banano, concentración reportada por Romero, Ayala, y Lapo (2015), ya que, con este porcentaje de cáscara se obtiene mayor concentración de glucosa hidrolizada. Se añadieron 3 concentraciones diferentes de PEG 1500, mostradas en la Tabla 1: PEG1 (0,01); PEG2 (0,02) y PEG3 (0,03 g/g biomasa), para evaluar su efecto como inhibidor en la hidrólisis, ya que la lignina y otros compuestos que se encuentran presentes en los residuos lignocelulósicos limitan la hidrólisis de la celulosa y la hemicelulosa (Ko, Um, Park et al., 2015).

Tabla 1. Factores y niveles del experimento.

Adsorbentes	Concentración PEG (g PEG/g biomasa)		
	[] ₁	[] ₂	[] ₃
PEG 1500	0,01	0,02	0,03

[]₁: Concentración 1; []₂: Concentración 2; []₃: Concentración 3

Fuente: Elaboración propia.

Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática de la biomasa se realizó en biorreactores de 2 L a una concentración de 60% de cáscara, a los cuales se les añadió tres concentraciones diferentes de PEG 1500 (0,01-0,03 g PEG/g biomasa). Estas habían sido disueltas en agua purificada y agitadas durante 5 minutos para que el PEG absorba a los inhibidores de la hidrólisis enzimática. Posteriormente, se adicionó 0,4 g/L de conidios del hongo *Trichoderma viride*. Se agitó durante 1 hora a 200 rpm y se tomó una muestra cada hora. Durante el proceso se midió pH, °Bx (grados Brix) y oxígeno disuelto, para lo cual se utilizó un medidor portátil de acuerdo a lo manifestado por Tejeda, López, Rojas et al. (2015).

Cuantificación de azúcares reductores

Para la cuantificación de glucosa se tomó una muestra de hidrolizado en un tubo de ensayo y se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 min, y con el sobrenadante se hizo una dilución de 1:10. Luego

se tomaron 0,5 mL de la dilución y 0,5 mL del reactivo DNS, los cuales se colocaron en un tubo de ensayo en baño de agua a 100 °C por 5 min. En este lapso el ácido 3,5 dinitrosalicílico fue reducido por los azúcares reductores que entran en contacto con el mismo, ocasionando un cambio de color con variaciones de amarillo hasta café (Ávila, Rivas, Hernández et al., 2012). Se enfrió hasta lograr temperatura de ambiente y se adicionó 5 mL de agua destilada. Se agitó y se realizó la lectura a 540 nm en el espectrofotómetro Hach DR 3900 (Canseco, Aráoz, Gusils et al., 2015).

Con el experimento PEG3 (PEG 0,03 g/g cáscara), que fue el tratamiento con el que se obtuvo mayor concentración de glucosa, se realizó la fermentación para la obtención de bioetanol.

Fermentación

Después de la hidrólisis enzimática de la cáscara, se inactivó el hongo pasteurizando el hidrolizado a 90 °C por 10 min (Centeno, 2016). Se trabajó con un volumen de 1000 mL, se controló el pH y se adicionó 800 ufc/mL de levadura seca comercial (*Saccharomyces cerevisiae*) que previamente fue activada; asimismo, se colocó el jarabe glucosado en

un biorreactor anaerobio, donde se tomaron muestras para medir la concentración de alcohol mediante cromatografía de gases. El pH, °Bx y oxígeno disuelto se midieron con un equipo multiparamétrico.

Estimación comparativa de costos variables

Se realizó una estimación comparativa de costos variables del proceso de sacarificación mediante hidrólisis enzimática y de fermentación alcohólica, para lo cual se asumió una base de cálculo de 600 g de cáscara/L de solución.

A continuación, en la Tabla 2 se detallan los costos de los insumos necesarios en el proceso.

RESULTADOS

La Figura 1 presenta la producción de azúcares reductores (mg/L) para los 3 tratamientos y una muestra control durante 24 horas de hidrólisis enzimática.

En el experimento con PEG 0,03 g/g biomasa se alcanzó un incremento de 895,95 (± 1,9) mg/L de azúcares reductores, existiendo diferencias significativas con respecto a los otros tratamientos, tal como se puede evidenciar en la Tabla 3, donde todos los p-value alcanzaron valores menores a 0,05.

Tabla 2. Costo estimado de los insumos necesarios para el proceso de sacarificación mediante hidrólisis enzimática y fermentación alcohólica a partir de cáscara de banana maduro.

Variable dependiente: costo	
Insumos	Costo
<i>Trichoderma</i> (inóculo para hidrólisis en este estudio)	\$ 0,05 para 600 g de cáscara
Polietilenglicol (proceso propuesto en este estudio)	\$ 2,52 para 600 g de cáscara
Vapor para la pasteurización (proceso propuesto en este estudio)	\$ 0,25 cada kg de vapor de agua
Etanol para la desinfección de la cáscara (proceso propuesto en la literatura)	\$ 0,70 para 600 g de cáscara
<i>Aspergillus</i> (inóculo para hidrólisis propuesto en la literatura)	\$ 0,01 para 600 g de cáscara
<i>Saccharomyces</i>	\$ 12,00 los 600 g
Cáscara de banana y transporte	\$ 0,072

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3. Análisis de varianza para producción de glucosa en función de los pretratamientos aplicados a cáscara de banana maduro.

Variable dependiente: glucosa					
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	1 295 110,438 ^a	31	41 777,756	2413,156	0,000
Intersección	18 604 125,563	1	18 604 125,563	1 074 606,531	0,000
Tiempo	788 371,938	7	112 624,563	6505,390	0,000
PEGC	99 025,312	3	33 008,437	1906,625	0,000
Tiempo * PEGC	407 713,187	21	19 414,914	1121,439	0,000
Error	554,000	32	17,313		
Total	19 899 790,000	64			
Total corregido	1 295 664,438	63			

a. R al cuadrado = 1000 (R al cuadrado ajustada = 0,999)

Fuente: Elaboración propia.

Por otro lado, la Figura 2 muestra el efecto del polietilenglicol (PEG) agregado a la cáscara de banana maduro molida a diferentes concentraciones (Tabla 1), en la producción de glucosa. Se puede observar que existen diferencias significativas entre los pretratamientos estudiados.

Por su parte, la variación del pH respecto al tiempo de hidrólisis enzimática de cáscara de banana ma-

duro en las condiciones de estudio se puede observar en la Figura 3.

Asimismo, la disminución del oxígeno disuelto durante el proceso de hidrolizado, se muestra en la Figura 4.

Adicionalmente, el comportamiento de la producción de bioetanol durante la fermentación por un periodo de 4 días se observa en la Figura 5.

