

Optimización del proceso de producción de etanol de segunda generación utilizando sacarificación y fermentación simultánea a partir de mezclas de residuos lignocelulósicos

Optimization of the second-generation ethanol production process using simultaneous saccharification and fermentation from mixtures of lignocellulosic residues

Otimização do processo de produção de etanol de segunda geração utilizando sacarificação e fermentação simultâneas a partir de misturas de resíduos lignocelulósicos

Deyanira Nohely Sánchez Acosta

<https://orcid.org/0000-0002-9309-969X>
dsanchez4404@utm.edu.ec

Facultad de Ciencias Matemáticas, Físicas y Químicas, Carrera de Ingeniería Química, Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Ecuador.

Lezzie Valeria Villavicencio Vera

<https://orcid.org/0000-0003-2524-0740>
lvillavicencio3460@utm.edu.ec

Facultad de Ciencias Matemáticas, Físicas y Químicas, Carrera de Ingeniería Química, Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Ecuador.

Christhel Andrade Díaz

<https://orcid.org/0000-0002-2448-6186>
christhel.andrade@utm.edu.ec

Departamento de Procesos Químicos Alimentos y Biotecnología, Facultad de Ciencias Matemáticas, Físicas y Químicas, Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Ecuador.

Toulouse Biotechnology Institute (TBI), INSA, INRAE UMR792, and CNRS UMR5504, Federal University of Toulouse, 135 Avenue de Rangueil, F-31077, Toulouse, France.

Ernesto Alonso Rosero Delgado

<https://orcid.org/0000-0001-8878-8522>
ernesto.rosero@utm.edu.ec

Departamento de Procesos Químicos Alimentos y Biotecnología, Facultad de Ciencias Matemáticas, Físicas y Químicas, Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Ecuador.

RESUMEN

Ecuador se encuentra posicionado como primer exportador de cacao fino de aroma, representando más del 62% de la producción mundial de este fruto, lo que propicia una abundante disponibilidad de residuos valorizables de esta planta. La composición lignocelulósica de estos residuos les confiere la capacidad de ser procesados y transformados a bioetanol. En esta investigación, los residuos de cáscaras, tallos y hojas de cacao fueron acondicionadas (secadas y pulverizadas) y sometidas a un proceso de sacarificación y fermentación simultánea para la producción de bioetanol de segunda generación. La biomasa acondicionada fue sometida a un pretratamiento de hidrólisis alcalina (NaOH al 3%) con explosión de vapor a 121°C por 90 min a 1 atm. La biomasa hidrolizada se sometió a un proceso de hidrólisis enzimática empleando la enzima celulasa de *Aspergillus niger* de Sigma Aldrich y se utilizó simultáneamente la levadura Safale S-04 para la fermentación de los azúcares a bioetanol. Las muestras tratadas fueron filtradas y centrifugadas y el contenido de alcohol se cuantificó mediante cromatografía gaseosa. Las condiciones de sacarificación y fermentación simultánea fueron optimizadas mediante un diseño factorial multinivel, empleando la metodología de superficie de respuesta. El diseño incluyó nueve corridas base (todas por triplicado), donde se evaluaron tres concentraciones enzimáticas (5, 15 y 25 FPU/g) para los cinco gramos de carga inicial de material sólido seco (MSS) y tres temperaturas (27, 37 y 47°C). La máxima producción de bioetanol (0,00240 µL/g) se alcanzó con las condiciones óptimas de 23,5 FPU y 31,7 °C. Se realizó una última corrida empleando las condiciones óptimas para una mayor carga de biomasa (20 g), alcanzando una concentración máxima de bioetanol de segunda generación de 0,11 mL/L.

Palabras claves: Lignocelulosa, sacarificación y fermentación simultánea, optimización, etanol de segunda generación.

ABSTRACT

Ecuador is positioned as the first exporter of fine aroma cocoa, representing more than 62% of the world production of this fruit, which favors an abundant availability of recoverable residues from this plant. The lignocellulosic composition of these residues gives them the ability to be processed and transformed into bioethanol. In this research, cocoa shell, stem and leaf residues were conditioned (dried and powdered) and subjected to a simultaneous saccharification and fermentation process for the production of second-generation bioethanol. The conditioned biomass was subjected to a pretreatment of alkaline hydrolysis (3% NaOH) with steam explosion at 121°C for 90 min at 1 atm. The hydrolyzed biomass was subjected to an enzymatic hydrolysis process using the cellulase enzyme from *Aspergillus niger* from Sigma Aldrich and Safale S-04 yeast was used simultaneously for the fermentation of sugars to bioethanol. The treated samples were filtered and centrifuged and the alcohol content was quantified by gas chromatography. Simultaneous saccharification and fermentation conditions were optimized through a multilevel factorial design, using the response surface methodology. The design included nine base runs (all in triplicate), where three enzyme concentrations (5, 15 and 25 FPU/g) were evaluated for the five grams of initial load of dry solid material (DSM) and three temperatures (27, 37 and 47°C). The maximum production of bioethanol (0.00240 µL/g) was reached with the optimal conditions of 23.5 FPU and 31.7 °C. A final run was carried out using the optimal conditions for a higher biomass load (20 g), reaching a maximum concentration of second-generation bioethanol of 0.11 mL/L.

Keywords: Lignocellulose, saccharification and simultaneous fermentation, optimization, second generation ethanol.

