

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías

Efecto de diferentes tratamientos químicos sobre la producción de azúcares reductores y etanol en la fermentación alcohólica de la cáscara de la mazorca del cacao

María Cristina Pinos Tafur

Ingeniería Química

Trabajo de integración curricular presentado como requisito para la obtención del título de
Ingeniero Químico

Quito, 5 de diciembre de 2019

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS E INGENIERÍA

HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Efecto de diferentes tratamientos químicos sobre la producción de azúcares reductores y etanol en la fermentación alcohólica de la cáscara de la mazorca del cacao

María Cristina Pinos Tafur

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico: Daniela Almeida, Dr.- Ing.

José Álvarez, PhD.

Firma del profesor:

Firma del profesor:

Quito, 5 de diciembre de 2019

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: María Cristina Pinos Tafur

Código: 00127665

Cédula de identidad: 1718260357

Lugar y fecha: Quito, 5 de diciembre de 2019

RESUMEN

El presente estudio se realizó con la finalidad de buscar una solución a la producción de desecho de la cáscara de la mazorca del cacao, el cual es un residuo lignocelulósico que puede ser empleado para la obtención de bioetanol. Para esto se emplearon tres tipos de pretratamientos: ácido, alcalino y autohidrólisis, por un periodo de cuatro horas con la finalidad de romper la pared lignocelulósica de las fibras de la cáscara. Una vez caracterizada la biomasa pretratada, se llevó a cabo una fermentación de los licores obtenidos después de cada uno de los pretratamientos químicos.

El pretratamiento alcalino presentó mayores cambios morfológicos lo cual se atribuye al aumento del contenido de celulosa, así como a una disminución del contenido de lignina, y resultó en la concentración de azúcares reductores más alta, con 46,456 [g/L]. El pretratamiento ácido presentó menores cambios en la morfología por lo que se asume que su contenido de lignina era elevado. En la fermentación de los licores de pretratamiento, hubo una tendencia a mayor rendimiento con el pretratamiento alcalino, pero, en general las eficiencias fueron muy bajas, con hasta un 20%. Por lo tanto, es posible que se generen inhibidores de crecimiento durante los pretratamientos que estén afectando la producción de etanol en los licores de pretratamiento. En este estudio, se ha demostrado que existe la posibilidad de generar bioprocesos para la producción de etanol a través de la fermentación de la cáscara de la mazorca del cacao.

Palabras clave: biomasa lignocelulósica, bioetanol, mazorca del cacao, pretratamiento, azúcares reductores, fermentación.

ABSTRACT

The present study seeks to find a solution to the production of waste from cocoa pod husk, which is a lignocellulosic residue that can be used to obtain bioethanol. Therefore, three types of pretreatments were used: acid, alkaline and autohydrolysis, for a period of four hours in order to break the lignocellulosic wall present in the biomass. After each pretreatment the content of lignin and cellulose was determined, as well as the reducing sugars present. Once the pretreated biomass was characterized, a fermentation of the liquors obtained after each pretreatment was made.

The alkaline pretreatment presented major morphological changes which is attributed to the increase in cellulose content, as well as a decrease in lignin content, and resulted in the highest concentration of reducing sugars, with 46,456 [g / L]. The acid pretreatment presented minor changes in morphology, so it is assumed that its lignin content was high. In the fermentation of pretreatment liquors, there was a tendency to greater performance with alkaline pretreatment, but in general the efficiencies were very low, with up to 20%. Therefore, growth inhibitors may be generated during pretreatments that are affecting ethanol production in pretreatment liquors. In this study, it has been demonstrated that there is the possibility of generating bioprocesses for the production of ethanol through the fermentation of the cocoa pod husk.

Keywords: lignocellulosic biomass, bioethanol, cocoa pod husk, pretreatment, reducing sugars, fermentation.

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES.....	11
2.1 Preparación y caracterización de la biomasa.....	11
2.2 Métodos experimentales.....	12
2.2.1 Contenido de humedad.....	12
2.2.2 Contenido de cenizas.....	12
2.2.3 Contenido de grasas.....	13
2.2.4 Contenido de proteína.....	13
2.2.5 Contenido de celulosa.....	14
2.2.6 Contenido de lignina.....	15
2.3 Proceso para la obtención de bioetanol a partir de la cáscara de la mazorca del cacao 15	
2. 4 Pretratamientos químicos.....	16
2.5 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	16
2.6 Fermentación.....	17
2.7 Estimación de azúcares reductores.....	17
2.8 Cuantificación de bioetanol.....	17
2.10 Análisis estadístico.....	18
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
3.1 Caracterización de materia prima.....	18
3.2 Caracterización de biomasa pretratada.....	19
3.3 Cambios en la morfología de la cáscara del cacao después de cada pretratamiento.....	20
3.4 Azúcares reductores.....	22
3. 5 Fermentación del licor de pretratamiento.....	23
3.6 Contenido de etanol.....	25
4. CONCLUSIONES.....	27
5. REFERENCIAS.....	29

ÍNDICE DE TABLLAS

Tabla 1. Volumen y concentración de los reactivos empleados en el pretratamiento.....	16
Tabla 2. Caracterización de la cáscara de la mazorca del cacao	18

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de bloque para la obtención de etanol a partir de la cáscara de la mazorca del cacao.	16
Figura 2. Rendimiento de los pretratamientos aplicados a la biomasa de la cáscara de la mazorca del cacao fino de aroma.	20
Figura 3. Microscopia electrónica de barrido de la biomasa de la cáscara de la mazorca de cacao con aumento de 100x. Pretratamiento a) sin pretratar, y con pretratamiento b) autohidrólisis, c) ácido y d) alcalino.....	20
Figura 4. Microscopia electrónica de barrido de la biomasa de la cáscara de la mazorca de cacao con aumento de 500x. Pretratamiento a) sin pretratar y con pretratamiento b) autohidrólisis, c) ácido y d) alcalino.....	21
Figura 5. Concentración de azúcares reductores [g/L] después de cada pretratamiento.....	22
Figura 6. Porcentaje de consumo de azúcares reductores para las diferentes fermentaciones de cada pretratamiento con concentración inicial de 2 [g/L] y concentración variable, durante las primeras 24 h de fermentación.....	24
Figura 7. Porcentaje de consumo de azúcares reductores para fermentaciones con concentración variable.....	25
Figura 8. Porcentaje de consumo de azúcares reductores para fermentaciones con concentración inicial fija de 2[g/L]	25
Figura 9. Rendimiento del pretratamiento para la producción de bioetanol	26
Figura 10. Eficiencia del pretratamiento para la producción de bioetanol.....	27

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el 83% de la demanda energética mundial se ve satisfecha por la quema de combustibles fósiles; el Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático (IPCC) constató que los combustibles fósiles son los principales generadores de gases de efecto invernadero, los cuales aceleran el calentamiento global (The Intergovernmental Panel for Climate Change, 2007). Es por esta razón, que surgen los combustibles alternativos, siendo algunos de ellos: el biobutanol, el cual se obtiene por medio de organismos fermentativos como los clostridias (Pugazhendhi et al., 2019); el biodiesel a partir de desechos de aceite (Carmona-Cabello, Sáez-Bastante, Pinzi, & Dorado, 2019); el bioetanol de segunda generación, a partir de biomasa lignocelulósica (Althuri, Gujjala, & Banerjee, 2017); entre otras alternativas.