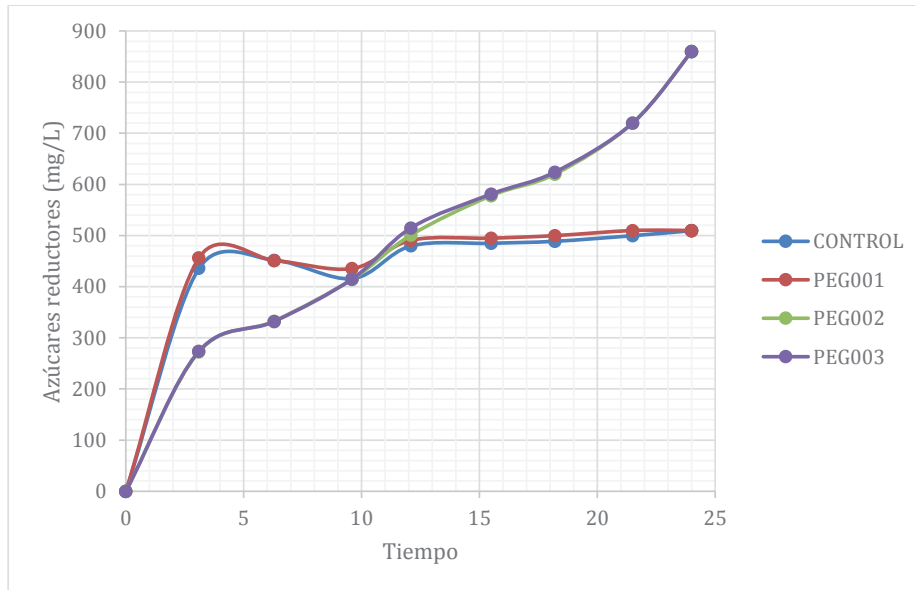


Figura 1. Cinética de la hidrólisis enzimática para los tratamientos durante 24 horas.

Fuente: Elaboración propia.

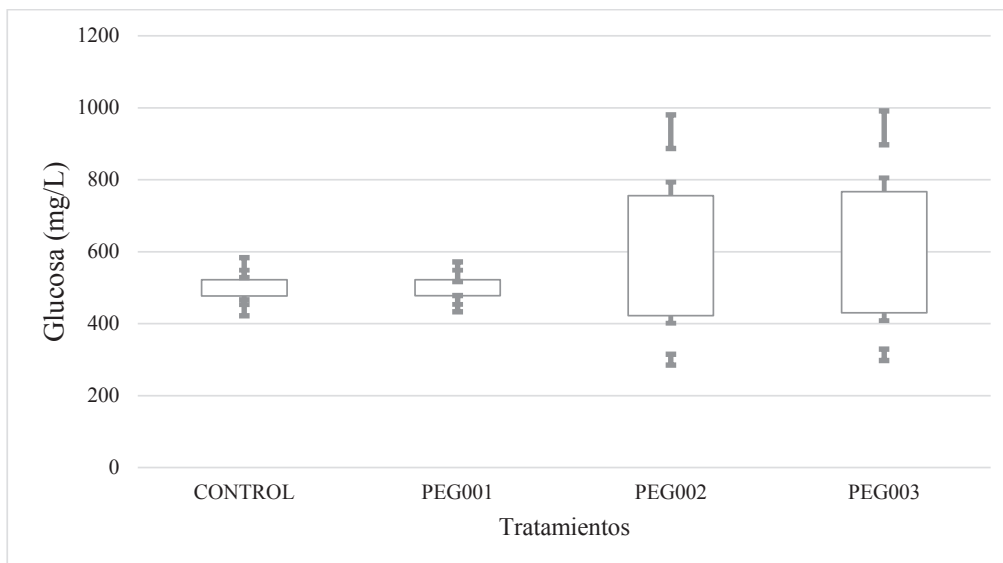


Figura 2. Medias de la evolución de glucosa en función de los pretratamientos aplicados a la cáscara de banana maduro (95% de confianza).

Fuente: Elaboración propia.

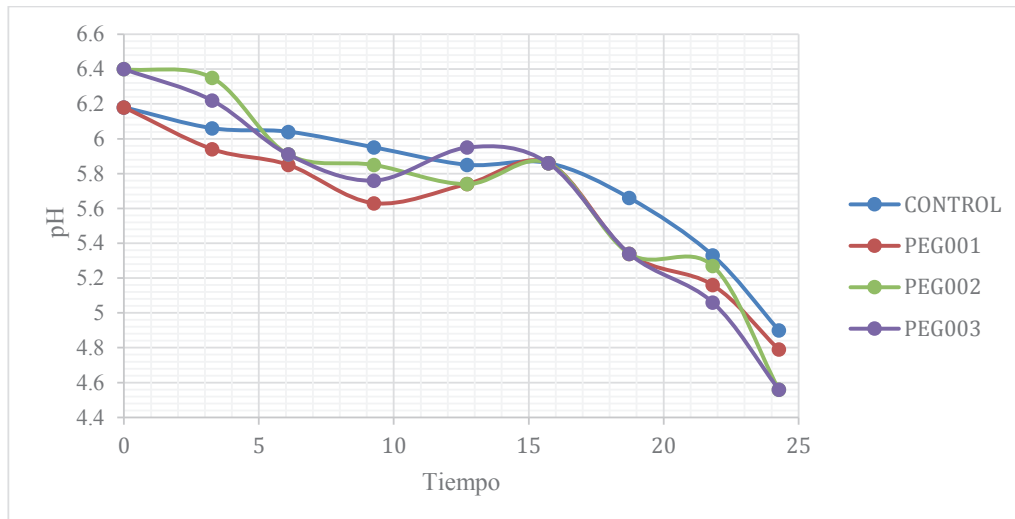


Figura 3. Variación del pH respecto al tiempo para la hidrólisis a una escala de 2 L.
Fuente: Elaboración propia.

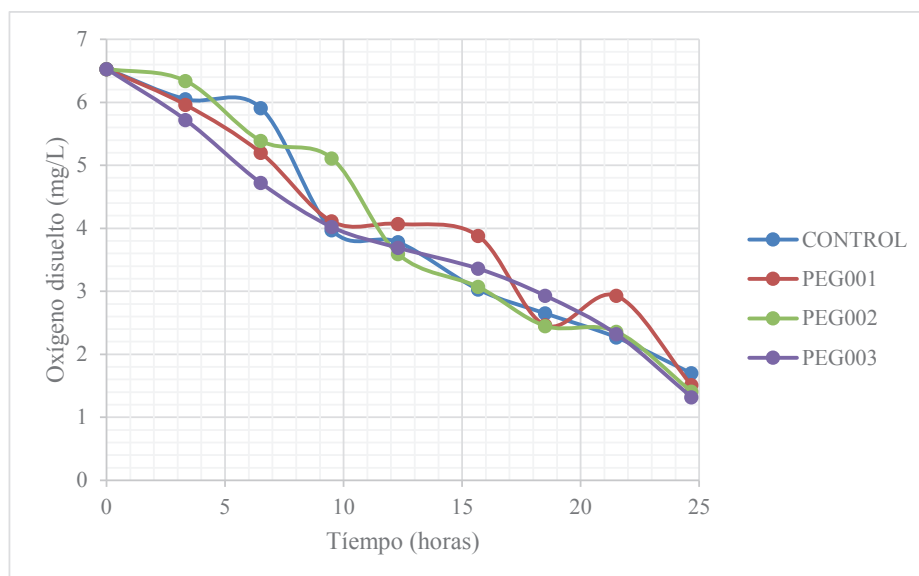


Figura 4. Disminución del oxígeno disuelto para la hidrólisis enzimática a escala de 2 L.
Fuente: Elaboración propia.