RESUMO

O Equador se posiciona como o primeiro exportador de cacau de aroma fino, representando mais de 62% da produção mundial desta fruta, o que favorece uma disponibilidade abundante de resíduos recuperáveis desta planta. A composição lignocelulósica desses resíduos lhes confere a capacidade de serem processados e transformados em bioetanol. Nesta pesquisa, resíduos de casca, caule e folhas de cacau foram condicionados (secos e em pó) e submetidos a um processo simultâneo de sacarificação e fermentação para a produção de bioetanol de segunda geração. A biomassa condicionada foi submetida a um pré-tratamento de hidrólise alcalina (3% NaOH) com explosão de vapor a 121°C por 90 min a 1 atm. A biomassa hidrolizada foi submetida a um processo de hidrólise enzimática utilizando a enzima celulase de *Aspergillus niger* da Sigma Aldrich e a levedura Safale S-04 foi utilizada simultaneamente para a fermentação dos açúcares a bioetanol. As amostras tratadas foram filtradas e centrifugadas e o teor de álcool foi quantificado por cromatografia gasosa. As condições simultâneas de sacarificação e fermentação foram otimizadas através de um planejamento fatorial multinível, utilizando a metodologia de superfície de resposta. O desenho incluiu nove corridas de base (todas em triplicata), onde foram avaliadas três concentrações de enzimas (5, 15 e 25 FPU/g) para os cinco gramas de carga inicial de material sólido seco (DSM) e três temperaturas (27, 37 e 47°C). A produção máxima de bioetanol (0,00240 µL/g) foi alcançada com as condições ótimas de 23,5 FPU e 31,7 °C. Uma corrida final foi realizada utilizando as condições ideais para uma maior carga de biomassa (20 g), atingindo uma concentração máxima de bioetanol de segunda geração de 0,11 mL/L.

Palavras-chave: Lignocelulose, sacarificação e fermentação simultânea, otimização, etanol de segunda geração.

1. INTRODUCCIÓN

La bioenergía obtenida de biomasa renovables resalta entre las alternativas más atractivas para la preservación de fuentes energéticas no renovables, lo que permite disminuir la dependencia en carbono fósil, incrementar la seguridad energética y promover el desarrollo sostenible regional (León, 2020). Las bioenergías permiten reducir la emisión de gases de efecto invernadero (GEI), los cuales son considerados responsables del cambio climático, presiones sobre la seguridad alimentaria, contaminación de aguas, polución de aire y consecuentemente toxicidad para seres vivos (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2021). Actualmente el empleo de biomasa lignocelulósicas constituye una de las opciones más viables en la producción de biocombustibles de segunda generación (bioetanol) ya que, no compite con la provisión de alimentos, se encuentra en altas cantidades a bajos costos, rápidos ciclos de regeneración y no requieren cambios en el uso de tierra (Meléndez et al., 2021).

Son múltiples los beneficios del uso del bioetanol como aditivo sobre la gasolina convencional, entre los cuales resaltan (i) reducción de las emisiones de CO₂ y compuestos aromáticos de origen fósil (Gupta & Verma, 2015), (ii) es fácilmente adaptable a los sistemas logísticos de distribución de combustibles (Zabed et al., 2017), (iii) mejora el octanaje de la mezcla combustible y de su relación de compresión, y (iv) aumenta la potencia de salida del motor de combustión interna, debido a una mayor eficiencia volumétrica como resultado de un calor de vaporización superior. Por estas razones, el bioetanol obtenido a partir de residuos agrícolas constituye un vector de segunda generación promisorio para la movilidad sostenible (Escobar et al., 2009).

La industria del cacao en el Ecuador tiene como actividad principal la elaboración de chocolate y sus derivados, los cuales se extraen específicamente de la semilla, que representa apenas el 10% del peso del fruto seco (Sigüenza et al., 2020). Por lo tanto, la industrialización de este fruto, genera una proporción alta de desechos de cáscaras, además de los tallos y hojas que se desechan en campo, constituyendo un residuo voluminoso pobremente estudiado (Castillo et al., 2018). La escasez de estudios que evalúen la conversión de los residuos de cacao en bioetanol puede deberse a que contiene un considerable porcentaje de lignina (45,39%) en relación a su contenido celulosa (27,04%) y hemicelulosa (2,97%) (Herrera et al., 2020), lo que complica su aprovechamiento ya que, la lignina es un material recalcitrante de difícil degradación.

El proceso de producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica conlleva varias etapas: (i) pretratamiento de celulosa y hemicelulosa, (ii) hidrólisis ácida o enzimática de polisacáridos en azúcares simples, (iii) fermentación microbiana de los azúcares simples (hexosas y pentosas) a etanol, y (iv) separación y concentración de etanol (Busic et al., 2018). Sin embargo, como estrategia de reducción de tiempo y requerimientos energéticos, los sistemas de producción de etanol de segunda generación implementan procesos de sacarificación y fermentación simultáneas (SFS), ya que ofrecen mayores ventajas frente a procesos de hidrólisis y fermentación separadas (SHF) (Castaño & Mejía, 2008). Entre estas ventajas podemos resaltar que los procesos SFS reducen la inhibición de la enzima por sustrato (Sassner et al., 2006), tienen menores costos (Zhu et al., 2005), presentan mayores conversiones globales de etanol (Alkasrawi et al., 2003), y requieren menores tiempos de producción (Liu et al., 2017), en comparación con los sistemas SHF.

Aunque actualmente varios estudios han evaluado la obtención de bioetanol a partir de distintas materias y biomasa lignocelulósicas, como la cáscara de piña (Patiño & Torres, 2021), cascarilla de arroz (Vásquez, 2019), cáscara de plátano (Zola & Barranzuela, 2017), entre otros, es necesario recalcar que muy pocos estudios han investigado el aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos que se generan del procesamiento del cacao (cáscaras, hojas y tallos) (Loayza, 2020).

En esta investigación se busca determinar las condiciones óptimas para alcanzar el rendimiento máximo de obtención de etanol de segunda generación utilizando el método de

sacarificación y fermentación simultánea de una mezcla de residuos lignocelulósicos generados del procesamiento del cacao.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Estandarización y pretratamiento

La biomasa empleada para la producción de bioetanol consistió en una mezcla de hojas, tallos y cáscaras de cacao, en proporciones iguales, obtenidas de la parroquia Abdón Calderón del cantón Portoviejo. Las diferentes partes que conforman la biomasa (hojas, tallos y cáscara) se trataron y estandarizaron por separado, para lo cual pasaron por un proceso de eliminación de impurezas y materiales particulados, seguido de un secado a 70°C por 24 h. La granulometría de cada biomasa fue estandarizada con la ayuda de un pulverizador eléctrico y un tamiz hasta un diámetro de 1 mm, según lo descrito por Mayoral (2019).

