

ZAMBRANO PAZ KEVIN ADRIÁN

Solorzano Ponce Carmen Adela | Ernesto Alonso Rosero Delgado  
Christhel Andrade | Julio Torres | Yulixis Cano | Larissa Sacoto  
Efrain Pérez Vega | Johan Vicente Cusme Candela  
Moreira Vasquez Carmen María | Alcivar Pinargote Bescy Keila  
García Palma Andrea Valeria

# Guia para la Evaluación y Ajuste de la Hidrólisis Enzimática en Biomasa Lignocelulósica para la Producción de **BIOETANOL LIGNOCELULÓSICO**



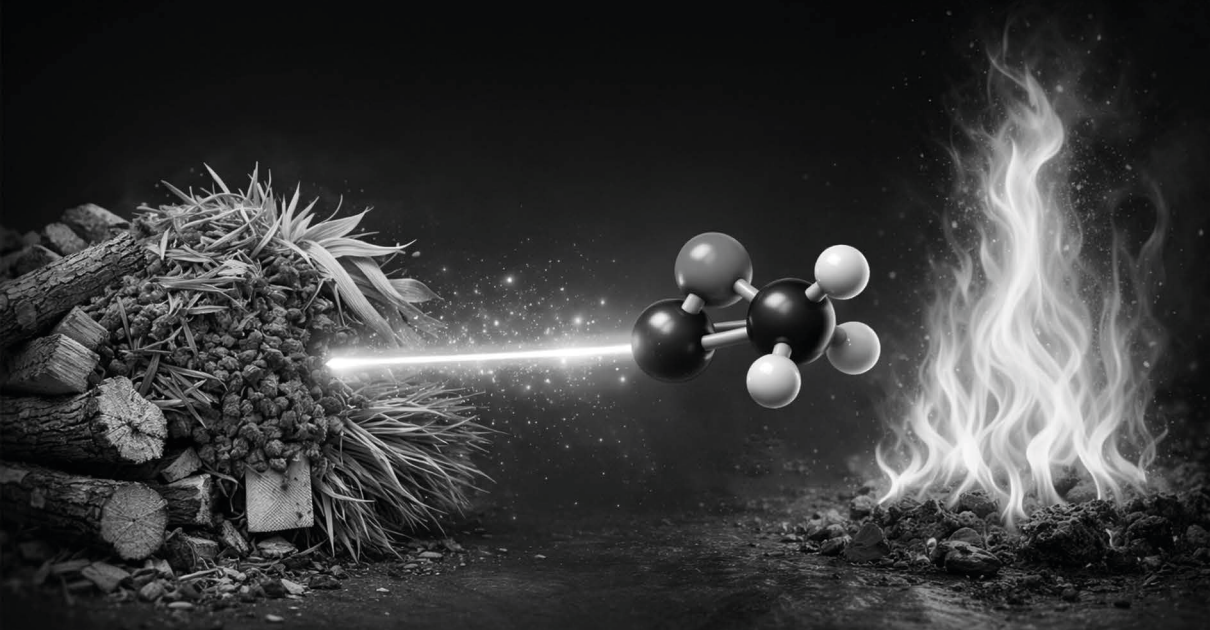
## **Organizadores**

ZAMBRANO PAZ KEVIN ADRIÁN  
Solorzano Ponce Carmen Adela

ZAMBRANO PAZ KEVIN ADRIÁN

Solorzano Ponce Carmen Adela | Ernesto Alonso Rosero Delgado  
Christhel Andrade | Julio Torres | Yulixis Cano | Larissa Sacoto  
Efrain Pérez Vega | Johan Vicente Cusme Candela  
Moreira Vasquez Carmen María | Alcivar Pinargote Bescy Keila  
García Palma Andrea Valeria

# Guia para la Evaluación y Ajuste de la Hidrólisis Enzimática en Biomasa Lignocelulósica para la Producción de **BIOETANOL LIGNOCELULÓSICO**



## **Organizadores**

ZAMBRANO PAZ KEVIN ADRIÁN  
Solorzano Ponce Carmen Adela

2025 por Atena Editora

Copyright© 2025 Atena Editora

Copyright del texto © 2025, el autor Copyright  
de la edición© 2025, Atena Editora

Los derechos de esta edición han sido cedidos a Atena Editora por el autor.

*Publicación de acceso abierto por Atena Editora*

**Editora jefe**

Prof. Dr. Antonella Carvalho de Oliveira

**Editora ejecutiva**

Natalia Oliveira Scheffer

**Imágenes de la portada**

iStock

**Edición artística**

Yago Raphael Massuqueto Rocha



Todo el contenido de este libro está licenciado bajo la licencia  
Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).

Atena Editorial mantiene un firme compromiso con la transparencia y la calidad en todo el proceso de publicación. Trabajamos para garantizar que todo se realice de manera ética, evitando problemas como plagio, manipulación de información o cualquier interferencia externa que pueda comprometer la obra.

Si surge alguna sospecha de irregularidad, será analizada con atención y tratada con responsabilidad.

El contenido del libro, textos, datos e informaciones, es de total responsabilidad del autor y no representa necesariamente la opinión de Atena Editorial. La obra puede descargarse, compartirse, adaptarse o reutilizarse libremente, siempre que se mencionen el autor y la editorial, de acuerdo con la Licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0).