DISCUSIÓN

A partir de la Figura 1 se pudo observar que la adición de PEG con concentración de 0,02 y 0,03 g/g biomasa (PEG2 y PEG3) aumenta los rendimientos de azúcares reductores hasta valores de 895,95 ($\pm 1,9$) mg/L, lo que permitió obtener un rendimiento de alcohol del 7% v/v (Figura 5). Este rendimiento de etanol obtenido en este estudio es mayor al reportado por Benjamin, Singh, Dipuraj et al. (2014), los cuales encontraron 2,38% y 6% de etanol a los 2 y 7 días respectivamente. Estos au-

tores utilizaron 5% de cáscara en polvo, *Aspergillus niger* al 3% p/v y pH 6, desinfectada la cáscara de banana con etanol al 70%. Posteriormente, la secaron al sol durante 7 días y la fermentaron con 4% v/v de inóculo de *Saccharomyces cerevisiae*. Un estudio comparativo de costos variables se puede observar en la Tabla 3. Mayores rendimientos de etanol (59,3% p/v) han sido reportados por Boluda, García, González et al. (2010) a partir de cáscara de mandarina, pero utilizando explosión con vapor como pretratamiento de la biomasa utilizada en la fermentación alcohólica. Precisamente,

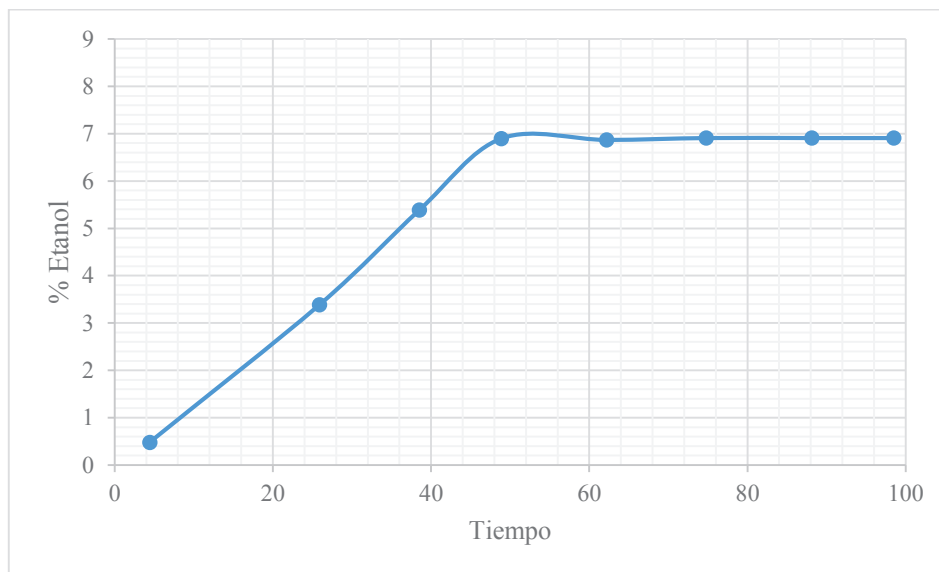


Figura 5. Cinética de la producción de bioetanol durante la fermentación alcohólica.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4. Comparación de costos variables en dólares para el proceso de obtención de etanol a partir de la hidrólisis enzimática de cáscara de banana maduro (600 g).

Método aplicado	Valor de transporte de la cáscara	Levadura	Etanol para la desinfección de la cáscara	Pasteurización	Hongo	PEG	Total \$
En este estudio	0,072	0,2	-	0,25	Trichoderma 0,05	0,08	0,65
Propuesto por Benjamin, Singh, Dipuraj et al. (2014)	0,108	0,2	0,7	-	Aspergillus 0,01	-	1,02

Fuente: Elaboración propia.

este pretratamiento tiene la desventaja de causar la generación de inhibidores que afectan el proceso de fermentación, para lo cual debe combinarse con H₂SO₄ o CO₂ para mejorar la eficiencia del proceso; además, existe el riesgo de producción de compuestos fenólicos solubles (Sánchez, Gutiérrez, Muñoz et al., 2010).

Por otra parte, con respecto al descenso del pH en función del tiempo de hidrólisis de la cáscara de banana maduro presente en los tratamientos PEG1, PEG2 y PEG3 (Figura 3), se puede manifestar que este se produce desde 6,2 a 4,9 unidades de pH en el tratamiento de control; de 6,2 a 4,8 en el tratamiento PEG1; de 6,5 a 4,6 en el tratamiento PEG2; y de 6,5 a 4,6 en el tratamiento PEG3; estabilizándose después de 18 horas de hidrólisis en todos los

tratamientos, lo cual indica que el hongo modifica el pH del medio de cultivo para su crecimiento y producción de glucosa.

Por su parte, el comportamiento del oxígeno disuelto, respecto al tiempo (Figura 4), se puede observar que decrece conforme avanza la hidrólisis enzimática, debido a que una fracción de este microorganismo lo consume como parte de la vía metabólica aeróbica.

Además, el análisis en los costos variables del pretratamiento aplicado a la cáscara de banana en la producción de etanol obtenido en este estudio, para glucosa producida a partir del mejor tratamiento aplicado (PEG3) en comparación con otros estudios, se presenta en la Tabla 4 lo siguiente.

Estos costos están calculados en dólares para cada etapa del proceso empleado, tanto en la hidrólisis enzimática como en la fermentación alcohólica, utilizando una base de cálculo de 600 g de cáscara de banano maduro (60% p/v).

Es importante mencionar que el método mencionado por Benjamin, Singh, Dipurak et al. (2014) incluye una etapa de secado de la cáscara de banano por un tiempo de 7 días, lo cual es una desventaja importante para el proceso propuesto por esos autores.