La biomasa estandarizada fue mezclada como se describe en el párrafo anterior y, la mezcla fue sometida a un pretratamiento mediante hidrólisis alcalina con una solución de NaOH (3%), en una relación 1:6 (m/v), y sometida a un tratamiento de explosión de vapor con la ayuda de un autoclave (*Biobase*) a 121°C y 1 atm de presión, durante 90 min (Monroy et al., 2021). El hidrolizado (alcalino) se filtró para separar las fases líquida y sólida, las cuales fueron almacenadas y refrigeradas ($\pm 4^\circ\text{C}$) hasta su posterior uso en el proceso de SFS.

2.2 Determinación de azúcares reductores

Los azúcares reductores (AzR) se midieron antes del proceso de hidrólisis básica y después del mismo, la determinación se realizó por el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) propuesto por Miller (1959). Se preparó inicialmente el reactivo DNS, para posteriormente elaborar una curva de calibración de glucosa con diferentes concentraciones. La reacción para evaluar los AzR se inicia cuando se agrega 0,5 mL de la muestra hidrolizada con 0,5 mL de reactivo DNS en tubos de ensayo, dicha mezcla fue sometida a un baño termostático en una placa calefactora (*Thermo*) durante cinco minutos a 90°C. Los tubos de ensayo fueron enfriados en agua a temperatura ambiente durante cinco minutos, luego de ese tiempo se añadieron cinco mililitros de agua destilada y se finalizó con la lectura en el espectrofotómetro GENESYS 180 UV-VIS (*Thermo Scientific*) a 540 nm (Montañez, 2020).

2.3 Sacarificación y fermentación simultánea (SFS)

La sacarificación y fermentación simultánea consistió en una hidrólisis enzimática empleando celulasa de *Aspergillus Níger* (*Sigma Aldrich*, CAS: 9012-54-8) junto con levadura *Safale S-04* de *Lesaffre* (Fermentis, 2022) para la fermentación alcohólica. La levadura y la enzima fueron agregadas al biorreactor junto con la biomasa pre tratada al inicio del proceso SFS. Se evaluaron tres temperaturas ($T_1=27^\circ\text{C}$, $T_2=37^\circ\text{C}$ y $T_3=47^\circ\text{C}$) y tres concentraciones de celulasa ($C_1=5$ FPU/g, $C_2=15$ FPU/g y $C_3=25$ FPU/g), para los cinco gramos de carga inicial de material sólido seco (MSS) y 50 mL de agua destilada, a un pH inicial de 5,0 (ajustado con HCl al 1N), parámetro que se mantuvo constante durante todo el proceso. La dosificación de celulasa se realizó por cálculo estequiométrico (0,7mg/gMSS) diluida en buffer acetato de sodio (pH 5,2) en una relación 1:14 (m/v), según indicaciones del proveedor (Merck, s.f.) mientras que la levadura se empleó en una relación de 12:20 (g levadura/L hidrolizado) (Cocinista, 2022). El proceso de SFS fue ejecutado en un shaker (*New Brunswick Scientific Excella E24*) a 150 rpm por un tiempo de cinco días, según el método reportado por Murcia et al. (2020). Durante el periodo de SFS, se tomaron muestras de un mililitro por día para determinar la concentración de etanol.

2.4 Determinación de la concentración de etanol

El análisis cuantitativo de etanol (mL/L) en la muestra se realizó siguiendo el método modificado de Mansur et al., (2021), en un cromatógrafo de gases TRACE 1310 (*Thermo Scientific*) con una Columna TR-FAME (*Thermo Scientific*) [película de 30 m (L) \times 0,25 mm (DI) \times 0,25 μm

espesor] como fase estacionaria. Cada muestra (0.1 μL) se inyectó en modo dividido con una relación de división de 13:1. El flujo de gases y las velocidades se mantuvieron de la siguiente manera: gas portador (helio, 10 mL/min), hidrógeno (30 mL/min) y aire (300 mL/min). En el inyector y el detector las temperaturas se mantuvieron a 180 y 250 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Para realizar la curva de calibración, se preparó una solución de etanol y otra de metanol (1,0 mg/mL), mezclando un mililitro de etanol/metanol absoluto en nueve mililitros de agua destilada, muestras que fueron almacenadas en viales transparentes, completamente cerradas y colocadas en el cromatógrafo para su medición, el tiempo total de ejecución por muestra fue de siete minutos. Luego de realizada la curva patrón, se procedió a centrifugar las muestras provenientes del proceso SFS e inyectadas a los viales para su medición. El rendimiento de etanol (en $\mu\text{L/g}$) fue calculado según la concentración de etanol por gramo de MSS.

2.5 Diseño y análisis experimental

Para la optimización del proceso de sacarificación y fermentación simultánea se empleó un diseño factorial multinivel 2^3 , en donde las variables independientes fueron temperatura (T) y carga enzimática (C) evaluadas en tres niveles. Mientras que la variable respuesta correspondió al rendimiento de etanol ($\mu\text{L/g}$), todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Para el análisis de estadístico se utilizó el software *STATGRAPHICS Centurion XVI*, con el cual se establecieron el efecto y relación de las variables, así como la determinación de los niveles óptimos de las variables evaluadas. En el caso de la validación del óptimo se utilizó la misma metodología descrita en el apartado 2.3, con la diferencia de que se utilizó 20 gramos de MSS en un volumen de 277 mL a pH 5, prueba realizada por triplicado.

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1 Sacarificación y fermentación simultánea

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos tanto para la hidrólisis básica como para la sacarificación y fermentación simultánea.

Tabla 1. Resultados de la hidrólisis básica y la SFS.