La biomasa es cualquier material orgánico derivado directa o indirectamente del proceso de fotosíntesis de plantas y algas, excepto los materiales fosilizados (da Silva et al., 2018). Las principales fuentes de biomasa lignocelulósica son residuos agrícolas, madera y cultivos energéticos. Esta biomasa se encuentra compuesta, principalmente, por celulosa (35-50%), hemicelulosa (20-35%), lignina (10-25%), y, en menor cantidad, se encuentran proteínas, aceites y cenizas (Wei, Yingting, Jingjing, Wenshi, & Junhong, 2017). Sin embargo, la biomasa lignocelulósica posee una estructura compleja, debido a que la celulosa se encuentra envuelta en una matriz de hemicelulosa, que a su vez está rodeada de paredes de lignina, siendo esta última una macromolécula muy compleja y rica en subunidades aromáticas (de Barros, Becarelli, de Oliveira, Tognotti, & Bon, 2019).

Estudios han demostrado que la implementación de un pretratamiento a la biomasa es un aspecto importante al momento de descomponer la estructura de la lignina, eliminar la hemicelulosa, reducir la cristalinidad de la celulosa y aumentar el área superficial disponible para que enzimas y microorganismos actúen (Mosier et al., 2005). Los pretratamientos se

clasifican en físicos, fisicoquímicos, químicos y biológicos; estos tipos de pretratamientos pueden combinarse con la finalidad de aumentar el rendimiento y productividad del producto deseado (Solarte-Toro, Romero-García, & Martínez-Patiño, 2019).

Un pretratamiento biológico comúnmente empleado a la biomasa lignocelulósica, es la hidrólisis enzimática, debido a que genera una liberación de azúcares, los cuales más tarde serán transformados en etanol gracias a una fermentación (Lee, Kim, Ko, Woo, & Um, 2016). Sin embargo, la estructura de la lignocelulosa al ser muy compleja genera rendimientos bajos. Es por esta razón que se han empleado, previamente a la hidrólisis enzimática, pretratamientos ácidos y básicos para remover la lignina y disminuir la cristalinidad de la hemicelulosa (Wei et al., 2017).

La producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos es un tema de investigación actual. Entre las fuentes más estudiadas se encuentran el bagazo de caña de azúcar (Huang et al., 2015), desechos de frutas y fracciones insolubles en agua de la paja de azúcar (Diaz et al., 2015), empleando la levadura industrial *Saccharomyces cerevisiae* para la fermentación alcohólica (Hama, Kihara, Noda, & Kondo, 2018).

Por otra parte, otras fuentes menos convencionales han sido también exploradas. Se evaluó el potencial de producción de etanol a partir del sorgo dulce, la cual es una planta con un gran contenido de azúcares, corto periodo de crecimiento y buena tolerancia a las condiciones naturales. En dicho estudio se llegó a la conclusión que en 49.65 millones hectáreas en China, se podrían sembrar sorgo para la producción de 847.81 mil toneladas de etanol (Jiang, Hao, Fu, Liu, & Yan, 2019).

Una fuente lignocelulósica no convencional está representada por los desechos de la cáscara de la mazorca del cacao. Uno de los principales productos de exportación, en Ecuador, son los granos de cacao. En el año 2015 se exportaron 236.677 mil toneladas métricas de grano de cacao, donde el 47% corresponde al cacao fino de aroma A.S.E (Asociación Nacional

de Exportadores de Cacao, 2016). Además, se ha estudiado la producción de bioetanol a partir de la cáscara de la mazorca del cacao CCN-51 al variar el tiempo de pretratamientos ácidos y básicos de 1, 4 y 6 horas, con la finalidad de obtener el tiempo óptimo de pretratamiento para transformar los polisacáridos presentes en la lignocelulosa, en azúcares y, así, obtener un mayor porcentaje de etanol durante la fermentación alcohólica (Benalcázar, 2018).

Durante el año 2017, en Ecuador se produjeron 200 mil toneladas de cacao en grano (FAO, 2019). Usualmente los desechos del cacao son usados como abono orgánico; no obstante, no existe estudio alguno que demuestre la capacidad fertilizante de la cáscara de la mazorca del cacao. También se ha utilizado para balanceado animal, pero la mazorca posee teobromina el cual es un alcaloide hepatotóxico y puede ser perjudicial para la salud de los animales (Ardila & Carreño, 2011). Por esta razón, la cáscara de la mazorca del cacao al ser un residuo agrícola muy abundante puede ser empleado como una fuente de gran importancia para la producción de bioetanol.

Por lo que en esta investigación se busca evaluar los efectos de diferentes pretratamientos químicos, ácidos y básicos, y enzimáticos sobre la producción de azúcares reductores y etanol en diferentes etapas de la fermentación alcohólica de desechos de la cáscara de la mazorca del cacao.

2. MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

2.1 Preparación y caracterización de la biomasa

Se empleó la cáscara de mazorca del cacao fino de aroma, la cual fue cortada en un tamaño aproximadamente de $1 \times 1 \text{ cm}^2$, para luego secarla a 60°C hasta que su peso se mantenga constante. Luego de moler y tamizar la muestra seca se recolectó la muestra con tamaño de partícula entre 150 y $600 \mu\text{m}$ para los siguientes experimentos.

2.2 Métodos experimentales

2.2.1 Contenido de humedad

Para determinar el contenido de humedad, colocó 1 g de muestra triturada en crisoles previamente secados y pesados. Una vez colocada la muestra en los crisoles, se los secó a 105°C, hasta que su peso sea constante y, así, evaporar el agua presente en la muestra (AOAC, 1990). Finalmente, se pesó los crisoles y se determinó el contenido de humedad mediante la ecuación (1).

$$\%Humedad = \left[\frac{M_f - M_c}{M_i - M_c} \right] \times 100\% \quad (1)$$

Donde:

M_f : Peso del crisol con muestra seca [g]

M_i : Peso del crisol con muestra inicial [g]

M_c : Peso del crisol seco y vacío [g]

2.2.2 Contenido de cenizas

Para la determinación de contenido de cenizas se pesó 1g de muestra triturada en crisoles previamente secados y pesados. Luego, estos fueron colocados en la estufa a 105°C por un periodo de 5 horas, con la finalidad de remover el agua presente en la muestra. Como consiguiente, se colocó la muestra secada en la mufla a 540°C por 5 horas, para así eliminar la materia orgánica presente (AOAC, 1990). Finalmente se pesaron los crisoles y se determinó el contenido de cenizas por medio de la ecuación (2).

$$\%Cenizas = \left[\frac{M_f - M_c}{M_i - M_c} \right] \times 100\% \quad (2)$$

Donde:

M_f : Peso del crisol con muestra calcinada [g]

M_c : Peso del crisol seco y vacío [g]

M_i : Peso del crisol con la muestra inicial [g]

2.2.3 Contenido de grasas

Para la determinación de grasas se empleó el método Soxhlet, el cual es un método de extracción sólido-líquido que posee tres procesos físicos: vaporización, condensación y extracción (AOAC, 2002).