Cada trabajo recibió la atención de especialistas antes de su publicación.

El equipo editorial de Atena evaluó las producciones nacionales, y revisores externos analizaron los materiales de autores internacionales.

Todos los textos fueron aprobados con base en criterios de imparcialidad y responsabilidad.

# Guia para la Evaluación y Ajuste de la Hidrólisis Enzimática en Biomasa Lignocelulósica para la Producción de Bioetanol

## | Autores:

Julio Cesar Torres Puentes

## | Revisión:

El autor

## | Diseño:

Thamires Camili Gayde

## | Portada:

Yago Raphael Massuqueto Rocha

### Datos de catalogación en publicación internacional (CIP)

G943 Guía para la evaluación y ajuste de la hidrólisis enzimática en biomasa lignocelulósica para la producción de bioetanol lignocelulósico / Organizadores Zambrano Paz Kevin Adrián, Solorzano Ponce Carmen Adela. – Ponta Grossa - PR: Atena Editora, 2026.

Formato: PDF

Requisitos del sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acceso: World Wide Web

Incluye bibliografía

ISBN 978-65-258-3925-7

DOI: <https://doi.org/10.22533/at.ed.257261401>

1. Hidrólisis enzimática. 2. Biomasa lignocelulósica.  
3. Producción de bioetanol. I. Paz, Kevin Adrián  
Zambrano (Organizador). II. Ponce, Carmen Adela  
Solorzano (Organizador). III. Título.

CDD 662.88

**Preparado por Bibliotecario Janaina Ramos – CRB-8/9166**

## Atena Editora

+55 (42) 3323-5493

+55 (42) 99955-2866

[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)

[contato@atenaeditora.com.br](mailto:contato@atenaeditora.com.br)

# CONSELHO EDITORIAL

## CONSELHO EDITORIAL

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano  
Profª Drª Amanda Vasconcelos Guimarães – Universidade Federal de Lavras  
Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás  
Profª Drª Ariadna Faria Vieira – Universidade Estadual do Piauí  
Prof. Dr. Arinaldo Pereira da Silva – Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará  
Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás  
Prof. Dr. Cirênio de Almeida Barbosa – Universidade Federal de Ouro Preto  
Prof. Dr. Cláudio José de Souza – Universidade Federal Fluminense  
Profª Drª Daniela Reis Joaquim de Freitas – Universidade Federal do Piauí  
Profª Drª. Dayane de Melo Barros – Universidade Federal de Pernambuco  
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Profª Drª Érica de Melo Azevedo – Instituto Federal do Rio de Janeiro  
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará  
Prof. Dr. Fabrício Moraes de Almeida – Universidade Federal de Rondônia  
Profª Drª Glécilla Colombelli de Souza Nunes – Universidade Estadual de Maringá  
Prof. Dr. Humberto Costa – Universidade Federal do Paraná  
Prof. Dr. Joachin de Melo Azevedo Sobrinho Neto – Universidade de Pernambuco  
Prof. Dr. João Paulo Roberti Junior – Universidade Federal de Santa Catarina  
Profª Drª Juliana Abonizio – Universidade Federal de Mato Grosso  
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense  
Profª Drª Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Paraná  
Profª Drª Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará  
Prof. Dr. Sérgio Nunes de Jesus – Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia  
Profª Drª Talita de Santos Matos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Dr. Tiago da Silva Teófilo – Universidade Federal Rural do Semi-Árido  
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

# RESUMEN

## RESUMEN

La conversión de residuos agrícolas en bioetanol, requiere de hidrólisis enzimática, para conseguir una mayor degradación de carbohidratos vegetales en azúcares simples. Sin embargo, esta etapa aún necesita mayor investigación para alcanzar condiciones óptimas que permitan que la producción de bioetanol a escala comercial sea viable. En este sentido, se evaluó el efecto de la temperatura y carga enzimática en la hidrólisis enzimática de cáscara de piñón (*Jatropha curcas*) y pseudotallo de *Musa x paradisiaca* (*Musa paradisiaca*). Para este fin, se realizó el análisis proximal y elemental de la materia prima. Posteriormente se pretrató la biomasa con NaOH al 3% en relación 1:6 a 120 °C y 1 atm de presión por 90 minutos. El hidrolizado químico fue sometido a hidrólisis enzimática, con celulasa de *Aspergillus niger* a un pH 5,2 por 120 horas de incubación. Se evaluó el efecto de la carga enzimática (5, 15 y 25 FPU/g sustrato) y la temperatura (27, 37 y 47°C) en la concentración de azúcares reductores, a partir de un diseño factorial 3<sup>2</sup>. Los resultados mostraron que a 47°C y cargas enzimáticas de 25 y 21,9 FPU/g biomasa para la cascara de *Jatropha curcas* y pseudotallo de *Musa x paradisiaca*, se alcanza el máximo rendimiento en azúcares reductores ( $2,431 \pm 0,0067$  y  $3,0398 \pm 0,099$  g/l). La mayor concentración de bioetanol obtenida fue de 2,45 ml/l a partir de pseudotallo de *Musa x paradisiaca* y 2,36 ml/l para la cáscara de *Jatropha curcas*.