Tratamiento	Hidrólisis Básica				SFS			
	MSS Inicial	Sólido	Líquido	AzR (líquido)	MSS Hidrolizado	Final Sólido (MSS)	Final Líquido	Rendimiento Etanol (MSS)
C1T1						2,28 g	81,7 ml	0,0010 \pm 0,0003 $\mu\text{L/g}$
C2T1						2,85 g	80,7 ml	0,0010 \pm 0,0001 $\mu\text{L/g}$
C3T1						2,93 g	81,6 ml	0,0016 \pm 0,0011 $\mu\text{L/g}$
C1T2						2,36 g	84,8 ml	0,0000 \pm 0,0000 $\mu\text{L/g}$
C2T2	1040 g	539,21 g	6,7 L	27987,30 mg/L	5,0 g	2,95 g	85,3 ml	0,0012 \pm 0,0014 $\mu\text{L/g}$
C3T2						2,78 g	85,0 ml	0,0016 \pm 0,0006 $\mu\text{L/g}$
C1T3						2,04g	89,3 ml	0,0004 \pm 0,0002 $\mu\text{L/g}$
C2T3						2,50 g	91,0 ml	0,0010 \pm 0,0110 $\mu\text{L/g}$
C3T3						3,90 g	86,6 ml	0,0011 \pm 0,0002 $\mu\text{L/g}$

T1=27 $^{\circ}\text{C}$, T2=37 $^{\circ}\text{C}$, T3=47 $^{\circ}\text{C}$, C1=5 FPU, C2=15 FPU y C3=25 FPU

En la tabla 1 se observa que durante el pretratamiento básico (NaOH) se pierde el 48,2% de MSS y se obtiene un volumen de 6.7 L (licor negro), en este último se determinó una concentración de AzR de 27987.30 mg/L. Cabe mencionar que dichos azúcares se pierden, debido a que este líquido normalmente en la industria es descartado, porque se generan algunos subproductos que pueden resultar tóxicos para los microorganismos como la presencia de furfural, hidroximetilfurfural, ácido acético y compuestos fenólicos entre otros, los cuales producen reacciones de degradación de azúcares (Chandler et al., 2012). En esta investigación tampoco se consideró esta fracción.

El mayor rendimiento de etanol en el proceso SFS se observó en el tratamiento C3T2, alcanzando una producción de 0,0016 $\mu\text{L/g}$. Este resultado es mucho menor al reportado por Castillo (2016) quien en condiciones similares indica un valor de 70-75 $\mu\text{L/g}$, para bioetanol obtenido a partir de raquis de palma y bagazo de caña de azúcar, en un proceso a escala piloto (9000 L). El menor rendimiento observado en este trabajo en comparación con Castillo (2016) puede deberse a la composición inicial de la materia prima, puesto que el contenido de lignina representa el 45,9% en la biomasa de cacao, mientras que constituye solamente el 20,7% en el raquis de palma y 19,9% en bagazo de caña de azúcar, el cual está caracterizado por un alto contenido de azúcares reductores (0,98252 g/L sin pretratar) remanentes del procesamiento de la caña de azúcar (Domínguez et al., 2011). De manera similar, Patiño & Torres (2021) reportaron una producción de bioetanol superior a la observada en este estudio, empleando desechos de piña, con un rendimiento de 3,48 kg/L. Es importante aclarar que el mayor rendimiento observado por Patiño & Torres (2021) se obtuvo empleando un pre tratamiento hidrotérmal en lugar de una hidrólisis alcalina. El tratamiento hidrotérmal consiste en la extracción con agua caliente de la hemicelulosa de la biomasa (Aguilera, 2020), y puede mejorar el rendimiento de etanol porque libera la mayor cantidad de azúcares reductores totales.

La importancia de la selección del pretratamiento queda resaltada también en el estudio de Fernando et al. (2018), donde se evaluaron los procesos de pasteurización, esterilización e hidrólisis ácida como pretratamientos para la producción de bioetanol de desechos de plátano, alcanzando rendimientos de 34,1 g/L, 64,2 g/L, y 55,1 g/L, para cada pretratamiento, respectivamente.

3.2 Cinética de formación de etanol lignocelulósico

En la figura 1 se muestra la cinética de formación del bioetanol lignocelulósico en un periodo de cinco días de SFS. Se observa un incremento de etanol en el primer día, seguido por un periodo de estabilidad del primer al cuarto día para la temperatura 27°C y en el quinto día hay un incremento de etanol con 15 y 25 FPU, mientras que con 5 FPU sigue siendo estable. En la temperatura de 37°C se observa la producción de etanol en el cuarto día, mientras que para 47°C desde el primer día hay un incremento de producción de etanol. Realmente no se observa un periodo de estabilización de la producción de etanol, el único gráfico que muestra algo parecido es el de 47°C a 15 FPU. Además, se observa que en la temperatura 37°C con 5 FPU no se alcanza una concentración detectable de etanol, esto pudo deberse a que necesitaba seguir fermentando.

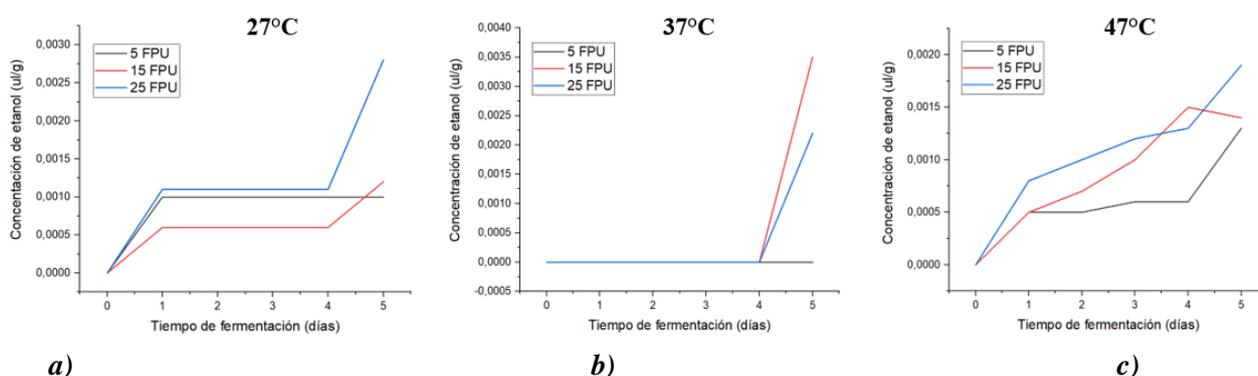
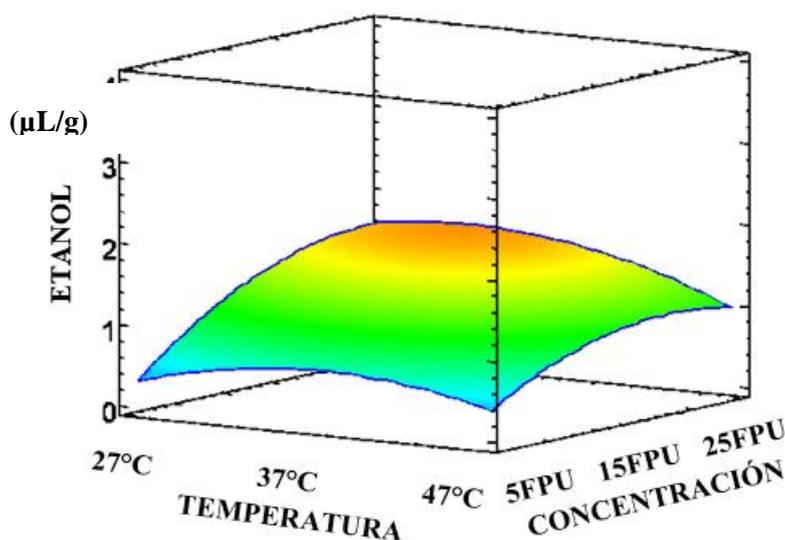