Para determinar el contenido de grasas se pesó 1g de la muestra seca en un cartucho de celulosa, el cual fue introducido en el Extractor de solventes Velp Scientifica SER 148. Por otro lado, se pesó el vaso de precipitación y se agregaron 60mL de hexano, que fue utilizado como solvente. Una vez finalizada la extracción, se colocó la muestra en el horno por 24 horas para eliminar el residuo de hexano presente. Finalmente, se determinó la cantidad de grasa por medio de la ecuación (3).

$$\%Grasas = \left[\frac{M_f}{M_i} \right] \times 100\% \quad (3)$$

Donde:

M_f : Peso residuo de grasa y vaso de precipitación [g]

M_v : Peso vaso de precipitación vacío [g]

M_i : Peso inicial de la muestra [g]

2.2.4 Contenido de proteína

Para determinar la cantidad de proteínas y nitrógeno presente en la muestra, se empleó el método Kjeldahl (AOAC, 2002), el cual se llevó a cabo un digestor DK6 VLEP Scientifica y una unidad destilación semiautomática UDK 139. Inicialmente, se pesó 0.5g de la muestra seca, se añadió 12mL de ácido sulfúrico concentrado y se agregaron 2 pastillas catalizadoras, de sulfato de potasio (K_2SO_4) y sulfato de cobre ($CuSO_4$). Esto se llevó a una digestión hasta que la muestra se tornó de un color verde azulado. Se dejó enfriar la muestra y en un Erlenmeyer de 250mL se colocaron 25mL de ácido bórico (H_3BO_3) al 4%. A continuación, se destiló la muestra con ayuda de la unidad de destilación automática, donde se dosificaron 50mL de agua y 50mL de hidróxido de sodio (NaOH) al 35%. Finalmente, se tituló con ácido

clorhídrico (HCl) 0.209 N utilizando el indicador “Tashiro” hasta que se obtuvo un cambio de color verde a fucsia fuerte (AOAC, 1990). Para determinar el contenido de nitrógeno se empleó la ecuación (4).

$$\%Nitrógeno = \left[\frac{V_{HCl} * N_{HCl} * W_{N_2}}{M_{muestra}} \right] \times 100\% \quad (4)$$

Donde:

V_{HCl} : Volumen de ácido clorhídrico empleado para titular la muestra [mL]

N_{HCl} : Concentración normal de ácido clorhídrico [N]

W_{N_2} : Peso molecular del nitrógeno $\left[\frac{g}{mol} \right]$

$M_{muestra}$: Peso inicial de la muestra [mg]

Por otra parte, para determinar el contenido de proteína, se aplicó el factor un factor de 6.25, el cual considera que las proteínas poseen un 16% del peso de nitrógeno (ExpotechUSA., n.d.). Por lo tanto, se empleó la ecuación (5) para determinar el contenido de proteína.

$$\%Proteína = \%Nitrógeno * 6.25 \quad (5)$$

2.2.5 Contenido de celulosa

Para determinar el contenido de celulosa presente en la biomasa, se colocó 1g de muestra en un balón de 250 ml y agregaron 15mL de ácido acético al 80% junto con 1.5mL de ácido nítrico al 68%. Se colocó, al balón, durante 20 minutos en reflujo. A continuación, se realizó una filtración con agua caliente y pequeñas cantidades de etanol. Como siguiente paso, se colocó la muestra en crisoles y se la secó en la estufa a 105°C por 24 horas. Se dejó enfriar la muestra, se la pesó y se la colocó en la mufla por 5 horas a 540°C (Domínguez, Álvarez, Granados, & Hernández, 2012). Finalmente, se determinó el contenido de celulosa por medio de la ecuación (6).

$$\%Celulosa = \left[\frac{M_f - M_c}{M_i} \right] \times 100\% \quad (6)$$

Donde:

M_f : Peso muestra secada [g]

M_c : Peso muestra calcinada [g]

M_i : Peso muestra inicial [g]

2.2.6 Contenido de lignina

Para determinar lignina, se pesó 1g de muestra seca, se agregaron 15mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 72% y se agitó por 2 horas. A continuación, en un balón de 250mL con reflujo, se colocó, durante 4 horas, la muestra con ácido sulfúrico y se agregaron 125mL de agua destilada. Finalmente, se filtró, se lavó la muestra con agua caliente y se dejó secar en el horno a 105°C por 3 horas (AOAC, 1990). Se determinó el contenido de lignina por medio de la ecuación (7).

$$\%Lignina = \left[\frac{M_f}{M_i} \right] \times 100\% \quad (7)$$

Donde:

M_f : Peso muestra secada [g]

M_i : Peso muestra inicial [g]

2.3 Proceso para la obtención de bioetanol a partir de la cáscara de la mazorca del cacao

En la **Figura 1** se presenta el diagrama de bloque para el proceso de obtención de bioetanol a partir de la cáscara de la mazorca del cacao. Sin embargo, en las siguientes secciones se describe de manera detallada las condiciones de cada etapa del proceso.

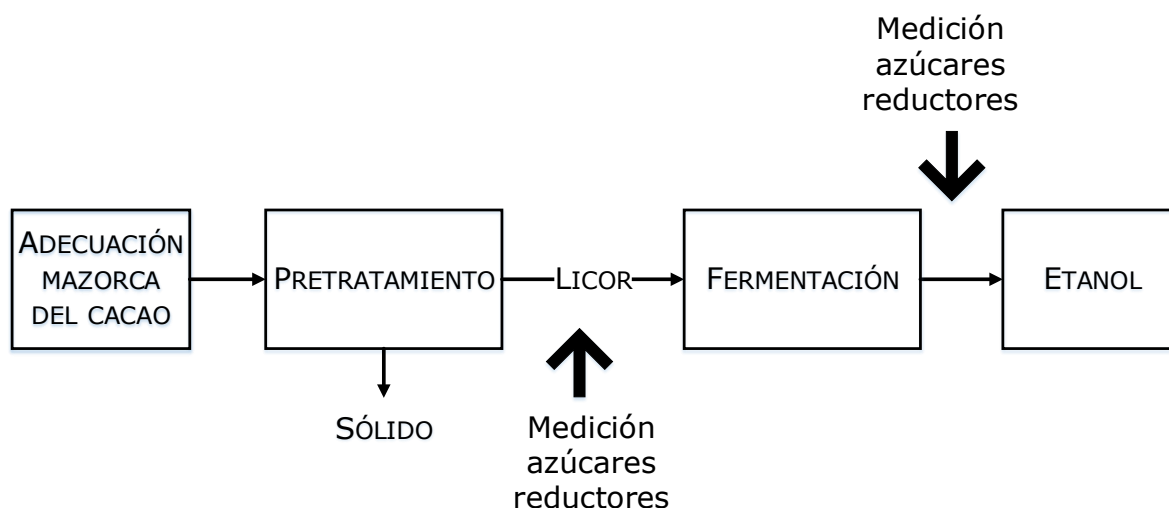


Figura 1. Diagrama de bloque para la obtención de etanol a partir de la cáscara de la mazorca del cacao.

2. 4 Pretratamientos químicos

Para cada pretratamiento se pretrató 1g de muestra seca por cada 15mL de solución durante 4 horas a 100°C con reflujo (Benalcázar, 2018). En la Tabla 1 se presentan las concentraciones y volúmenes de cada compuesto empleados durante los diferentes pretratamientos.