**Palabras-clave:** Azúcares reductores, bioetanol, hidrólisis enzimática, celulasa, biomasa lignocelulósica.



# SUMMARY

## SUMMARY

### EVALUATION OF THE EFFECT OF ENZYMATIC HYDROLYSIS PARAMETERS ON LIGNOCELLULOSIC BIOETHANOL PRODUCTION

The conversion of agricultural residues into bioethanol requires enzymatic hydrolysis to achieve a greater degradation of vegetable carbohydrates into simple sugars. However, this stage still needs further research to achieve optimal conditions that allow the production of bioethanol on a commercial scale to be viable. In this sense, the effect of temperature and enzymatic load on the enzymatic hydrolysis of pine nut shell (*Jatropha curcas*) and pseudostem of *Musa x paradisiaca* (*Musa paradisiaca*) was evaluated. For this purpose, the proximal and elemental analysis of the raw material was carried out. Subsequently, the biomass was pretreated with 3% NaOH in a 1:6 ratio at 120 °C and 1 atm of pressure for 90 minutes. The chemical hydrolyzate was subjected to enzymatic hydrolysis with *Aspergillus niger* cellulase at pH 5.2 for 120 hours of incubation. The effect of the enzymatic load (5, 15 and 25 FPU/g substrate) and the temperature (27, 37 and 47°C) on the concentration of reducing sugars were evaluated, from a factorial design 32. The results showed that at 47 °C and enzyme loads of 25 and 21.9 FPU/g biomass for the peel of *Jatropha curcas* and pseudostem of *Musa x paradisiaca*, the maximum yield in reducing sugars is reached ( $2.431 \pm 0.0067$  and  $3.0398 \pm 0.099$  g/ he). The highest concentration of bioethanol obtained was 2.45 ml/l from *Musa x paradisiaca* pseudostem and 2.36 ml/l for *Jatropha curcas* peel.

**Keywords:** Reducing sugars, bioethanol, enzymatic hydrolysis, cellulase, lignocellulosic residues.

# ÍNDICE

## ÍNDICE

<b>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
Objetivo General.....	2
Objetivos específicos .....	2
JUSTIFICACIÓN .....	3
<b>CAPÍTULO II: MARCO REFERENCIAL.....</b>	<b>4</b>
ANTECEDENTES.....	4
MARCO TEÓRICO.....	5
Características de la materia prima utilizada para elaboración de bioetanol 2G .....	5
Pseudotallo de <i>Musa x paradisiaca</i> : .....	5
Cáscaras de piñón .....	6
Biomasa lignocelulósica .....	7
Celulosa .....	7
Hemicelulosa.....	7
Lignina.....	8
Bioetanol como biocombustible.....	8
Propiedades fisicoquímicas del bioetanol.....	8
Bioetanol de primera generación .....	9
Bioetanol de segunda generación.....	10
Bioetanol de tercera generación .....	10
Bioetanol de cuarta generación.....	10
Etapas de producción de bioetanol de segunda generación.....	10
Pretratamiento .....	10
Hidrólisis enzimática .....	11
Fermentación alcohólica .....	11
Destilación. ....	12



# ÍNDICE

## ÍNDICE

<b>CAPÍTULO III: DISEÑO METODOLÓGICO.....</b>	<b>13</b>
Hipótesis.....	14
Identificación De Variables.....	14
Variables Independientes.....	14
Variables Dependientes.....	14
Operacionalización De Variables.....	14
MÉTODOS.....	15
Acondicionamiento de la materia prima .....	15
Pretratamiento químico.....	16
Hidrólisis Enzimática .....	16
Fermentación alcohólica.....	17
Estequiometria y cinética de fermentación .....	18
Destilación .....	18
TÉCNICAS.....	18
Caracterización de materiales elemental (CHONS).....	18
Determinación de fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA) y lignina detergente ácida (LDA).....	18
Determinación de azúcares reductores. ....	20
Medición de Potencial de hidrógeno (pH).....	20
Detección de bioetanol por cromatografía gaseosa.....	20
Ensayos Estadísticos.....	21
Materiales o Reactivos.....	21
Materiales e instrumentos.....	21
Reactivos e insumos.....	21

# ÍNDICE

## ÍNDICE

<b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>22</b>
Pretratamiento Básico .....	25
Hidrólisis Enzimática.....	26
Hidrólisis Enzimática de cáscara de <i>Jatropha curcas</i> .....	26
Hidrólisis Enzimática de Pseudotallo de <i>Musa x paradisiaca</i> .....	27
Interacción de las variables del Proceso. ....	28
Fermentación Alcohólica .....	31
Fermentación alcohólica de cáscara de <i>Jatropha curcas</i> .....	31
Fermentación alcohólica de pseudotallo de <i>Musa x paradisiaca</i> . ....	32
Balance de Masa.....	34
<b>CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>35</b>
Conclusiones.....	35
Recomendaciones .....	35
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>37</b>
<b>AUTORES.....</b>	<b>47</b>



# CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

La explotación indiscriminada de combustibles fósiles, ha agudizado los problemas de calentamiento global, contaminación ambiental y escasez de energéticos (Mohd Azhar et al, 2017). Esto ha llevado a la creación de políticas internacionales para aminorar la emisión de gases de efecto invernadero (GEI) y aumentar el uso de bioenergías, con el fin de desplazar el carbono fósil por carbono biogénico (al Rayaan, 2021).