CONCLUSIONES

Se observó que el polietilenglicol (PEG) influye en la conversión de la celulosa de la cáscara de banano maduro en glucosa mediante hidrólisis enzimática. Siendo el tratamiento PEG3, el que produjo mayor cantidad de jarabe glucosado. Se encontraron diferencias significativas para la glucosa obtenida entre los tres tratamientos hidrolíticos. Los resultados demuestran que a partir de residuos lignocelulósicos de la cáscara de banano maduro, se puede obtener bioetanol, cuyo rendimiento obtenido de 7% v/v se aproxima a otros reportados en ese campo de investigación. Por otro lado, el análisis de los costos variables del pretratamiento aplicado a la cáscara de banano en la producción de etanol obtenido permite estimar que el método planteado en este estudio es menos costoso comparado con los demás, a partir del mismo residuo, con mayor rendimiento de bioetanol e incluso en menor tiempo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Abril, A. y Navarro, E. (2012). *Etanol a partir de biomasa lignocelulósica*. Recuperado de https://www.researchgate.net/profile/Enrique_Navarro/publication/241216642_Etanol_a_partir_de_biomasa_lignocelulosica/links/0c96051c8409028b93000000/Etanol-a-partir-de-biomasa-lignocelulosica.pdf
- [1] Ávila, R., Rivas, B., Hernández, R. y Chirinos, M. (2012). Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en *Agave cocui* Trelease. *Multiciencias*, 12(2), 129-135.
- [2] Benjamin, J., Singh, P., Dipuraj, P., Singh, A., Rath, S., Kumar, Y., Masih, H. y Peter, J (2014). Bio-Ethanol production from banana peel by simultaneous saccharification and fermentation process using cocultures *Aspergillus niger* and *Saccharomyces* Recuperado de [https://www.researchgate.net/profile/Yashab_Kumar/publication/307175371_Bio-Ethanol_Production_from_Banana_peel_by_Simultaneous_Saccharification_and_Fermentation_Process_using_cocultures_Aspergillus_niger_and_Saccharomyces](https://www.researchgate.net/profile/Yashab_Kumar/publication/307175371_Bio-Ethanol_Production_from_Banana_peel_by_Simultaneous_Saccharification_and_Fermentation_Process_using_cocultures_Aspergillus_niger_and_Saccharomyces_cerevisiae/links/57dcf44b08ae5292a37c902b/Bio-Ethanol-Production-from-Banana-peel-by-Simultaneous-Saccharification-and-Fermentation-Process-using-cocultures-Aspergillus-niger-and-Saccharomyces-cerevisiae.pdf)
- [3] Boluda, M., García, L., González, F., y López, A. (2010). Mandarin peel wastes pretreatment with steam explosion for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 101(10), 3506–3513.
- [4] Canseco, M., Aráoz, J., Gusils, C. y Zossi, S. (2015). Validación de metodología para determinación de azúcares reductores totales en vinos fermentados. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán*, 92(2), 33-38.
- [1] Centeno, K. (2016). *Efecto de la hidrólisis enzimática y la pasteurización sobre la calidad de una bebida fermentada a base de maíz morado (Zea mays) variedad Kulli*. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Arequipa. Recuperado de <http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/3294/IAceork02.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- [2] Conesa, C., Segui, L. y Fito, P. (2013). Sacarificación de residuos industriales de piña con mezclas de enzimas comerciales. Recuperado de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/28121/TESIS%20DE%20MASTER%20CLAUDIA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- [3] Jaramillo, O., Gómez, M. y Fontalvo, J. (2012). Remoción de los inhibidores de la fermentación etanólica usando membranas de polidimetilsiloxano (PDMS) por pervaporación. *Revista ION*, 25(1), 51-59.
- [4] Ko, J., Um, Y., Park, Y., Seo, J. y Kim, K. (2015). Compounds inhibiting the bioconversion of hydrothermally pretreated lignocellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(10), 4201–4212.
- [5] Morales, M. (2012). *Estrategia para la reconversión de una industria integrada de azúcar y derivados para la producción de etanol y coproductos a partir del bagazo* (Tesis doctoral). Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Santa Clara. Recuperado de <http://dspace.uclv.edu.cu/bitstream/handle/123456789/6707/Marlen%20>

- Morales%20Zamora%2C%202012.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- [6] Quintero, L., Martínez, Y., Velasco, J., Arévalo, A., Muñoz, Y. y Urbina, N. (2015). Evaluación de residuos de papa, yuca y naranja para la producción de etanol en cultivo discontinuo utilizando *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista ION*, 28(1), 43-53.
- [7] Romero, H., Ayala, H. y Lapo, B. (2015). Efecto de tres pre-tratamientos de cáscara de banano para la obtención de jarabe glucosado mediante hidrólisis enzimática. *Avances en Química*, 10(1), 79-82.
- [8] Saini, J., Saini, R., y Tewari, L. (2015). Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *3 Biotech*, 5(4), 337-353.
- [9] Sánchez, A., Gutiérrez, A., Muñoz, J. y Rivera, C. (2010). Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. *Revista Tumbaga*, 1(5), 61-91.
- [10] Saval, S. (2012). Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro. *BioTecnología*, 16(2), 14-46.
- [11] Silva, P. y Oliveira, S. de (2014). Exergy analysis of pretreatment processes of bioethanol production based on sugarcane bagasse. *Energy*, 76, 130-138.
- [12] Sotelo, R., Avilez, R. y Ginés-Carbajal, F. (2015). Obtención de bioetanol mediante la fermentación de jarabes obtenidos de cáscara de naranja. *Foro de Estudios sobre Guerrero*, 1(2), 589-591.
- [13] Tejeda, A., López, Z., Rojas, D., Reyna, M., Barrera, A. y Zurita, F. (2015). Eficiencia de tres sistemas de humedales híbridos para la remoción de carbamazepina. *Tecnología y ciencias del agua*, 6(6), 19-31.
- [14] Thangavelu, S., Saleh, A. y Nasir, F. (2016). Review on bioethanol as alternative fuel for spark ignition engines. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 56, 820-835.
- [15] Zhao, L., Cao, G., Wang, A., Guo, W., Ren, H. y Ren, N. (2013). Simultaneous saccharification and fermentation of fungal pretreated cornstalk for hydrogen production using *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. *Bioresource Technology*, 145, 103-107.

Kinetic study of bioethanol production from agroindustrial residues of ripe banana peel

HUGO ROMERO BONILLA¹
CINTHIA MACÍAS BALÓN²
ARACELLY PALACIOS MORENO³
FELIPE REDROVAN PESANTEZ⁴

RECEIVED: 15/01/2018 ACCEPTED: 08/02/2019

ABSTRACT

This research addresses the application of compound polyethylene glycol (PEG) of molecular weight 1500, whose objective is to degrade the inhibiting compounds present during the enzymatic hydrolysis of Cavendish variety ripe banana peels. Likewise, three experiments were conducted on 60% ground banana peel, to which PEG was added at different concentrations: 0.01; 0.02; and 0.03 g/g biomass. The enzymatic hydrolysis was performed with conidia of the *Trichoderma viride* fungus and its subsequent alcoholic fermentation with commercial active dry yeast *Saccharomyces cerevisiae*, which was previously activated. The best result corresponds to the PEG3 experiment (0.03 g/g biomass), with which a greater increase of reducing sugars was obtained. In addition, significant differences were found ($p < 0.5$) in the glucose obtained among the three hydrolytic treatments. The results show that bioethanol can be obtained from the lignocellulosic residues of ripe banana peel, whose 7% v/v yield obtained is close to others reported in the same field of study. Finally, the analysis of the variable costs of the pretreatment, applied to the banana peel for the production of the ethanol obtained, makes it possible to estimate that the method proposed in this article is less expensive compared to other procedures, demonstrating a higher bioethanol yield obtained in less time.

Keywords: Banana peel; polyethylene glycol; enzymatic hydrolysis; alcoholic fermentation; bioethanol.

INTRODUCTION

The increasing demand of petroleum-derived fuel, due to the rapid development of the automotive industry, together with environmental contamination problems, have inspired the efforts in the exploration of alternative fuels (Thangavelu, Saleh & Nasir, 2016). From this perspective, the production and consumption of renewable, sustainable and environmentally friendly energy has been fostered, through lignocellulosic biomass, which can be obtained from waste materials from agricultural activities (Conesa, Seguí & Fito, 2013). Biofuel sources are geographically distributed more evenly than fossil fuels, which make them an ideal option to meet needs in a sustainable manner. Several promoters of this energy alternative underline the increasing interest in biofuels, due to the growing uncertainty of petroleum supplies as a result of increases in demand, the decline in known reserves, the concern over global warming and greenhouse gas emissions associated with the use of fossil fuels (Saini, Saini & Tewari, 2015).