Figura 1. Producción de etanol durante el proceso SFS. a) 27°C, b) 37°C, c) 47°C.

De manera opuesta, Loayza (2020) identificó la mayor producción de etanol a partir de la cáscara de cacao a una temperatura 25°C por un tiempo de tres días, reportando que transcurridos los tres días la producción de etanol baja significativamente. Por otro lado, Delgado et al. (2018) reportan que a una temperatura de 35°C y en un tiempo menor de 3 días (34.5 h) la concentración de etanol alcanza su máximo valor 22,06 g/L para el mucílago del cacao. El rendimiento máximo y la cinética de producción de etanol observada en este estudio refleja resultados que difieren a lo reportado por otros autores. Esto podría deberse a las diferencias existentes entre los estudios en cuanto a parámetros críticos del proceso, como la concentración de levadura y enzima, concentración inicial de azúcares reductores, valores de pH inicial, diferentes biomásas lignocelulósicas, entre otros.

En la experimentación de Sinche et al., (2022), por ejemplo, para la SFS de la cáscara de *Jatropha curcas*, otra biomasa lignocelulósica de interés actual, se reporta una mayor concentración de bioetanol a las 24 h, para un proceso llevado a cabo en condiciones de 36°C y 15 FPU/g, empleando un cóctel enzimático de *Cellic CTec2*, que difiere al empleado en este estudio y es considerado ideal para el tratamiento de biomasa lignocelulósica ya que están enriquecidos con celulasa y hemicelulasa, que permite la hidrólisis de la biomasa a cadenas de carbono C6 (i.e., glucosa) y C5 (i.e., xilosa), a diferencia de la enzima utilizada en este trabajo, que es únicamente celulasa.

3.3 Optimización del proceso SFS



$$\text{Etanol } (\mu\text{L/g}) = 0,00143 - 0,00012*(31,7^\circ\text{C}) + 0,00046*(23,5 \text{ FPU}) - 0,00017*(31,7^\circ\text{C})^2 - 0,00004*(31,7^\circ\text{C}) * (23,5 \text{ FPU}) - 0,00028*(23,5 \text{ FPU})^2$$

Figura 2. Superficie de respuesta para condiciones óptimas de obtención de etanol.

La gráfica de superficie de respuesta (Figura 2) permite evaluar la interacción existente entre la temperatura y concentración enzimática del proceso, a la vez que revela el nivel óptimo de dichas variables que permite maximizar el rendimiento de bioetanol (variable respuesta). La tabla 2 muestra las condiciones de temperatura y concentración de enzima para alcanzar el valor óptimo de rendimiento de etanol.

Tabla 2. Condiciones de temperatura y carga enzimática que permiten optimizar el rendimiento de etanol

Variable	Niveles			Concentración máxima de etanol
	Bajo	Alto	Óptimo	
Temperatura	27°C	47°C	31,7°C	0,00166 μ L/g MSS
Concentración enzimática	5 FPU/g	25 FPU/g	23,5 FPU/g	

Los resultados del diseño experimental indican que las condiciones adecuadas para alcanzar un rendimiento máximo de etanol teórico de 0,00166 μ L/g MSS se dan a una temperatura de 31,7 °C y a una concentración enzimática de 23,5 FPU/g MSS. Estas condiciones son similares a las reportadas por García & Garza, (2016) para bioetanol generado de raquis de maíz en procesos SFS, quienes indican una concentración máxima de 0,027 μ L/g MSS a una temperatura de 38°C y carga enzimática de 20 FPU/g. Los resultados de rendimiento de etanol observados en la literatura se deben a la eficiencia del pre tratamiento (alcalino), el cual puede condicionar de manera directa el rendimiento del proceso SFS. Por otro lado, los complejos enzimáticos que utilizan varios autores, como Celluclast® (García & Garza, 2016), *Cellic CTec2* (Sinche et al., 2022), entre otras; marca notables diferencias en cuanto a los rendimientos de azúcares reductores, debido a que estos complejos enzimáticos están diseñados para hidrolizar celulosa y hemicelulosa a la vez y con mayor grado de eficiencia que la celulasa pura. A pesar que en esta investigación no se evaluaron los AzR directamente durante SFS, la eficiencia del proceso enzimático se ve marcada en el rendimiento de etanol obtenido.

Los resultados obtenidos en el trabajo de Monsalve et al. (2006) para las cáscaras de banano mostraron una concentración de etanol de 0,1 g/L a 30°C por 72 horas, cabe mencionar que en este último se utilizó la bacteria *Zymomonas mobilis* como agente biológico. Estudios mostrados por Montañez et al. (2011) indican que una mayor tolerancia y producción de bioetanol por *Zymomonas mobilis* se debe a la composición de ácidos grasos que presenta la membrana celular de este microorganismo, dichos ácidos grasos contrarrestan los efectos adversos del bioetanol sobre la membrana celular. Por otro lado, una menor producción de bioetanol por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*Safale S-04*) utilizada en este trabajo, se atribuye al efecto tóxico que tiene el alcohol sobre la membrana celular de este microorganismo.