El bioetanol es un combustible oxigenado que se obtiene a partir de la fermentación de jarabes glucosados, provenientes de recursos sostenibles, como la biomasa de residuos lignocelulósicos, cuyo uso se fomenta por su vasta disponibilidad, bajos costos, tasa de reposición rápida y nula afectación al sector alimenticio por uso del suelo (Xu et al, 2018). Según la RFA (2022), en 2021 el empleo de bioetanol desplazó alrededor de 530 millones de barriles de crudo en EE UU, no obstante, menos del 4% se originó por medio de residuos celulósicos. Esto podría deberse a barreras técnicas, que impiden alcanzar altos rendimientos y provocan costos bastante elevados del proceso productivo.

Las celulasas son un grupo complejo de enzimas, secretadas por una amplia gama de microorganismos (hongos, bacterias y actinomicetos) (Jayasekara & Ratnayake, 2019). Estas catalizan naturalmente la hidrólisis de la celulosa, un polímero de D-glucosa con enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 formados por largas cadenas lineales (microfibrillas) unidas por puentes de hidrógeno, lo que da lugar a una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y regiones amorfas ideales para la degradación enzimática (Noel et al., 2014).

La conversión de biomasa lignocelulósica en bioetanol 2G, es posible a partir, de una serie de etapas, que consisten en; I) Pretratamiento, empleando métodos físicos, químicos o biológicos para abrir la estructura recalcitrante de la lignocelulosa (Rezania et al., 2020). II) hidrólisis enzimática, la cual tradicionalmente emplea enzimas celulasas que actúan sinérgicamente en la degradación de los polímeros de celulosa y hemicelulosa en glucosa y xilosa, respectivamente (Mohnot et al., 2016) III) fermentación de los azúcares del hidrolizado en bioetanol, CO<sub>2</sub> y energía por medio

de la acción catalítica de levaduras o bacterias y IV) La destilación, encargada de purificar el bioetanol hidratado a un 95 - 99,99% de concentración (Benítez, 2017).

La cáscara de *Jatropha curcas* constituye entre el 30 y 40 % en peso seco del fruto, es obtenida principalmente, en el procesamiento de aceite combustible, donde únicamente es utilizada la semilla (17% peso seco) y el restante es desechado (Odeto et al, 2018). Por otra parte, el banano al ser uno de los productos más consumidos en el mundo, origina una inmensa cantidad de residuos orgánicos, siendo el pseudotallo el desperdicio que se genera en mayor proporción (1 tonelada de banano recolectado produce 3 toneladas de pseudotallo) (Redondo et al., 2020). El uso de enzimas para hidrólisis de biomasa de la cáscara de piñón y el pseudotallo de *Musa x paradisiaca* en la producción de bioetanol, ha sido evaluado en trabajos previos. Sin embargo, aún es necesario investigar en mayor medida, la optimización de las condiciones de operación para mitigar las barreras técnicas del proceso y mejorar rendimientos.

Este estudio pretende evaluar el efecto de la temperatura y carga enzimática durante la hidrólisis de biomasa residual de pseudotallo de *Musa x paradisiaca* (*Musa paradisiaca*) y cáscara de piñón (*Jatropha curcas*), con el fin de establecer las condiciones que favorecen la degradación de las cadenas complejas de carbono en azúcares simples, que posteriormente son fermentados en bioetanol.

## Objetivo General

Evaluar el efecto de los parámetros de hidrólisis enzimática en la producción de bioetanol lignocelulósico a partir de los residuos de pseudotallo de *Musa x paradisiaca* y cáscara *Jatropha curcas*.

## Objetivos específicos

- I Realizar la caracterización fisicoquímica de la biomasa residual de pseudotallo de *Musa x paradisiaca* y cáscara de piñón, como fuentes potenciales de azúcares reductores.
- I Establecer las condiciones de hidrólisis enzimática que aportan una mayor conversión de celulosa en azúcares reductores.
- I Evaluar la cinética de fermentación en la producción de bioetanol 2G.

## JUSTIFICACIÓN

Los combustibles fósiles proveen alrededor del 86,4% de la energía utilizable en el mundo. Sin embargo, estos se relacionan con problemas ambientales, riesgos de escasez e inestabilidad de precios y mercados, motivo por el cual, en la actualidad, se busca el cambio hacia recursos renovables y economías bajas en carbono (Martins et al., 2019).

Por otra parte, se estima que el sector agrícola es responsable de alrededor del 24% de las emisiones de GEI (FAO, 2017), además de provocar cantidades indiscriminadas de desechos sólidos lo cual constituye una amenaza para la salud y los ecosistemas silvestres. En torno a esto, hoy en día, se invierten esfuerzos por conseguir la viabilidad técnica y económica del uso de biomasa lignocelulósica como fuente de azúcares para su conversión en bioetanol.

No obstante, la obtención de bioetanol 2G, se ve limitada debido a la complejidad de etapas críticas que comprenden su elaboración y a los altos costos productivos, ligados principalmente a pretratamientos fisicoquímicos y al consumo de enzimas (Traverso et al., 2020). La optimización sinérgica de la hidrólisis enzimática produce especial preocupación, puesto que los efectos de la temperatura, tiempo y acidez son dependientes entre sí y se desarrollan en direcciones opuestas, pudiendo provocar bajos rendimientos, si no se trabaja en proporciones adecuadas (Neto et al., 2018).