Plant substrates are composed of cellulose, hemicellulose and lignin, which were considered the raw material of the future for the production of biofuels due to their low cost and availability (Abril & Navarro, 2012). The production and use of these fuels help to minimize greenhouse gas emissions, since they are obtained from alternative energy sources. Likewise, the production of bioethanol from lignocellulosic matter involves different stages: pretreatment, hydrolysis, fermentation (Silva & Oliveira, 2014).

For these reasons, this study will use banana peel, which is an abundant source of cellulosic material. It is the external component of the banana, representing about 40% of its weight and having the potential to produce alcohol. However, chemical and biochemical processing is necessary to convert these polymers into monomeric sugars (Quintero, Martínez, Velasco *et al.*, 2015). Once in monomeric form, the sugars can be converted by fermentative microorganisms into bioethanol. However, undesir-

-
- 1 Research professor and head of the Electronics and Bioenergy Laboratory at the Universidad Técnica de Machala. Machala, Ecuador. ORCID: 0000-0002-7846-0512.
E-mail: hromero@utmachala.edu.ec
 - 2 Researcher and Chemistry Engineer at the Universidad Técnica de Machala. Machala, Ecuador.
E-mail: cmacias2@utmachala.edu.ec
 - 3 Researcher and Chemistry Engineer at the Universidad Técnica de Machala. Machala, Ecuador.
E-mail: apalacios3@utmachala.edu.ec
 - 4 Researcher and Food Engineer at the Universidad Técnica de Machala. Machala, Ecuador.
E-mail: fredrovan2@utmachala.edu.ec

able compounds are produced during pretreatment and hydrolysis, which negatively affect the yeast fermentation rate. Also, the toxicity of these compounds (called inhibitors) on microorganisms is one of the main limiting factors in the bioethanol yield during fermentation (Jaramillo, Gómez & Fontalvo, 2012). Therefore, a pretreatment must be carried out before hydrolysis in order to remove lignin, hydrolyze hemicellulose to fermentable sugars, and reduce the crystallinity of the cellulose to release glucose (Morales, 2012). This determines the yield that would be obtained after alcoholic fermentation.

In this sense, Saval (2012) states that enzymatic hydrolysis should be applied once the waste has been treated. In this way, the polymer chains are more exposed so that the generation of toxic compounds does not increase and the addition of chemical compounds is avoided. The process is carried out by the addition of cellulitic enzymes to the bioreactor (Zhao, Cao, Wang *et al.*, 2013). *Trichoderma* is used in the biotechnology industry due to its ability to produce various metabolites and its adaptation to various environmental conditions and substrates. On the other hand, the *Saccharomyces cerevisiae* yeast is frequently used in alcoholic fermentation (Sotelo, Avilez & Ginés-Carbajal, 2015), as it is a facultative anaerobic microorganism that has the ability to ferment glucose and does not present many nutrient demands. For this reason, the objective of this investigation was to hydrolyze the cellulose and hemicellulose present in ripe banana peel to reducing sugars and its subsequent alcoholic fermentation to obtain second-generation bioethanol.

METHODOLOGY

Materials

The ripe banana peels used belong to the Cavendish variety. These had been discarded from the production lines of the company Diana Food S. A., which has its processing plant in Pasaje, El Oro province, Ecuador. Likewise, Sigma-Aldrich's (Germany) polyethylene glycol with molecular weight 1500 (PEG 1500) was used. The fungus was obtained from Trichoeb, provided by Ecu Biológica (Ecuador) and dry active yeast was provided by Levapan (Ecuador).

Pretreatments

The peel was ground in order to increase its contact area with the fungus, then a heat treatment was carried out in an All American 25X sterilizer at 121°C for 15 minutes.

Experiment design

Three solutions of 60% ground banana peel were prepared; being a concentration reported by Romero, Ayala, and Lapo (2015) since this percentage of peels allows a higher concentration of hydrolyzed glucose. In order to evaluate its effect as an inhibitor in hydrolysis - since lignin and other compounds present in the lignocellulosic residues limit the hydrolysis of cellulose and hemicellulose (Ko, Um, Park *et al.*, 2015) – three different concentrations of PEG 1500, shown in Table 1, were added: PEG1 (0.01); PEG2 (0.02) and PEG3 (0.03 g/g biomass).

Table 1. Factors and levels of the experiment.

Adsorbents	PEG concentration (g PEG/g biomass)		
	[] ₁	[] ₂	[] ₃
PEG 1500	0.01	0.02	0.03

[]₁: Concentration 1; []₂: Concentration 2; []₃: Concentration 3

Source: Prepared by the authors.

Enzymatic hydrolysis

The enzymatic hydrolysis of the biomass was carried out in 2L bioreactors at 60% peel concentration, to which three different concentrations of PEG 1500 (0.01-0.03 g PEG/g biomass) were added. These had been dissolved in purified water and shaken for 5 minutes for the PEG to absorb the enzymatic hydrolysis inhibitors. Subsequently, 0.4 g/L of conidia from the *Trichoderma viride* fungus were added. It was shaken for 24 hours at 200 rpm and a sample was taken every hour. During the process, pH, °Bx (Brix degrees) and dissolved oxygen were measured, for which a portable meter was used according to the method demonstrated by Tejeda, López, Rojas *et al.* (2015).

Quantification of reducing sugars

For the glucose quantification, a hydrolyzate sample was taken in a test tube and centrifuged at 10,000 rpm for 10 min, and a 1:10 dilution was made with the supernatant. Then, 0.5 mL of the dilution and 0.5 mL of the DNS reagent were taken and placed in a test tube in a water bath at 100 °C for 5 min. In this period, 3.5 dinitrosalicylic acid was reduced by the reducing sugars that came in contact with it, causing a change in color with variations from yellow to coffee-colored (Ávila, Rivas, Hernández *et al.*, 2012). It was cooled to room temperature and 5 mL of distilled water was added. It was shaken and the reading was made at 540 nm in the Hach DR 3900 spectrophotometer (Canseco, Aráoz, Gusils *et al.*, 2015).

Experiment PEG3 (PEG 0.03 g/g husk), which was the treatment with the highest concentration of glucose, was used to perform fermentation to obtain bioethanol.

Fermentation

After the enzymatic hydrolysis of the peel, the fungus was inactivated by pasteurizing it at 90 °C for 10 min (Centeno, 2016). A volume of 1000 mL was used, the pH was controlled and 800 cfu/mL of commercial dry yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) that was previously activated was added. Also, the glucose syrup was placed in an anaerobic bioreactor, where samples were taken to measure the alcohol concentration using gas chromatography. The pH, °Bx and dissolved oxygen were measured with multiparameter equipment.