Tabla 1. Volumen y concentración de los reactivos empleados en el pretratamiento

Variable	Alcalino	Ácido	Autohidrólisis
Volumen por 1 g de muestra	15 ml	15 ml	15 ml
Concentración	2%	2%	-

Para el pretratamiento alcalino se empleó hidróxido de sodio, para el pretratamiento ácido se utilizó ácido sulfúrico y la autohidrólisis se realizó el pretratamiento con agua destilada.

2.5 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las biomásas sin tratar y pretratadas fueron analizadas con el microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-IT300 a 50Pa y 20kV, con magnificaciones de 100x y 500x, usando el programa MP-96040EXCS External Control Software para el procesamiento de imágenes.

2.6 Fermentación

En un tubo cónico de 50mL, previamente autoclavado, se colocó 30mL del licor obtenido después de cada pretratamiento. Se agregaron 8g de levadura *Saccharomyces cerevisiae* RC212 por cada litro de licor y se la activó a 30°C por 20 minutos. Con ayuda de algodón, gasa y manguera se realizó un tapón el cual con ayuda de hidróxido de sodio al 2% serviría de trampa del CO_2 producido durante la fermentación. El cultivo se llevó a cabo en una incubadora microbiológica a 30°C por 72 horas (Benalcázar, 2018). Finalmente se tomaron 2 mL de muestra de cada uno de los fermentados después de 24, 48 y 72 horas.

2.7 Estimación de azúcares reductores

Para la determinación de azúcares se empleó ácido 3,5 dinitro salicílico (DNS) al 1%, el cual se colocó 1mL en un tubo de ensayo, junto con 5mL de agua destilada y 1mL de la muestra diluida. Con ayuda de un Vortex se homogenizó la muestra y se incubó la muestra a 100°C durante 5 minutos (Bernfeld, 1955). Finalmente, se midió por medio de colorimetría, con ayuda del equipo Hach Colorimeter DR/870.

2.8 Cuantificación de bioetanol

Para la medición de etanol obtenido después de cada fermentación, inicialmente, centrifugó y filtró la muestra para luego realizar una extracción líquido-líquido con diclorometano, donde se empleó una relación de 2:1, es decir, se emplearon 2ml de diclorometano por cada mililitro de muestra. Se extrajo la fase orgánica y se agregó propanol, como estándar interno, en una relación de 25:2. Finalmente, se empleó el equipo GCMS-QP2010 y se llegó a determinar el porcentaje de bioetanol, al relacionar las áreas entre el etanol y el estándar interno.

Mientras que el rendimiento se definió como los gramos de EtOH dividido para los gramos de glucosa, ecuación (8).

$$\text{Rendimiento}\% = \frac{g \text{ EtOH}}{g \text{ glucosa}} \times 100\% \quad (8)$$

Finalmente, se definió eficiencia como las moles de EtOH obtenidas durante la fermentación para las moles máximas de EtOH que teóricamente se podría llegar a obtener, ecuación (9).

$$\text{Eficiencia}\% = \frac{\text{mol EtOH}}{\text{mol máx teórico EtOH}} \quad (9)$$

2.10 Análisis estadístico

Todos los análisis y experimentos se realizaron por triplicados (n=3). Los resultados se reportan como el promedio \pm desviación estándar. Con ayuda del software Minitab, se realizó análisis de varianza (ANOVA) y se aplicó el método de Tukey para comparación por pares, con 95% de confianza (p<0,05).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización de materia prima

Inicialmente, se realizó una caracterización a la cáscara de la mazorca del cacao; los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Caracterización de la cáscara de la mazorca del cacao

Parámetro	Caracterización	
	Promedio [%]	Desviación estándar [%]
Celulosa	20,039*	0,732
Lignina	23,154*	0,000
Humedad	13,002	1,325
Cenizas	8,517*	1,115
Grasas	0,246*	0,038
Nitrógeno	0,100*	0,003
Proteína	0,628*	0,022

*Base seca

Por otra parte, Campos-Vega reportó los rangos de composición de la cáscara de la mazorca del cacao, donde el contenido de humedad se encuentra entre 6,4–14,1%, contenido proteínas está entre 2,1–9,1 %, cenizas se encuentra entre 5,8–13,0%, y el contenido de lignina

es de 14,7–38,8% (Campos-Vega, Nieto-Figueroa, & Oomah, 2018). Al comparar los resultados obtenidos por los propuestos por Campos-Vega, es posible observar que los resultados obtenidos durante esta investigación se encuentran dentro de los rangos propuestos por Campos-Vega, a excepción del contenido de proteína.

Por otra parte, al comparar los resultados obtenidos, con los resultados presentados en el proyecto de investigación de José Benalcázar, se observan variaciones en cuanto al porcentaje de humedad ($91,55 \pm 0,84$)%, lignina ($46,61 \pm 2,89$)%, nitrógeno ($0,66 \pm 0,01$)%, y proteína ($4,12 \pm 0,04$)% (Benalcázar, 2018). Las diferencias en cuanto a los resultados obtenidos en ambas investigaciones pueden deberse a la variación de cacao que se usó, siendo cacao CCN-51 el empleado durante el proyecto de investigación de José Benalcázar y cacao fino de aroma se empleó en esta investigación. Otros factores que afectan significativamente a la composición de la biomasa son la región de crecimiento de la planta, irrigación, fertilizantes empleados, transporte, almacenamiento, suelo, entre otros factores (Han & Bao, 2018). De igual manera, otro factor que pudo haber afectado al momento de la determinación del contenido de humedad fue el estado de madurez de la cáscara de la mazorca, ya que esta se encontraba ligeramente madura.

3.2 Caracterización de biomasa pretratada

Inicialmente, se determinó el rendimiento de cada una de las biomásas después de cada pretratamiento; dichos resultados se presentan en la Figura 2. Se puede observar que después del pretratamiento alcalino se obtiene un rendimiento de ($46,570 \pm 6,947$)% siendo el más bajo. Para el pretratamiento de autohidrólisis se obtuvo ($94,908 \pm 2,502$)%. Finalmente, el rendimiento del pretratamiento ácido fue ($54,469 \pm 0,910$)%.

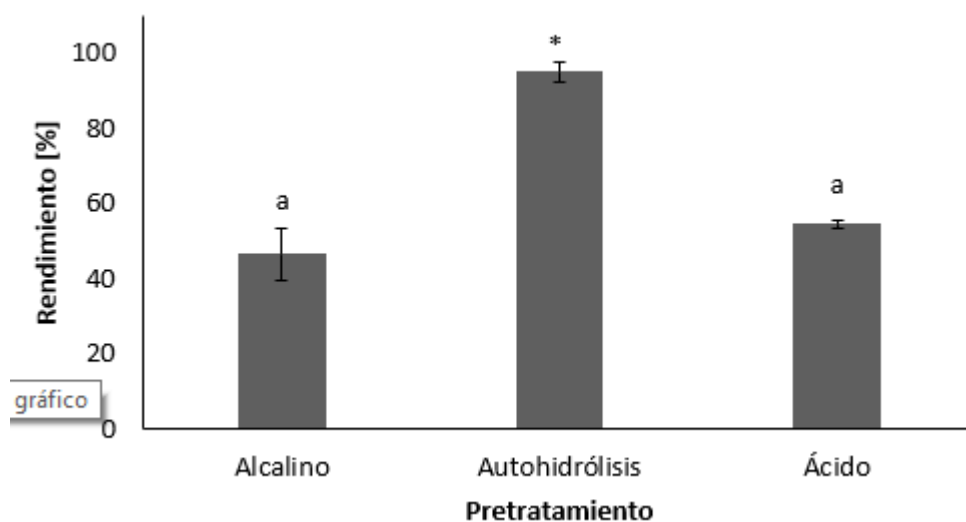


Figura 2. Rendimiento de los pretratamientos aplicados a la biomasa de la cáscara de la mazorca del cacao fino de aroma.