En el presente estudio, se hace uso de pseudotallo de *Musa x paradisiaca* y cáscara de piñón para evaluar la influencia de la temperatura y carga de enzimas sobre la concentración de azúcares en la etapa de hidrólisis enzimática y el rendimiento final de bioetanol, de manera que se consiga otorgar un valor agregado a los residuos agroindustriales, los cuales son normalmente desaprovechados y vistos como un foco de contaminación.



## CAPÍTULO II: MARCO REFERENCIAL

### ANTECEDENTES

La creciente demanda energética a nivel mundial y los efectos negativos del cambio climático, han incrementado el interés en combustibles alternativos, sostenibles, respetuosos con el medio ambiente y rentables (Harun y Danquah, 2011). Entre los cuales, el bioetanol de segunda generación, ha tomado significativa relevancia, sin embargo, la obtención de dicho insumo data de 1819 y se atribuye a Henri Braconnot, quien logró liberar azúcares fermentables de biomasa a partir de un tratamiento con ácido sulfúrico (Smith, 2019). Por otra parte, debido al rápido desarrollo de las biotecnologías con enzimas, en las últimas dos décadas, la hidrólisis química se ha visto desplazada por la hidrólisis enzimática (Carrigan, 2016). No obstante, este último requiere un proceso más riguroso y delicado para alcanzar una conversión efectiva de azúcares.

Harun y Danquah, (2011) En su estudio examinaron la hidrólisis enzimática de *Chlorococcum* sp. mediante el uso de celulasa del tipo *Trichoderma reesei*, ATCC 26921. Llevando a cabo la hidrólisis en condiciones variables de temperatura, pH y concentración de sustrato, con dosificación de enzima constante. Obteniendo un mayor rendimiento de glucosa de 64,2 % (p/p) se obtuvo a una temperatura de 40 °C, pH 4,8 y una concentración de sustrato de 10 g/L de biomasa de microalgas. Demostrando que el proceso de hidrólisis enzimática demostró ser un mecanismo eficaz para mejorar el proceso de sacarificación de la biomasa de lignocelulósica.

Tan y Lee, (2014) En su investigación se realizó la producción de bioetanol utilizando desechos sólidos de algas. Se utilizaron dos procesos diferentes: el proceso SHF (hidrólisis y fermentación separadas) y el proceso SSF (sacarificación y fermentación simultánea). Para el proceso SHF, la hidrólisis enzimática se realizó variando tres variables de proceso, concentración de sustrato, pH y temperatura, Manteniendo constante la dosificación de enzima. El mayor rendimiento de glucosa del 99,8 % se obtuvo a pH 4,8, una temperatura de 50 °C y una concentración de sustrato de 2 % (p/v) de residuos sólidos de algas. Con la fermentación posterior se obtuvo un rendimiento de bioetanol del 55,9%. En cambio, para el proceso SSF se obtuvo un rendimiento de 90,9% de bioetanol.

En la investigación realizada por Hoşgün y Bozan, (2020) Utilizaron cáscaras de avellana que fueron pretratadas con ácido ( $1\% \text{H}_2\text{SO}_4$ ), álcali ( $2.25\% \text{NaOH}$ ) y vapor a diferentes temperaturas ( $120, 150$  y  $200^\circ\text{C}$ ) y tiempos de pretratamiento ( $15, 30$  y  $60$  min). Las cáscaras de avellana pretratadas se sometieron a hidrólisis enzimática con una mezcla de celulasa ( $60 \text{ FPU/g}$  de biomasa seca) y  $\beta$ -glucosidasa ( $40 \text{ CBU/g}$  de biomasa seca). En comparación con el pretratamiento con ácido y vapor, el pretratamiento con  $\text{NaOH}$  al  $2.25\%$  proporcionó la mayor eliminación de lignina ( $73.28\%$ ) a  $200^\circ\text{C}$  durante  $60$  min. Casi el  $60\%$  de celulosa y el  $100\%$  de hemicelulosa solubilizada después del pretratamiento de cáscaras de avellana con  $1\%$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a  $200^\circ\text{C}$ . La recuperación de celulosa fue mayor en la biomasa pretratada con vapor ( $76.25\%$  a  $200^\circ\text{C}$ ,  $60$  min). La mayor recuperación de glucosa ( $58.66\%$ ) se logró a  $150^\circ\text{C}$  durante un tiempo de pretratamiento de  $60$  min en las cubiertas pretratadas con álcali. Demostrando que el pretratamiento con  $\text{NaOH}$  de las cáscaras de avellana es superior a los pretratamientos con ácido y vapor en términos de recuperación de glucosa y eficiencia energética.

## MARCO TEÓRICO

### Características de la materia prima utilizada para elaboración de bioetanol 2G

La utilización de residuos agrarios como fuente alternativa para la producción de bioetanol tiene varios beneficios: ayuda a diversificar las fuentes de materia prima, permite aprovechar residuos que actualmente no tienen un uso productivo y contribuye a reducir la dependencia de combustibles fósiles. Además, el uso de residuos agrarios para la producción de bioetanol también puede tener un impacto positivo en la economía local y en el medio ambiente al reducir la cantidad de residuos que se generan en las granjas y al disminuir las emisiones de gases de efecto invernadero.