Comparative estimation of variable costs

A comparative estimation of variable costs of the saccharification process by enzymatic hydrolysis and alcoholic fermentation was conducted, for which a calculation basis of 600g of peel/L solution was assumed.

Table 2 details the costs of the supplies needed in the process:

RESULTS

Figure 1 presents the production of reducing sugars (mg/L) after the 3 treatments and a control sample during 24 hours of enzymatic hydrolysis.

In the experiment with PEG 0.03 g/g biomass reducing sugars increased by 895.95 (± 1.9) mg/L, a significant difference with respect to the other treatments, as can be seen in the Table 3, where all the p-values reached values less than 0.05.

Moreover, Figure 2 shows the effect of polyethylene glycol (PEG) added to the ground ripe banana peel at different concentrations (Table 1) in the production of glucose. It can be observed that there are significant differences between the pretreatments studied.

In turn, the variation of pH with respect to the time of enzymatic hydrolysis of ripe banana peel under the study conditions can be observed in Figure 3.

Table 2. Estimated cost of the necessary supplies for the saccharification process by enzymatic hydrolysis and alcoholic fermentation from ripe banana peel.

Dependent variable: cost	
Supplies	Cost
<i>Trichoderma</i> (inoculum for hydrolysis in this study)	\$ 0.05 per 600g of peel
Polyethylene glycol (process proposed in this study)	\$ 2.52 per 600 g of peel
Steam for pasteurization (process proposed in this study)	\$ 0.25 per kg of water vapor
Ethanol for the disinfection of the peel (process proposed in literature)	\$ 0.70 per 600 g of peel
<i>Aspergillus</i> (inoculum for hydrolysis proposed in the literature)	\$ 0.01 per 600 g of peel
<i>Saccharomyces</i>	\$ 12.00 per 600 g
Banana peel and transport	\$ 0.072

Source: Prepared by the authors.

Table 3. Variance analysis of glucose production based on the pretreatments applied to ripe banana peel.

Dependent variable: glucose					
Origin	Type III sum of squares	df	Mean square	F	Sig.
Model reviewed	1 295,110.438 ^a	31	41 777.756	2413.156	0.000
Intersection	18 604 125.563	1	18 604 125.563	1 074 606.531	0.000
Time	788 371.938	7	112 24.563	6505.390	0.000
PEGC	99 025.312	3	33 008.437	1906.625	0.000
Time * PEGC	407 713.187	21	19 414.914	1121.439	0.000
Error	554.000	32	17.313		
Total	19 899 790.000	64			
Total reviewed	1 295 664.438	63			

a. R squared = 1000 (adjusted R-squared = 0.999)

Source: Prepared by the authors.

Also, the decrease in dissolved oxygen during the hydrolysis process is shown in Figure 4.

Additionally, the behavior of bioethanol production during fermentation for a period of 4 days is observed in Figure 5.

DISCUSSION

Figure 1 shows that the addition of PEG with 0.02 and 0.03 g/g biomass concentration (PEG2 and

PEG3) increases the production of reducing sugars up to 895.95 (± 1.9) mg/L, which made it possible to achieve an alcohol yield of 7% v/v (Figure 5). The yield of ethanol obtained in this study is greater than that reported by Benjamin, Singh, Dipuraj *et al.* (2014), who found 2.38% and 6% ethanol at 2 and 7 days, respectively. These authors used 5% ground peel, *Aspergillus niger* at 3% w/v and pH 6, and disinfected the banana peel with 70% ethanol. Subsequently, it was dried in the sun for 7 days and fermented with 4% v/v of *Saccharomyces cer-*

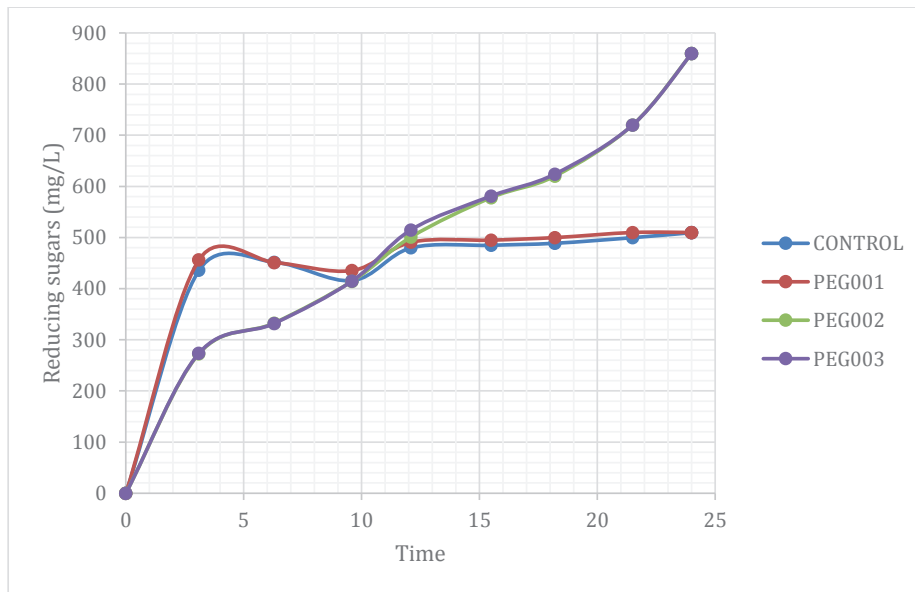


Figure 1. Kinetics of enzymatic hydrolysis for the treatments during 24 hours
Source: Prepared by the authors.

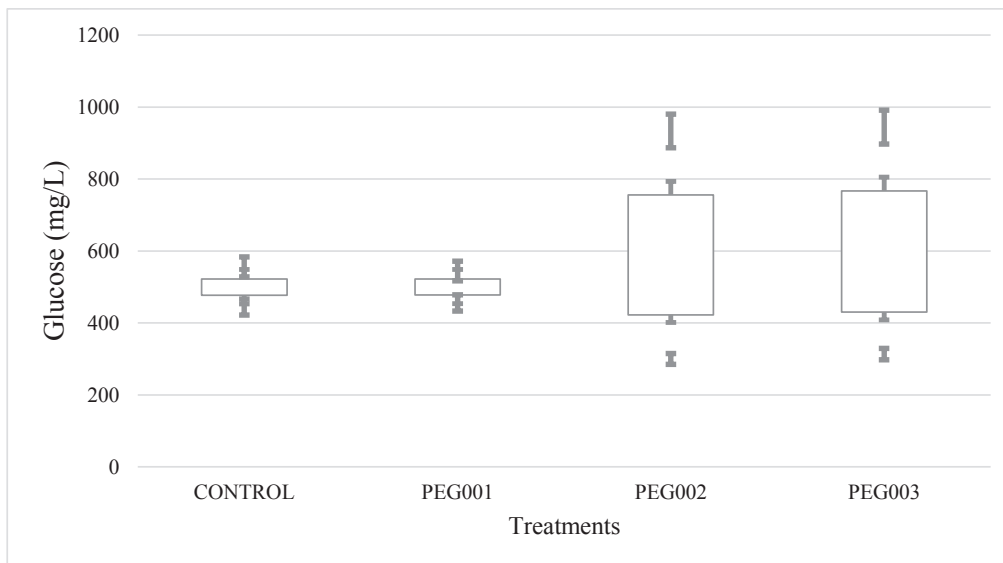


Figure 2. Average changes of glucose according to the pretreatments applied to the ripe banana peel (95% confidence).
Source: Prepared by the authors.