3.4 Validación del proceso optimizado

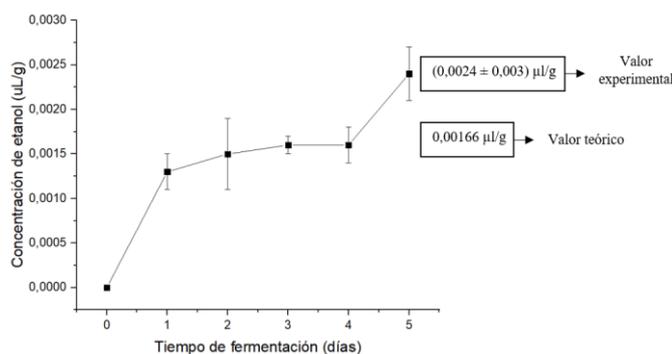


Figura 3. Concentración de etanol vs. tiempo de fermentación. Valores óptimos.

En la figura 3 se muestra la gráfica de la concentración de etanol obtenida a través del tiempo en el proceso SFS realizado con las condiciones descritas en el proceso de optimización. El proceso optimizado presentó un rendimiento de $0,00240 \mu\text{L/g} \pm 0,0003 \mu\text{L/g}$ frente a $0,00166 \mu\text{L/g}$ valor teórico. Podemos observar que el valor experimental obtenido en esta investigación es superior al valor teórico esperado, lo que permite concluir que con el método SFS empleado en este estudio se puede obtener bioetanol de segunda generación y que a mayor carga de biomasa mayor será el rendimiento de etanol.

En comparación, la investigación realizada por Lizarazo et al., (2015) reporta un valor óptimo de $1,014 \text{ g/mL}$, resultado mayor al alcanzado en esta investigación, para residuos de papa. La diferencia en los rendimientos observados entre el estudio mencionado y este estudio, se puede explicar por la composición de la materia prima. La papa presenta una composición rica en almidón, lo que favorece la producción de bioetanol al liberarse más fácilmente los AzR a diferencia de los residuos lignocelulósicos. Aunque los residuos lignocelulósicos presentan menores rendimientos de bioetanol que los residuos de almidón, los primeros son típicamente un residuo que no compite con la provisión de alimentos ni el uso de suelo, por lo que pueden llegar a ser preferibles a pesar de su menor rendimiento.

Por otro lado, Loayza (2020) obtuvo un valor óptimo de $0,41 \text{ mg/L}$ valor más cercano al de la presente investigación, aunque mayor, para 30 g de cáscara de cacao. Si bien el estudio de Loayza, (2020) emplea el mismo residual que este estudio, no ocupan todas las fracciones (hojas, tallo y cáscara) del mismo, lo que genera un menor contenido de lignina en la biomasa inicial. En otra investigación (Tejeda et al., 2014), las concentraciones máximas de etanol alcanzadas a partir de las cáscaras de limón, mandarina y naranja fueron $9,32$, $15,96$ y $13,90 \text{ mg/L}$, respectivamente. La etapa de fermentación realizada en dicho estudio fue enriquecida usando como nutriente $0,25\%$ de fosfato $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ e inoculando con $0,1\%$ de *Saccharomyces cerevisiae*; en este caso en particular la adición de un nutriente pudo ser un factor importante en la obtención de mayores rendimientos de etanol.

Se puede observar que los valores de producción de etanol obtenidos en la presente investigación, son bajos en comparación con los de otros autores esto se debe a varias razones: Los residuos utilizados contienen un alto contenido de lignina, lo que pudo causar que en la etapa de pretratamiento no se degradara completamente y no se liberara totalmente la celulosa. El pretratamiento de las materias primas lignocelulósicas se realiza bajo ciertas condiciones de severidad, lo que suele provocar formación de compuestos tóxicos o inhibidores que pueden influir negativamente en las etapas posteriores de hidrólisis enzimática y fermentación. Entre los principales factores que afectan a la hidrólisis enzimática de la celulosa, se encuentran: la naturaleza del sustrato y el tipo de pretratamiento al que ha sido sometido, la actividad de las celulasas y las condiciones de la reacción enzimática (principalmente pH, temperatura y tiempo) (Olivo et al., 2011). La utilización de la enzima celulasa de *Aspergillus Niger* pudo ser también una desventaja ya que al ser un residuo lignocelulósico puede utilizarse otro tipo de enzima que ayude a obtener altos rendimientos de conversión por ejemplo *Cellic CTec2*.

4. CONCLUSIONES

Se pudo desarrollar el diseño experimental para el proceso de producción de etanol de segunda generación a partir de los residuos generados durante la producción de cacao, incluyendo hojas, tallos y cáscaras, comprobando así que, este residuo puede ser aprovechado satisfactoriamente.

Fue posible emplear la técnica de hidrólisis y fermentación simultánea en la producción de etanol de segunda generación a partir de la mezcla de residuos de cacao, en esta etapa tanto la carga enzimática del complejo celulasa de *Aspergillus niger*, como la cantidad de inóculo (*Safale S-04*)

presentaron efectos sobre el rendimiento de etanol de segunda generación observado, este es inferior al reportado en la literatura para procesos SFS empleando biomasa lignocelulósica, posiblemente debido a que la temperatura entre la enzima y la levadura no llegaron a una armonía, lo que es un problema característico de estos procesos.

Se validó el método experimentalmente, las condiciones de proceso obtenidas por optimización del proceso fueron concentración enzimática 23,5 FPU y temperatura 31.7°C, con estas condiciones se alcanzó un rendimiento de etanol de 0,00240µL/g.

Es posible producir buenos rendimientos de etanol mediante la estrategia de proceso SFS, tomando en cuenta que existen varios factores que influyen marcadamente sobre la eficacia de producción de etanol tales como: pH, temperatura y concentración enzimática. La selección de pretratamiento al que va a ser sometida la biomasa también es un punto clave ya que unos son más severos que otros lo que podría provocar pérdidas importantes de AzR.