#### Pseudotallo de *Musa x paradisiaca*:

El banano (*Musa paradisiaca*) es uno de los frutos más demandados, solo en 2020 sus exportaciones alcanzaron  $21,7$  millones de toneladas, siendo Ecuador el mayor proveedor de esta fruta en el mundo, con un total de  $7$  millones de toneladas (FAO, 2020). Durante las etapas de cosecha y postcosecha del banano, se generan enormes cantidades de biomasa lignocelulósica que se conocen como Biomasa Residual Agrícola (BRA), como hojas, pseudotallos, bellotas, raquis entre otros, que, al carecer de un tratamiento o disposición adecuada, se convierten en contaminantes ambientales (Meneses et al., 2010).



Las hojas y el pseudotallo representan más del 60% de la biomasa seca que se produce en plantaciones de banano, ya que por cada tonelada de racimos de banano se producen 3 toneladas de pseudotallo y 480 kg de hojas, considerando de gran pertinencia y aplicación estudiar alternativas de aprovechamiento de los residuos de la cosecha y postcosecha de las plantaciones de plátano o banano (Murgueitio et al, 2019).

Al igual que los demás biomasa lignocelulósica, el pseudotallo de *Musa x paradisiaca* está compuesto principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina (Tabla 1) que se encuentran envueltos en una compleja estructura (Legodi et al., 2021). Lo cual ha llamado la atención, por su potencial aplicación como sustrato en bioprocesos como obtención de bio-aceite y bio-carbón por medio de pirólisis (Wang et al., 2022), producción de enzimas lignocelulolíticas y metabolitos de alto valor agregado (Patel et al., 2021), obtención de ácido cítrico a partir de sacarificación simultánea (Laltha et al., 2022) y la producción de bioetanol 2G por medio de hidrólisis enzimática y fermentación alcohólica (Legodi et al., 2021).

## Cáscaras de piñón

En Ecuador, la *Jatropha curcas* es conocida como “Piñón” y es usada como cercas vivas en áreas rurales agrícolas de la zona costera, principalmente en la provincia de Manabí, donde se dispone de aproximadamente 7000 km de cercas vivas de *Jatropha curcas* que pueden producir entre una a diez toneladas de semilla dependiendo de la edad de las plantas, las condiciones del suelo y el uso del riego (Ramírez et al, 2019).

La semilla de piñón ha sido ampliamente estudiada como materia prima para la obtención de aceite utilizado como combustible en mezclas con diésel o para la producción de biodiésel. Sin embargo, esta actividad genera gran cantidad de biomasa lignocelulósica, como la cascarilla que envuelve la semilla y la cáscara del fruto (Odetoye et al, 2018). En 2020, se recolectaron 300.000 kg de fruto de piñón seco en la provincia de Manabí, estimándose una generación de 116.160 kg de cáscara, considerando que la cáscara representa entre el 30 y 40 % del fruto seco. Sin embargo, estas no tienen un mecanismo de gestión de eliminación actual, lo que lleva a problemas de gestión de residuos (Sínche y Ramírez, 2022). Por otra parte, la composición en celulosa, hemicelulosa y lignina de este material (Tabla 2), ha llamado la atención como sustrato para bioprocesos como la generación de bio-aceite por medio de pirólisis (Patel et al., 2018), creación de pellets a partir de la mezcla de bio-carbón y cáscara de *Jatropha curcas* (Ramírez et al., 2019) y la producción de etanol de segunda generación (Sujan et al, 2019).

## Biomasa lignocelulósica

La biomasa orgánica originada en un proceso biológico espontáneo o provocado, puede emplearse como fuente de energía que comprende un amplio conjunto de materias orgánicas caracterizado por su heterogeneidad en lo relativo a origen y naturaleza (Gómez, 2018). La biomasa lignocelulósica y los subproductos agroindustriales han dejado de ser considerados desechos, para convertirse en materia prima potencial para diversos procesos tanto de tipo agrícola como industrial, siendo la producción de alcohol carburante uno de los más importantes, ya que dichos biocombustibles se utilizan principalmente como fuente de energía de vehículos a motor y producción de electricidad (Aburto et al., 2008).

Se considera como un hetero-polímero complejo y es el componente estructural de las plantas. Se encuentra en residuos agrícolas, industriales, forestales, municipales, pastos de crecimiento rápido, material vegetal del mar, y biomasa proveniente de zonas semiáridas. La energía almacenada en sus componentes, hacen de la lignocelulosa un compuesto con un enorme potencial biotecnológico energético (Arellano, 2015).

## Celulosa

Constituye entre el 40 - 60% del total del material lignocelulósico. Es un polímero compuesto de unidades  $\beta$ -D-glucopiranosas unidas sucesivamente a través de enlaces glucosídicos en la configuración  $\beta$  (1-4), dando lugar a la unidad de celobiosa que es la unidad más pequeña que se repite exactamente en la cadena polimérica (Mateus, 2011).

## Hemicelulosa

Las hemicelulosas son carbohidratos que forman una estructura polimérica compleja, ramificada que consiste en la unión de diferentes unidades de azúcares: pentosas, hexosas y ácidos de estos azúcares, suele ser un polímero de menor masa molar que la celulosa y más fácilmente hidrolizable debido a su estructura predominantemente amorfa. Las hemicelulosas, al igual que la celulosa, se han perfilado como fuente de azúcares (Guarnizo et al., 2009).