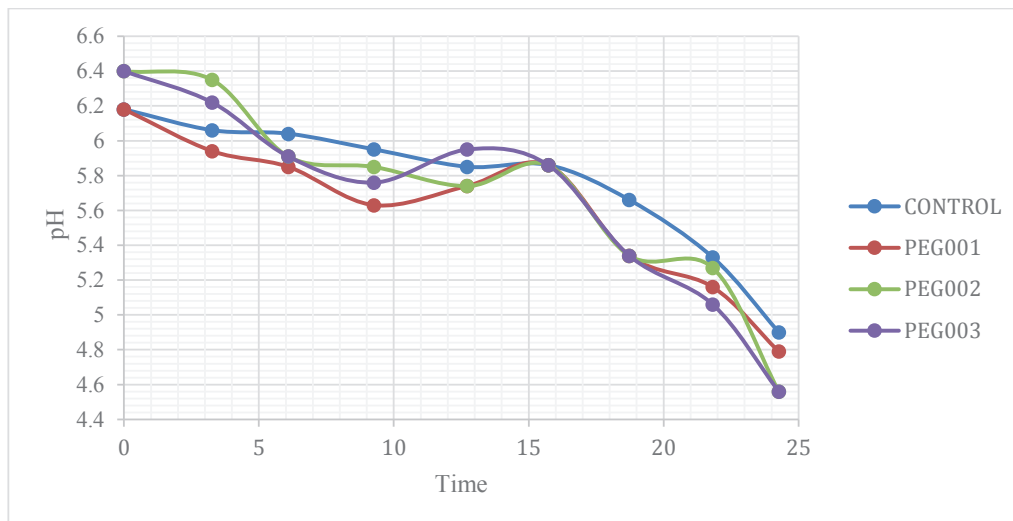


Figure 3. Variation of pH with respect to the time of hydrolysis at a scale of 2 L.

Source: Prepared by the authors.

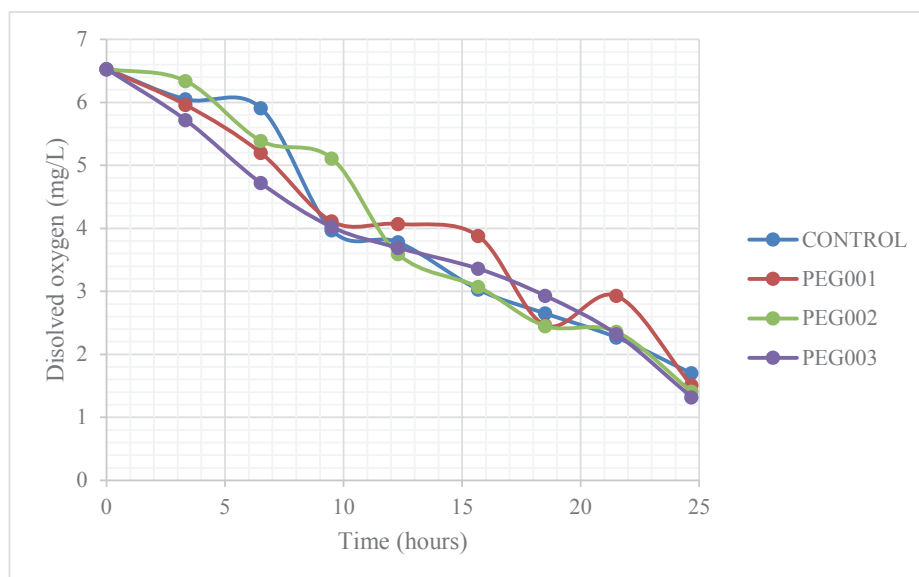


Figure 4. Decrease in dissolved oxygen of enzymatic hydrolysis at a scale of 2 L.

Source: Prepared by the authors.

evisiae inoculum. A comparative study of variable costs can be observed in Table 3. Higher ethanol yields (59.3% w/v) have been reported by Boluda, García, González *et al.* (2010) from tangerine peel, but using steam explosion as pretreatment of the biomass used in alcoholic fermentation. Precisely, this pretreatment has the disadvantage of causing the generation of inhibitors that affect the fermentation process, so it must be combined H_2SO_4 or CO_2 to improve the efficiency of the process; in addition, there is a risk of producing of soluble phenolic compounds (Sánchez, Gutiérrez, Muñoz *et al.*, 2010).

On the other hand, with respect to the decrease in pH during the hydrolysis time of the ripe banana peel in the PEG1, PEG2 and PEG3 treatments (Figure 3), it can be shown that this is produced from 6.2 to 4.9 pH units in the control treatment; from 6.2 to 4.8 in the PEG1 treatment; from 6.5 to 4.6 in the PEG2 treatment; and from 6.5 to 4.6 in the PEG3 treatment; and it is stabilized after 18 hours of hydrolysis in all treatments, which indicates that the fungus modifies the pH of the culture medium for its growth and glucose production.

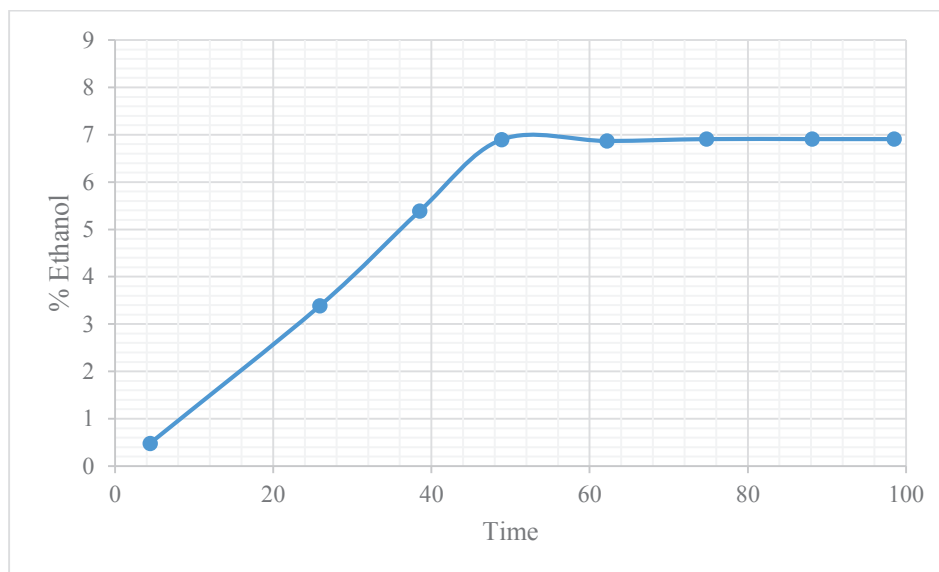


Figure 5. Kinetics of bioethanol production during alcoholic fermentation.

Source: Prepared by the authors.