(*) Representa cantidad máxima del rendimiento de los pretratamientos, ($p < 0,05$).

(a) Los pretratamientos con las mismas letras no presentan diferencias estadísticamente significativas.

3.3 Cambios en la morfología de la cáscara del cacao después de cada pretratamiento

Los cambios presentados en la morfología de la biomasa después de cada pretratamiento se observaron por medio de microscopía electrónica de barrido. Las Figura 3 y Figura 4 muestran las micrografías del análisis.

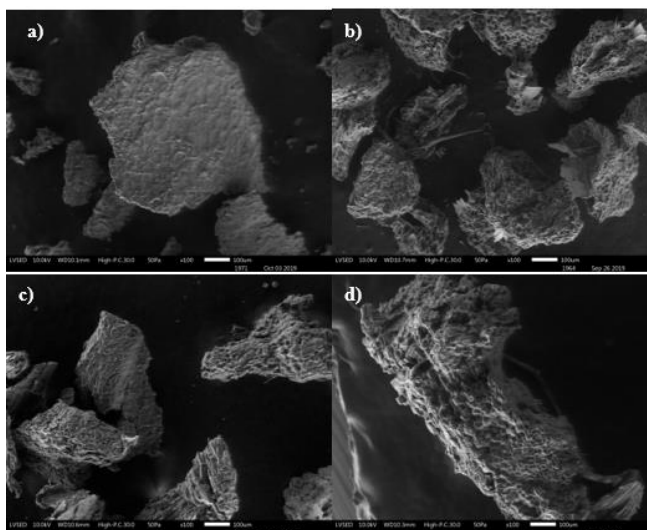


Figura 3. Microscopía electrónica de barrido de la biomasa de la cáscara de la mazorca de cacao con aumento de 100x. Pretratamiento a) sin pretratar, y con pretratamiento b) autohidrólisis, c) ácido y d) alcalino.

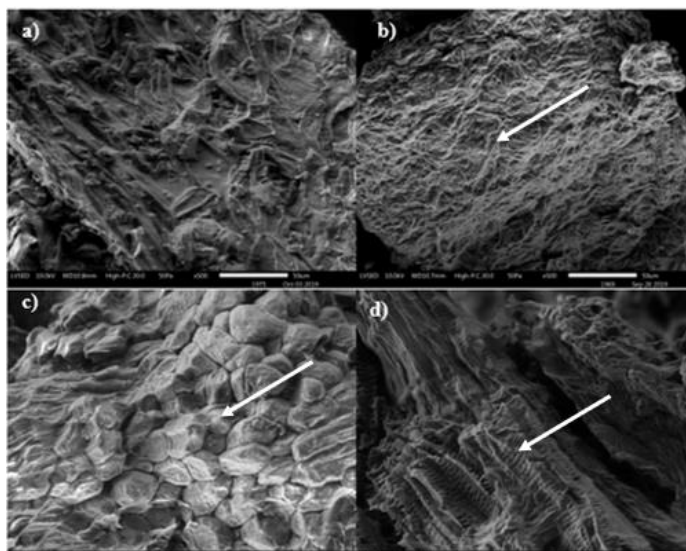


Figura 4. Microscopía electrónica de barrido de la biomasa de la cáscara de la mazorca de cacao con aumento de 500x. Pretratamiento a) sin pretratar y con pretratamiento b) autohidrólisis, c) ácido y d) alcalino

En la Figura 4, las flechas representan la degradación de la biomasa debido a cada uno de los pretratamientos. Se puede observar que la biomasa de la cáscara de la mazorca del cacao no es porosa, mientras que la biomasa después del pretratamiento alcalino posee una mayor porosidad y degradación, que puede deberse a la remoción de lignina. Por otra parte, se puede observar que el pretratamiento ácido genera una leve degradación en cuanto a la estructura de la biomasa. Finalmente, la biomasa del pretratamiento de autohidrólisis posee una mayor rugosidad con respecto a la biomasa sin pretratar, pero no con respecto a los pretratamientos ácido y alcalino.

De acuerdo a estudios realizados en el bagazo de la caña de azúcar, el pretratamiento alcalino permite que la enzima, durante la hidrólisis enzimática, pueda acceder con mayor facilidad a la celulosa y hemicelulosa para su degradación; por lo que, en la estructura de la biomasa del pretratamiento alcalino, los cambios morfológicos son aumento en el área de superficie externa y aumento en la porosidad. Por otra parte, se debe tener en cuenta que durante el pretratamiento alcalino también se podría disolver parte de la hemicelulosa, lo cual a su vez disminuye el contenido de xilano en el material lignocelulósico (Lin, Lee, Duan, & Lin, 2013).

Benalcázar llegó a observar los mismos cambios antes y después de cada pretratamiento, siendo de igual manera el pretratamiento alcalino el que mayor porosidad y rigidez llegó a presentar (2018). Por lo tanto, se puede concluir que cada uno de los pretratamientos está removiendo la lignina presente en la cáscara de la mazorca del cacao y la celulosa presente está siendo liberada.

3.4 Azúcares reductores

Una vez finalizado el proceso de pretratamiento se determinó la concentración de azúcares reductores [g/L] presentes en los licores obtenidos. En la Figura 5 se puede observar que, después del pretratamiento alcalino se obtuvo la concentración de azúcares más alta, la cual fue de $(46,456 \pm 1,981)$ [g/L].

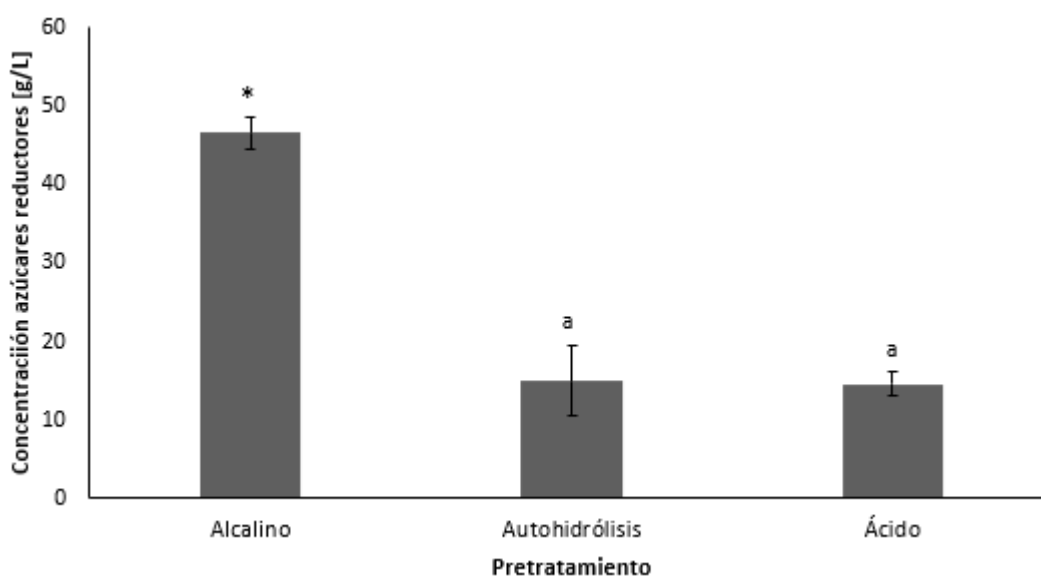


Figura 5. Concentración de azúcares reductores [g/L] después de cada pretratamiento (*) Representa cantidad máxima de concentración de azúcares reductores [g/L] de los pretratamientos, ($p < 0,05$).