## Lignina

La lignina es uno de los biopolímeros más abundantes en las plantas y junto con la celulosa y la hemicelulosa conforma la pared celular de las mismas en una disposición regulada a nivel nano-estructural, dando como resultado redes de lignina-hidratos de carbono, está presente en todas las plantas vasculares al igual que muchos otros componentes de la biomasa, se forma mediante la reacción de fotosíntesis también está considerada como un recurso renovable asequible y de potencial uso industrial, cuya producción anual se ha estimado en el intervalo de  $5\text{-}36 \times 10^8$  toneladas (Chávez & Domine, 2013).

## Bioetanol como biocombustible

La creciente demanda de recursos energéticos junto con las preocupaciones por el cambio climático ha centrado la atención de los investigadores en la preparación y utilización de biocombustibles (Osman et al., 2021). El bioetanol es el biocombustible más utilizado para el transporte en todo el mundo, ya que posee un alto número de octanaje (92) y contenido de oxígeno (alrededor de 35%) por lo que es utilizado en las gasolinas como potenciador de octanaje, además contribuye a un menor tiempo de combustión y una mezcla pobre en el motor, lo cual reduce las emisiones de hidrocarburos y CO (Awad et al., 2018). En el estudio realizado por Shahad y Wabdan, (2015) se determinó que la mezcla de gasolina y bioetanol reduce las concentraciones de hidrocarburos no quemados y CO de los gases de escape de un motor de encendido con chispa en un 40,15% y 45 % respectivamente. No obstante, para que la obtención de bioetanol sea rentable es necesario considerar su volumen de producción, el rendimiento industrial y el costo de fabricación.

La producción de bioetanol de segunda generación a partir de biomasa lignocelulósica está ganando impulso debido a su mayor potencial de reducción de gases de efecto invernadero en comparación con el bioetanol de primera generación. Sin embargo, todavía representa menos del 3% de la producción total de bioetanol. Los impactos ambientales de la producción de bioetanol de segunda generación dependen de la disponibilidad de materias primas y la tecnología de conversión utilizada. Aún quedan desafíos tecnológicos y económicos por superar antes de que la tecnología sea completamente madura. (Sharma et al., 2020).

## Propiedades fisicoquímicas del bioetanol

El bioetanol es conocido también como alcohol etílico, se caracteriza por ser un líquido incoloro e inflamable con un punto de ebullición de 78 °C. Su fórmula química es  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{OH}$ , su uso es variado, ya que se encuentra presente en las bebidas alcohólicas, antisépticos y biocombustibles. En la tabla 1 se presentan las propiedades fisicoquímicas del alcohol etílico a 100 °C y 1 atm.

**Tabla 1.** *Propiedades fisicoquímicas del bioetanol, diésel, gasolina y biodiésel*

Propiedad del Combustible	Unidades	Bioetanol	Diésel	Gasolina	Biodiésel
Densidad a 15 C	Kg/m <sup>3</sup>	790	837.3	737	880.0
Viscosidad cinemática a 40 C	mm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup>	1.130	2.780	0.593	6
Número de cetano	-	5	47.64	10–15	47–65
Oxígeno	%	34.7	-	0–4	11
Numero de Octano	-	110	10–30	86–94	-25
Calor Latente de vaporización	Kg g <sup>-1</sup>	921.1	370	289	330
Valor calorífico	MJ kg <sup>-1</sup>	25	43.80	34.84	39.40
Punto de Inflamabilidad	°C	13	64, 74	-43	170
Temperatura de Ignición Espontánea	°C	332.8	230.0	257	225
Contenido de Agua	Mg kg <sup>-1</sup>	2024	50	-	-
Relación aire/combustible Estequiométrica	-	1/9.01	1/14.67	1/14.7	1/13.8

Fuente: (Ruiz et al., 2021)

En la tabla 1 se presentan las características fisicoquímicas de los distintos combustibles carburantes en donde se observa que el bioetanol ha mostrado un gran potencial para su uso como combustible alternativo en motores de encendido por chispa y encendido por compresión debido a sus favorables propiedades fisicoquímicas. El bioetanol es un combustible oxigenado por lo que puede reducir las emisiones de partículas de los motores (Coral et al., 2022), también posee un índice de octano más alto, un mayor calor de vaporización y límites de inflamabilidad más amplios, lo que mejora la combustión del combustible, aumenta la relación de compresión y acorta el tiempo de encendido en comparación con la gasolina y el diésel. Desde esta perspectiva el bioetanol es más eficiente que la gasolina y el Diésel por lo que puede ser usado en forma pura en vehículos adaptados o puede ser mezclado al 5% o 10% de etanol en la gasolina (Macias et al., 2022).

## Bioetanol de primera generación

El Bioetanol de primera generación se produce a partir de materias orgánicas ricas en carbohidratos que son destinadas a la alimentación humana o animal, entre los tipos de residuos tenemos; la caña de azúcar, maíz, remolacha y trigo. Implicando la conversión de azúcares o almidones en alcohol (Almeida y Colombo, 2021).

## Bioetanol de segunda generación

El bioetanol de segunda generación se puede producir a partir de biomasa residual, estas materias primas no generan preocupaciones por el mal uso de productos alimenticios a comparación del bioetanol de primera generación, a la vez poseen un bajo costo y estable (Branco et al., 2019).