REFERENCIAS

- Alkasrawi, M., Eriksson, T., Borjesson, J., Wigren, A., Galbe, M., Tjerneld, F., & Zacchi, G. (2003). The effect of Tween-20 on simultaneous saccharification and fermentation of softwood to ethanol. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 71-78. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141022903000875>
- Aguilera, B. (2020). *Fraccionamiento hidrotérmico de zanahoria en planta piloto y separación por membranas de ultrafiltración*. [Tesis de grado, Universidad de Valladolid]. <https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/44741/TFG-I-1704.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Borralló, C. (2019). *Valorización de la cascarilla de cacao, residuo de la industria chocolatera, para su empleo como sustrato en procesos fermentativos*. [Tesis de maestría, Universidad de Oviedo]. <https://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/handle/10651/59511/TFM%20MBTA%20CRISTINA%20BORRALLO%20MAYORAL.pdf?sequence=4>
- Busic, A., Mardetko, N., Galina, S., Belskaya, H., Ivancic, M., Komes, D., Novak, S., & Santek, B. (2018). BIOETHANOL PRODUCTION FROM RENEWABLE RAW MATERIALS AND ITS SEPARATION AND PURIFICATION: A REVIEW. *Food Technol Biotechnol (FTB)* 56(3), 289–311. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6233010/>
- Castaño, H., & Mejía, C. (2008). Producción de etanol a partir de almidón de yuca utilizando la estrategia de proceso sacarificación-fermentación simultáneas (SSF). *Vitae*, 15(2), 251-258. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042008000200007&lng=en&tlng=es.
- Castillo, E. (2016). Producción de etanol celulósico a partir de las tusas de palma: perspectiva de Ecopetrol. *Palmas*, 37(2), 115-118. <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/11927/11920>
- Castillo, E., Alvarez, C., & Contreras, Y. (2018). Caracterización fisicoquímica de la cáscara del fruto de un clon de cacao (*Theobroma cacao* L.) cosechados en Cauagua estado Miranda, Venezuela. *Revista de Investigación*, 42(95), 154-175. <https://www.redalyc.org/journal/3761/376160247008/html/>
- Chandler, C., Villalobos, N., González, E., Arenas, E., Mármol, Z., Ríos, J., & Aiello, C. (2012). Hidrólisis ácida diluida en dos etapas de bagazo de caña de azúcar para la producción de azúcares fermentables. *Multiciencias*, 12(3), 245-253. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90426810002>
- Cocinista. (2022). *Levadura para cerveza SafAle S-04 - 11,5 gr*. <https://www.cocinista.es/web/es/levadura-para-cerveza-safale-s-04-11-5-gr-1099.html>
- Corrales, V., & Chacha, F. (2021). *Producción de bioetanol a partir de hidrólisis enzimática con trichoderma spp y posterior fermentación alcohólica con saccharomyces cerevisiae de cáscara de cacao* [Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica del Litoral]. DSpace en ESPOL.
- Delgado, J., Soler, J., & Peña, A. (2018). Optimización de la producción de bioetanol en procesos fermentativos del mucílago de Cacao CCN – 51 en un biorreactor tipo batch. *Revista "Jornada de Jóvenes Investigadores del I3A"*, 6. <https://doi.org/10.26754/jji-i3a.201802821>
- Delgado, N. (2018). *Plan de manejo integral de residuos derivados de la extracción de la pulpa de cacao en la hacienda Bellavista, Luz de América, provincia de Azuay-Ecuador* [Tesis de grado, Universidad de Cuenca]. DSpace en UCUENCA.
- Domínguez, M., Álvarez A., Castrejón T., Granados, M., Hernández, F., Alcalá, V., & Tapia, J. (2011). Estudio de la cinética de la hidrólisis ácida del bagazo de caña de azúcar sin pretratamiento para la obtención de azúcares reductores. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 12(3), 153-159. <https://reviberpol.files.wordpress.com/2019/07/2011-dominguez.pdf>
- Equihua, M. (2013). Obtención de etanol por sacarificación y fermentación simultáneas a partir de la biomasa lignocelulósica de tallos de sorgo dulce [Tesis de maestría, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.].