(a) Los pretratamientos con las mismas letras no presentan diferencias estadísticamente significativas.

El análisis estadístico determinó que la concentración de azúcares reductores es estadísticamente significativa después de cada pretratamiento. De igual manera, se pudo observar que dicha concentración es mayor después del pretratamiento alcalino, mientras que los pretratamientos ácidos son estadísticamente iguales.

La concentración de azúcares reductores tan baja en la biomasa pretratada con ácido puede ser a causa de inhibidores de crecimiento, como el hidroximetilfurfural (HMF) y el compuesto furfural, los cuales se generan después de los pretratamientos, tanto ácidos como básicos, debido a la degradación de pentosas y hexosas (Singh, Kumar, Yadav, & Datta, 2019). Por otra parte, como se mencionó con anterioridad, el pretratamiento alcalino tiende a aumentar el área superficial de la celulosa, lo cual permite que se produzca un contacto directo entre la enzima celulasa y la superficie de celulosa (Cruz, Santiago, Braz, Selegim, & Crnkovic, 2018), es por este motivo que después del pretratamiento alcalino la concentración de azúcares reductores es mayor que en comparación a los otros dos pretratamientos.

3. 5 Fermentación del licor de pretratamiento

Se realizaron dos tipos de fermentaciones con los licores obtenidos de cada uno de los pretratamientos. El primero se realizó con una concentración variable de azúcares reductores, mientras que la segunda fermentación se igualaron todas las concentraciones de los licores a 2 [g/L] de azúcar, esta última se llevó a cabo para determinar la presencia de agentes inhibidores. En la Figura 6, se presentan los datos obtenidos para las fermentaciones, después de 24 horas, con concentración variable, así como los resultados obtenidos para las fermentaciones con una concentración inicial de 2 [g/L] de azúcar.

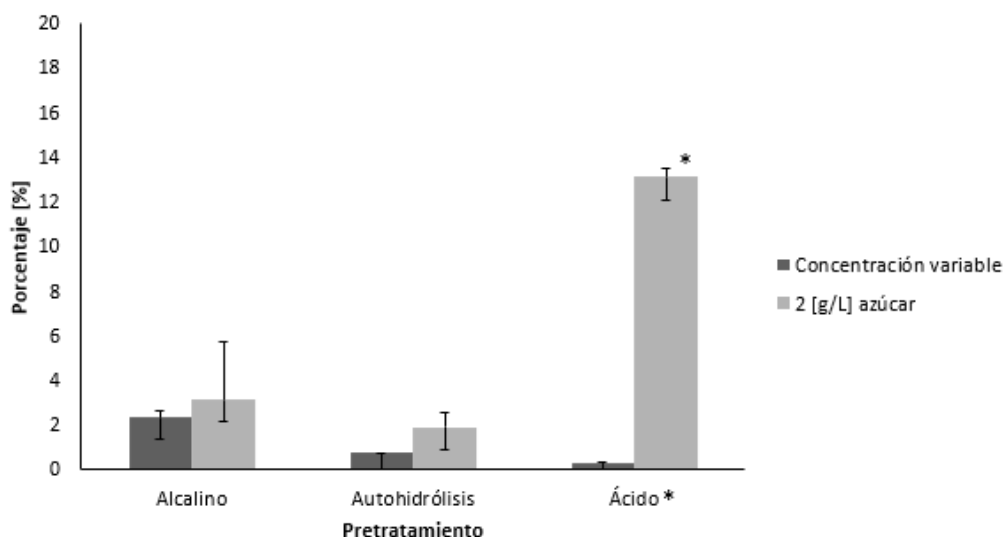


Figura 6. Porcentaje de consumo de azúcares reductores para las diferentes fermentaciones de cada pretratamiento con concentración inicial de 2 [g/L] y concentración variable, durante las primeras 24 h de fermentación

(*) Representa cantidad máxima de concentración de azúcares reductores [g/L] de los pretratamientos, ($p < 0,05$).

Al realizar los análisis estadísticos se pudo observar que existe una diferencia significativa en la concentración inicial de azúcares reductores, siendo estadísticamente mayor la concentración para las fermentaciones que inicialmente tuvieron una concentración de 2 [g/L]. Por otro lado, se pudo determinar que después de 72 horas de fermentación todavía hay una pequeña cantidad de azúcares reductores, similar a la cantidad presente durante 48 horas de fermentación.

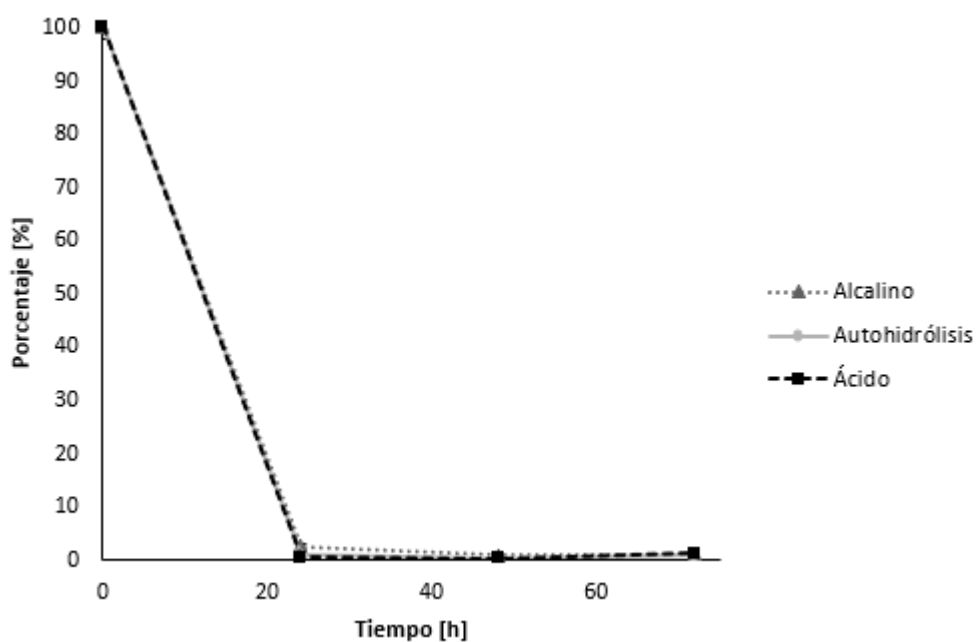


Figura 7. Porcentaje de consumo de azúcares reductores para fermentaciones con concentración variable

Por medio de la Figura 7 es posible observar cómo se da el cambio en el porcentaje de azúcares reductores durante las primeras 24 horas, mientras que después de 48 y 72 horas de fermentación el porcentaje de azúcares reductores ha disminuido, pero no por completo. Huang et al. Observaron una disminución veloz durante las primeras horas de fermentación, sin embargo después de 96 horas se agotó la glucosa presente (2015).