Table 4. Comparison of variable costs in dollars for the process of obtaining ethanol from the enzymatic hydrolysis of ripe banana peel (600 g).

Method applied	Peel transport cost	Yeast	Ethanol for peel disinfection	Pasteurization	Fungus	PEG	Total \$
In this study	0.072	0.2	-	0.25	<i>Trichoderma</i> 0.05	0.08	0.65
Proposed by Benjamin. Singh. Dipuraj et al. (2014)	0.108	0.2	0.7	-	<i>Aspergillus</i> 0.01	-	1.02

Source: Prepared by the authors.

Regarding the behavior of dissolved oxygen with respect to time (Figure 4), a decrease can be observed as enzymatic hydrolysis progresses, since a percentage of this microorganism consumes dissolved oxygen as part of the aerobic metabolic pathway.

In addition, the analysis of the variable costs of the pretreatment applied to banana peel in the production of the ethanol obtained in this study, regarding the glucose produced from the best applied treatment (PEG3) and compared with other studies, is presented in Table 4:

These costs are calculated in dollars for each stage of the process used, both in enzymatic hydrolysis and in alcoholic fermentation, using a calculation basis of 600 g of ripe banana peel (60% w/v).

It is important to mention that the method mentioned by Benjamin, Singh, Dipurak *et al.* (2014) includes a 7-day banana peel drying stage, which is an important disadvantage for the process proposed by these authors.

CONCLUSIONS

It was observed that polyethylene glycol (PEG) influences the conversion of the ripe banana peel cellulose into glucose by enzymatic hydrolysis. PEG3 was the treatment that produced the highest amount of glucosed syrup. Significant differences were found in the glucose obtained between the three hydrolytic treatments. The results show that bioethanol can be obtained from lignocellulosic waste of ripe banana peel, whose 7% v/v yield obtained is close to others reported in this field of research. On

the other hand, the analysis of the variable costs of the pretreatment applied to the banana peel in the production of ethanol obtained make it possible to estimate that the method proposed in this study is less expensive compared to others, uses the same residues, and produces a higher yield of bioethanol in even in less time.

REFERENCES

- [1] Abril, A. & Navarro, E. (2012). *Etanol a partir de biomasa lignocelulósica*. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Enrique_Navarro/publication/241216642_Etanol_a_partir_de_biomasa_lignocelulosica/links/0c96051c8409028b93000000/Etanol-a-partir-de-biomasa-lignocelulosica.pdf
- [2] Ávila, R., Rivas, B., Hernández, R. & Chirinos, M. (2012). Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en *Agave cocui* Trelease. *Multiciencias*, 12(2), 129-135.
- [3] Benjamin, J., Singh, P., Dipuraj, P., Singh, A., Rath, S., Kumar, Y., Masih, H. & Peter, J (2014). Bio-Ethanol production from banana peel by simultaneous saccharification and fermentation process using cocultures *Aspergillus niger* and *Saccharomyces*. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Yashab_Kumar/publication/307175371_Bio-Ethanol_Production_from_Banana_peel_by_Simultaneous_Saccharification_and_Fermentation_Process_using_cocultures_Asperrgillus_niger_and_Saccharomyces_cerevisiae/links/57dcf44b08ae5292a37c902b/Bio-Ethanol-Production-from-Banana-peel-by-Simultaneous-Saccharification-and-Fermentation-Process-using-cocultures-Aspergillus-niger-and-Saccharomyces-cerevisiae.pdf
- [4] Boluda, M., García, L., González, F., & López, A. (2010). Mandarin peel wastes pretreatment with steam explosion for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 101(10), 3506–3513.
- [5] Canseco, M., Aráoz, J., Gusils, C. & Zossi, S. (2015). Validación de metodología para determinación de azúcares reductores totales en vinos fermentados. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán*, 92(2), 33-38.
- [6] Centeno, K. (2016). *Efecto de la hidrólisis enzimática y la pasteurización sobre la calidad de una bebida fermentada a base de maíz morado (Zea mays) variedad Kulli*. (Bachelor thesis). Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Arequipa. Retrieved from <http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/3294/IAceork02.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- [7] Conesa, C., Seguí, L. & Fito, P. (2013). Sacarificación de residuos industriales de piña con mezclas de enzimas comerciales. Retrieved from <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/28121/ TESIS%20DE%20MASTER%20CLAUDIA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- [8] Jaramillo, O., Gómez, M. & Fontalvo, J. (2012). Remoción de los inhibidores de la fermentación etanólica usando membranas de polidimetilsiloxano (PDMS) por pervaporación. *Revista ION*, 25(1), 51-59.
- [9] Ko, J., Um, Y., Park, Y., Seo, J. & Kim, K. (2015). Compounds inhibiting the bioconversion of hydrothermally pretreated lignocellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(10), 4201–4212.
- [10] Morales, M. (2012). *Estrategia para la reconversión de una industria integrada de azúcar y derivados para la producción de etanol y coproductos a partir del bagazo* (Doctoral thesis). Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Santa Clara. Retrieved from <http://dspace.uclv.edu.cu/bitstream/handle/123456789/6707/Marlen%20Morales%20Zamora%20C%202012.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- [11] Quintero, L., Martínez, Y., Velasco, J., Arévalo, A., Muñoz, Y. & Urbina, N. (2015). Evaluación de residuos de papa, yuca y naranja para la producción de etanol en cultivo discontinuo utilizando *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista ION*, 28(1), 43-53.
- [12] Romero, H., Ayala, H. & Lapo, B. (2015). Efecto de tres pre-tratamientos de cáscara de banano para la obtención de jarabe glucosado mediante hidrólisis enzimática. *Avances en Química*, 10(1), 79-82.
- [13] Saini, J., Saini, R., & Tewari, L. (2015). Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *3 Biotech*, 5(4), 337-353.
- [14] Sánchez, A., Gutiérrez, A., Muñoz, J. & Rivera, C. (2010). Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. *Revista Tumbaga*, 1(5), 61-91.

- [15] Saval, S. (2012). Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro. *BioTecnología*, 16(2), 14-46.
- [16] Silva, P. & Oliveira, S. de (2014). Exergy analysis of pretreatment processes of bioethanol production based on sugarcane bagasse. *Energy*, 76, 130-138.
- [17] Sotelo, R., Avilez, R. & Ginés-Carbajal, F. (2015). Obtención de bioetanol mediante la fermentación de jarabes obtenidos de cáscara de naranja. *Foro de Estudios sobre Guerrero*, 1(2), 589-591.
- [18] Tejeda, A., López, Z., Rojas, D., Reyna, M., Barrera, A. & Zurita, F. (2015). Eficiencia de tres sistemas de humedales híbridos para la remoción de carbamazepina. *Tecnología y ciencias del agua*, 6(6), 19-31.
- [19] Thangavelu, S., Saleh, A. & Nasir, F. (2016). Review on bioethanol as alternative fuel for spark ignition engines. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 56, 820-835.
- [20] Zhao, L., Cao, G., Wang, A., Guo, W., Ren, H. & Ren, N. (2013). Simultaneous saccharification and fermentation of fungal pretreated cornstalk for hydrogen production using *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. *Bioresource Technology*, 145, 103-107.