- https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/695/1/PCER_M_Tesis_2013_Mintzirani_Equihua_S%C3%A1nchez.pdf
- Escobar, J., Lora, E., Venturini, O., Yáñez, E., Castillo, E., & Almazan, O. (2009). Biofuels: Environment, technology and food security. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13(6-7), 1275-1287. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2008.08.014>
- Fermentis. (2022). *The ideal yeast for english & american ales, with balanced fruity notes*. <https://fermentis.com/en/product/safale-s-04/>
- Fernando, S., Alina, J., Arenas, G., & Sebastian, P. (2018). Evaluación de la producción de bioetanol a partir de desechos agroindustriales de plátano (*Musa paradisiaca* L.). *Academia Journals*, 14, 2277-2286. <https://static1.squarespace.com/static/55564587e4b0d1d3fb1eda6b/t/6009dda1a5bc415d6d6faabae/1611259311356/Compendio+de+Investigaci%C3%B3n+Academia+Journals+Chetumal+2018+-+Tomo+14.pdf>
- García, P., & Garza, Y. (2016). Sacarificación y fermentación simultánea de olote pretratado. *Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias*, 5(9). <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5590218>
- Gupta, A., & Verma, P. (2015). Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, 550-567. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.08.032>
- Herrera, J., Villa, L., Olaya, A., & García, L. (2020). Extracción de almidón de cáscara de cacao *Theobroma cacao* L. como alternativa de bioprospección. *Revista ION*, 33(2), 25-34. <https://doi.org/10.18273/revion.v33n2-2020002>
- León, E. (2020). *Diseño de la cadena de suministro para la generación de bioetanol a partir de biomasa agrícola en la región de Tulancingo* [Tesis de grado, Universidad Politécnica de Tulancingo]. http://www.upt.edu.mx/Contenido/Investigacion/Contenido/TESIS/DOP/2020/DOPT_T_2020_01_ELO.pdf
- Liu, M., Qin, L., Zhu, J., Li, B., & Yuan, Y. (2017). Simultaneous saccharification and fermentation of steam-exploded corn stover at high glucan loading and high temperature. *Biotechnol Biofuels*; 7, 167. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4267439/>
- Lizarazo, S., Hurtado, G., & Rodríguez, L. (2015). Análisis técnico económico de la producción de bioetanol a partir de papa a nivel de laboratorio en Boyacá. *Revista Colombiana de ciencias hortícolas*, 9(1), 97-111. <http://dx.doi.org/10.17584/rcch.2015v9i1.3749>
- Loayza, K. (2020). *Determinación de las condiciones óptimas de fermentación para la obtención de bioetanol a partir del hidrolizado ácido de la corteza de cacao (Theobroma cacao) proveniente de la industria cacaotera del Ecuador* [Tesis de grado, Universidad Politécnica Salesiana]. DSpace en UPS.
- Mansur, A., Oh, J., Lee, H., & Oh, Y. (2021). Determination of ethanol in foods and beverages by magnetic stirring-assisted aqueous extraction coupled with GC-FID: A validated method for halal verification. *Food Chemistry*, 366, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130526>
- Mayoral, C. (2019). *Valorización de la cascarilla de cacao, residuo de la industria chocolatera, para su empleo como sustrato en procesos fermentativos* [Tesis de maestría, Universidad de Oviedo]. <https://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/handle/10651/59511/TFM%20MBTA%20CRISTINA%20BORRALLO%20MAYORAL.pdf?sequence=4>
- Melendez, J., Velasquez, J., El Salous, A., & Peñalver, A. (2021). Gestión para la Producción de biocombustibles 2G: revisión del escenario tecnológico y económico. *Revista Venezolana de Gerencia*, 26(93), 78-91. <https://www.redalyc.org/journal/290/29066223006/html/>
- Merck. (s.f.). Cellulase from *Aspergillus niger*. https://www.sigmaaldrich.com/specification-sheets/369/099/C1184-BULK____SIGMA____.pdf
- Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426-428.
- Montañez, J., Victoria, J., Flores, R., & Vivar, M. (2011). Fermentación de los fructanos del Agave tequilana Weber Azul por *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae* en la producción de bioetanol. *Información Tecnológica*, 22(6), 3-14. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/infotec/v22n6/art02.pdf>
- Montañez, L. (2020). Cuantificación de azúcares reductores del sustrato en residuos de piña con el método del ácido 3, 5-dinitrosalicílico. *Revista de Investigación*, 13(1), 57-66. <https://doi.org/10.29097/23461098.308>
- Monroy, L., Zambrano, M., Latorre, G., & Rosero, E. (2021). Producción de etanol celulósico a partir de la conversión de residuos agrícolas. *Ingeniar*, 4(8), 128-143. <https://doi.org/10.46296/ig.v4i8.0031>
- Monsalve, J., Medina, V., & Ruiz, A. (2006). Producción de etanol a partir de la cáscara de banano y de almidón de yuca. *SciELO*, 73(150), 21-27. <http://www.scielo.org.co/pdf/dyna/v73n150/a02v73n150.pdf>
- Murcia, J., Ardila, A., & Barrera, R. (2020). Producción de etanol a partir de piñas de rechazo de cultivos del Chocó. *Revista ION*, 33(1), 47-56. <https://doi.org/10.18273/revion.v33n1-2020005>
- Olivo, M., Díaz, B., Haro, C., & Borrás, M. (2021). Optimización De La Hidrólisis Para El Tratamiento De Residuos Lignocelulósicos Con Enzimas De *Aspergillus Niger*. *Ciencia en Desarrollo*, 12(1), 99-111. <https://doi.org/10.19053/01217488.v12.n1.2021.12820>
- Organización mundial de la salud. (30 de octubre de 2021). *Cambio climático y salud*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/climate-change-and-health>

- Patiño, K., & Torres, S. (2021). *Alternativa de Obtención De Etanol A Partir De Los Desechos De Piña Generados Por Industrias Karpos Sas* [Tesis de grado, Universidad de América]. Repositorio de América.
- Pinos, C. (2019). *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* [Tesis de grado, Universidad San Francisco de Quito]. Repositorio de USFQ.
- Sassner, P., Galbe, M., & Zacchi, G. (2006). Bioethanol production based on simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated salix at high dry-matter content. *Enzyme Microbial Technol. Enzyme and Microbial Technology*, 39(4), 756-762. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141022905005491>
- Sigüenza, J., Delgado, W., Posso, R., & Sánchez, P. (2020). Estimación del potencial de producción de bioetanol a partir de los residuos de la corteza del cacao en Ecuador. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 21(3), 1-20. https://doi.org/10.21930/rcta.vol21_num3_art:1429
- Sinche, D., Ramírez, V., & Velnalcázar, M. (2022). Sacarificación y fermentación simultánea de la cáscara de *Jatropha curcas* pretratada hidrotérmicamente para producción de bioetanol. *Ingeniería*, 32(1), 19-32. <https://dx.doi.org/10.15517/ri.v32i1.46884>
- Tejeda, L., Marimón, W., & Medina, M. (2014). Evaluación del potencial de las cáscaras de frutas en la obtención de bioetanol. *Hechos Microbiol.*, 5(1), 4-9. <https://revistas.udea.edu.co/index.php/hm/article/view/323244/20780454>
- Vásquez, S. (2019). *Obtención de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica presente en la cascarilla del arroz para ser utilizados en equipos motorizados* [Tesis de grado, Universidad Politécnica Salesiana]. DSpace en UPS
- Villanueva, P., & Garza, Y. (2016). Sacarificación y fermentación simultánea de olote pretratado. *Revista Iberoamericana de las Ciencias biológicas y Agropecuarias*, 5(9), 53-67. <https://www.ciba.org.mx/index.php/CIBA/article/view/50>
- Zabed, H., Sahu, J., Suely, A., Boyce, A., & Faruq, G. (2017). Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 71, 475-501. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.076>
- Zhu, S., Wu, Y., Yu, Z., Zhanp, X., Wang, C., Yu, F., Jin, S., Zhao, Y., Tu, S., & Xue, Y. (2005). Simultaneous Saccharification and Fermentation of Microwave/Alkali Pre-treated Rice Straw to Ethanol. *Biosystems Engineering*; 92(2), 229-235. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1537511005001315>
- Zola, M., & Barranzuela, M. (2017). *Estudio experimental de la obtención de bioetanol a partir de cáscara de plátano en Piura, Perú* [Tesis de grado, Universidad de Piura]. Repositorio institucional PIRHUA.