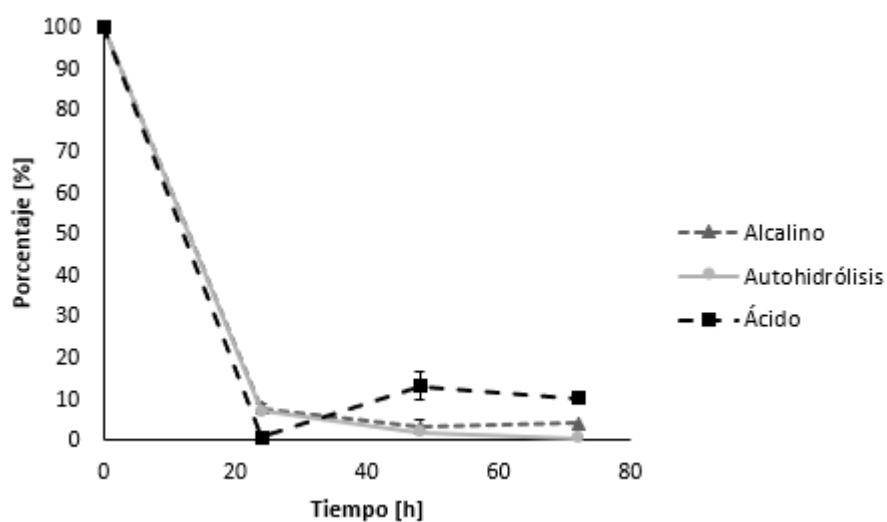


Figura 8. Porcentaje de consumo de azúcares reductores para fermentaciones con concentración inicial fija de 2[g/L]

3.6 Contenido de etanol

En cuanto al rendimiento de cada una de las fermentaciones, Figura 9, se observa que el rendimiento del pretratamiento ácido, con una concentración inicial de 2 [g/L] de azúcares reductores, es de $(31,607 \pm 0,341)\%$, siendo el menor de todos. Esto puede deberse a que los pretratamientos ácidos tienden a degradar azúcares, lo que a su vez produce compuestos inhibidores como cetonas, ácidos fenólicos y compuestos aldehídos (Solarte-Toro et al., 2019).

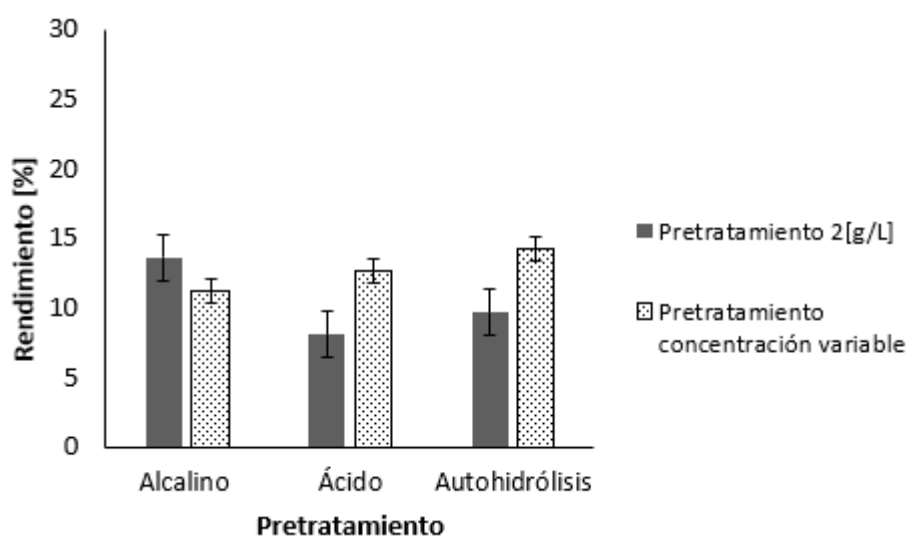


Figura 9. Rendimiento del pretratamiento para la producción de bioetanol

No se presentaron diferencias significativas en el rendimiento de cada uno de los pretratamientos.

Finalmente, en la Figura 10 se observar la eficiencia de cada una de las fermentaciones, donde el valor correspondiente a la fermentación del pretratamiento de autohidrólisis, con concentración variable, fue $(27,830 \pm 1,222)\%$, siendo la eficiencia más alta; mientras que la eficiencia más baja fue de la biomasa del pretratamiento ácido con una concentración inicial de 2 [g/L], siendo el resultado $(15,804 \pm 0,171)\%$.

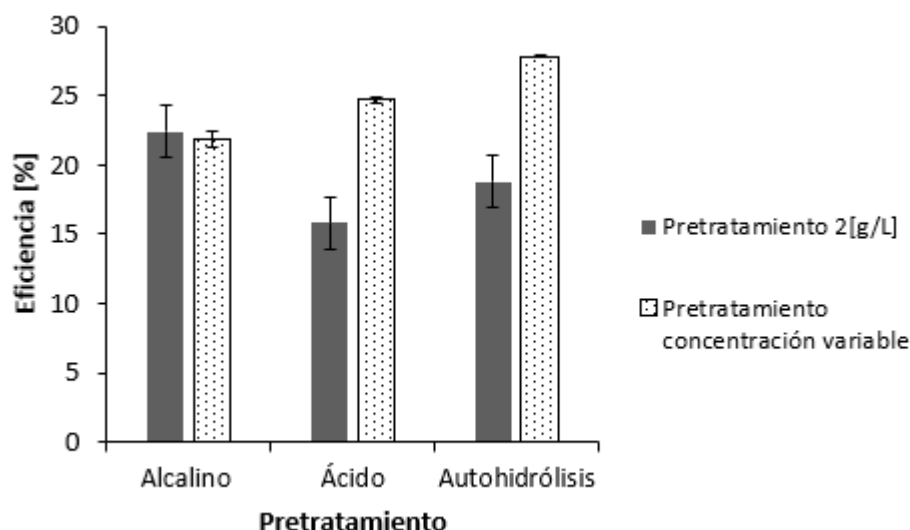


Figura 10. Eficiencia del pretratamiento para la producción de bioetanol

De igual manera, no se presentaron diferencias significativas en cuanto a la eficiencia de cada uno de los pretratamientos, sin embargo, si se constataron diferencias significativas en cuanto a la eficiencia de la concentración variable y 2 [g/L] de concentración, siendo ese la menor eficiencia estadísticamente.

4. CONCLUSIONES

Durante esta investigación, inicialmente, se realizó la caracterización proximal de la biomasa lignocelulósica de la cáscara de la mazorca del cacao fino de aroma, donde se resaltó el contenido de lignina y celulosa presente en dicha biomasa. Por otra parte, se observaron cambios en la morfología de la biomasa después del pretratamiento alcalino, lo cual se atribuye al decrecimiento en el contenido de lignina, así como un incremento en el contenido de celulosa.

En cuanto a la concentración de azúcares reductores, el licor obtenido del pretratamiento alcalino posee una mayor concentración de azúcares reductores siendo el promedio de $(46,456 \pm 1,981)$ [g/L].

Por otra parte, después de las fermentaciones de los licores de pretratamiento se observó que el rendimiento tiende a aumentar para el pretratamiento alcalino, mientras que

las eficiencias de los fermentados de cada licor de pretratamiento fueron de hasta un 20%, siendo valores bajos, lo cual puede deberse a inhibidores de crecimiento que se generan después de los pretratamientos y afectan a la producción de etanol. Finalmente, se demostró que es posible obtener bioetanol a partir de la cáscara de la mazorca del caco, después de realizar los respectivos tratamientos a dicha biomasa lignocelulósica.

5. REFERENCIAS

- Althuri, A., Gujjala, L. K. S., & Banerjee, R. (2017). Partially consolidated bioprocessing of mixed lignocellulosic feedstocks for ethanol production. *Bioresource Technology*, 245(August), 530–539. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.140>
- AOAC. (1990). *AOAC: Official Methods of Analysis (Volume 1)*. (K. Helrich, Ed.) (15th ed., Vol. 1). Arlington, Virginia: Association of Official Analytical Chemists, INC.
- AOAC. (2002). AOAC Official Method 920.39. *AOAC Official Methods of Analysis*, (May), 888–898.
- Ardila, C., & Carreño, S. (2011). *Aprovechamiento de la cáscara de la mazorca de cacao como adsorbente*. Universidad Industrial de Santander.
- Asociación Nacional de Exportadores de Cacao. (2016). Exportación Ecuatoriana de Cacao. Estadísticas de Exportación. Retrieved from <http://www.anecacao.com/es/estadisticas/estadisticas-actuales.html>
- Benalcázar, J. (2018). *Evaluación de diferentes pretratamientos químicos a la biomasa de la cáscara de cacao para procesos de fermentación alcohólica*. Universidad San Francisco de Quito.
- Bernfeld, P. (1955). Amylases α and β In: *Methods in Enzymology* Vol. 1, 12, 149–152.
- Campos-Vega, R., Nieto-Figueroa, K. H., & Oomah, B. D. (2018). Cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds. *Trends in Food Science and Technology*, 81(September), 172–184. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.022>
- Carmona-Cabello, M., Sáez-Bastante, J., Pinzi, S., & Dorado, M. P. (2019). Optimization of solid food waste oil biodiesel by ultrasound-assisted transesterification. *Fuel*, 255(July), 115817. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.115817>
- Cruz, G., Santiago, P. A., Braz, C. E. M., Selegim, P., & Crnkovic, P. M. (2018). Investigation into the physical–chemical properties of chemically pretreated sugarcane bagasse. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 132(2), 1039–1053. <https://doi.org/10.1007/s10973-018-7041-1>
- da Silva, C. M. S., Carneiro, A. de C. O., Vital, B. R., Figueiró, C. G., Fialho, L. de F., de Magalhães, M. A., ... Cândido, W. L. (2018). Biomass torrefaction for energy purposes – Definitions and an overview of challenges and opportunities in Brazil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 82(May 2017), 2426–2432. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.08.095>
- de Barros, R. da R. O., Becarelli, P., de Oliveira, R. A., Tognotti, L., & Bon, E. P. da S. (2019). Triticum spelta straw hydrothermal pretreatment for the production of glucose syrups via enzymatic hydrolysis. *Biochemical Engineering Journal*, 151(April), 107340. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107340>
- Diaz, A. B., Moretti, M. M. de S., Bezerra-Bussoli, C., Carreira Nunes, C. da C., Blandino, A., da Silva, R., & Gomes, E. (2015). Evaluation of microwave-assisted pretreatment of lignocellulosic biomass immersed in alkaline glycerol for fermentable sugars production. *Bioresource Technology*, 185, 316–323. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.112>
- Domínguez, M., Álvarez, A., Granados, M., & Hernández, F. (2012). Estudio de la cinética del pretratamiento e hidrólisis ácida del bagazo de caña de azúcar. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 13(4), 200–211.
- ExpotechUSA. (n.d.). *A Guide to Kjeldahl Nitrogen Determination Methods and apparatus*.
- FAO. (2019). FAOSTAT. Producción cacao en Ecuador. Retrieved October 2, 2019, from <http://www.fao.org/faostat/es/?#data/QC>
- Hama, S., Kihara, M., Noda, H., & Kondo, A. (2018). Development of cell recycle technology incorporating nutrient supplementation for lignocellulosic ethanol fermentation using industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Engineering Journal*, 137, 23–

29. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.05.007>
- Han, X., & Bao, J. (2018). General Method to Correct the Fluctuation of Acid Based Pretreatment Efficiency of Lignocellulose for Highly Efficient Bioconversion. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 6(3), 4212–4219. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b04601>
- Huang, Y., Qin, X., Luo, X. M., Nong, Q., Yang, Q., Zhang, Z., ... Feng, J. X. (2015). Efficient enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of sugarcane bagasse pulp for ethanol production by cellulase from *Penicillium oxalicum* EU2106 and thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* ZM1-5. *Biomass and Bioenergy*, 77, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.03.020>
- Jiang, D., Hao, M., Fu, J., Liu, K., & Yan, X. (2019). Potential bioethanol production from sweet sorghum on marginal land in China. *Journal of Cleaner Production*, 220, 225–234. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.01.294>
- Lee, S.-M., Kim, K. H., Ko, J. K., Woo, H. M., & Um, Y. (2016). Ethanol production from lignocellulosic hydrolysates using engineered *Saccharomyces cerevisiae* harboring xylose isomerase-based pathway. *Bioresource Technology*, 209, 290–296. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.124>
- Lin, Y. S., Lee, W. C., Duan, K. J., & Lin, Y. H. (2013). Ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation in rotary drum reactor using thermotolerant *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Energy*, 105, 389–394. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.12.020>
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., & Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96(6), 673–686. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.06.025>
- Pugazhendhi, A., Mathimani, T., Varjani, S., Rene, E. R., Kumar, G., Kim, S. H., ... Yoon, J. J. (2019). Biobutanol as a promising liquid fuel for the future - recent updates and perspectives. *Fuel*, 253(February), 637–646. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.04.139>
- Singh, B., Kumar, P., Yadav, A., & Datta, S. (2019). Degradation of fermentation inhibitors from lignocellulosic hydrolysate liquor using immobilized bacterium, *Bordetella* sp. BTIITR. *Chemical Engineering Journal*, 361(December 2018), 1152–1160. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.12.168>
- Solarte-Toro, J. C., Romero-García, J. M., & Martínez-Patiño, J. C. (2019). Acid pretreatment of lignocellulosic biomass for energy vectors production: A review focused on operational conditions and techno-economic assessment for bioethanol production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, (February), 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.02.024>
- The Intergovernmental Panel for Climate Change. (2007). *Climate change: Impacts, Adaptions and Vulnerability*. *International Journal of Climatology*.
- Wei, H., Yingting, Y., Jingjing, G., Wenshi, Y., & Junhong, T. (2017). *Lignocellulosic Biomass Valorization: Production of Ethanol*. *Encyclopedia of Sustainable Technologies* (Vol. 3). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.10239-8>