## Bioetanol de tercera generación

En la producción de Bioetanol de tercera generación se genera a través de vegetales que no están destinados a la alimentación, que poseen una gran capacidad de crecimiento rápido y potencial energético (Tan et al., 2020).

## Bioetanol de cuarta generación

Son aquellos biocombustibles que se obtienen a partir de organismos que han sido genéticamente modificados para lograr mejores rendimientos. Presentan el problema político de que los organismos genéticamente modificados no están permitidos para su comercialización en muchos países (Joelsson et al., 2016).

## Etapas de producción de bioetanol de segunda generación

Para la producción de bioetanol sobre una superficie de biomasa lignocelulósica es una condición previa para que se produzca el proceso de hidrólisis enzimática, las sustancias lignocelulósicas se componen principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina. La matriz de polisacáridos (celulosa y hemicelulosa) es capaz de producir bioetanol. Por lo tanto, se elimina la lignina mediante pretratamientos en donde las enzimas seleccionadas se utilizan para la producción de azúcares reductores a partir de materiales celulósicos, que a su vez se convierten en bioetanol (Baig, 2020).

### Pretratamiento

El método más prometedor para la hidrólisis de celulosa a glucosa es mediante el uso de enzimas llamadas “Celulasas”, para que la materia prima sea accesible a las enzimas, se requiere un tipo de tratamiento que lo facilite (Galbe y Zacchi, 2007). En la etapa de pretratamiento consiste en la descomposición de la estructura rígida de la biomasa y preparar las condiciones para que el cóctel enzimático pueda actuar sobre el material. Provocando la eliminación de la lignina y la hemicelulosa de la matriz lignocelulósica, un aumento en la porosidad de la biomasa y de la superficie, así como la disminución de la cristalinidad de la celulosa (Rojas, 2019).

## Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática de biomasa lignocelulósica consiste en emplear enzimas cuyo origen se encuentra en los hongos celulolíticos, que están adaptados al consumo de este tipo de residuos para la obtención de nutrientes y son capaces de secretar las enzimas necesarias para la descomposición de las estructuras lignocelulósicas (Wojtusik, 2019).

Este proceso se realiza por la acción de diferentes tipos de enzimas, ya sea de forma individual, como proteasas, lipasas, o en forma de complejos enzimáticos, es decir la acción sinérgica de un grupo de enzimas altamente específicas como pectinasas o celulasas, dando como resultado en ambos casos productos monoméricos como glucosa, xilosa, arabinosa, entre otros (Kucharska et al., 2018).

Los productos de la hidrólisis enzimática son generalmente azúcares reductores, como la glucosa, con un costo más bajo en comparación con la hidrólisis ácida o alcalina, generalmente se realiza en condiciones moderadas (pH 4.5 – 5.5 y temperatura de 45 – 55 °C) y no hay problemas relacionados con la corrosión. Tanto las bacterias como los hongos pueden producir celulasas para la hidrólisis de materiales lignocelulósicos (Guo et al., 2019).

Las celulasas suelen ser una mezcla de varias enzimas, en donde se encuentra al menos tres grupos en el proceso de hidrólisis: (1) Endoglucanasa se caracteriza por atacar las regiones de baja cristalinidad en la fibra de celulosa, creando extremos de cadena libres; (2) Exoglucanasa o Celobiohidrolasa se encarga de degradar aún más la molécula al eliminar las unidades de celobiosa de los extremos de cadena libres; (3)  $\beta$ -glucosidasa se basa en hidrolizar la celobiosa para producir glucosa. Las celulasas son producidas por los hongos *Aspergillus Níger* y *Trichoderma reesei*. La fermentación por cultivo sumergido se caracteriza por realizarse en presencia de exceso de agua, la mayoría de enzimas generadas a gran escala se producen por cultivo sumergido, debido a la facilidad y mayor control del manejo del proceso (Sun & Cheng, 2002).

## Fermentación alcohólica

Es utilizada posteriormente al proceso de la hidrólisis enzimática de biomasa para producción de bioetanol, tiene como finalidad biológica proporcionar energía anaeróbica a los microorganismos unicelulares (levaduras) en ausencia de oxígeno para ello disocian las moléculas de glucosa y obtienen la energía necesaria para sobrevivir, produciendo el alcohol y CO<sub>2</sub> como desechos (Vázquez & Dacosta, 2007).

El proceso de fermentación se representa mediante la siguiente ecuación estequiométrica:  $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2$  (Arismendy, 2021).

El microorganismo más utilizado en el proceso de fermentación alcohólica en procesos industriales es la *Saccharomyces cerevisiae*, ha demostrado ser adecuado para la fermentación de hidrolizados lignocelulósicos. El rendimiento de etanol producido dependerá del rendimiento en los azúcares y de la fermentabilidad de la solución (Suárez et al., 2016).

## Destilación.

La destilación es un proceso que consiste en la separación física de una mezcla que tiene puntos de ebullición diferentes, donde se separan preferencialmente los componentes más pesados de la mezcla. Cuando la mezcla líquida de materiales volátiles es calentada, el vapor saliente será más rico en el componente más volátil (básicamente el de menor punto de ebullición) que el líquido desde el cual se generó. A su vez, si un vapor es enfriado, el menos volátil (de mayor punto de ebullición) tendrá la tendencia a condensar en una proporción mayor que el material más volátil (González, 2021).





## CAPÍTULO III: DISEÑO METODOLÓGICO

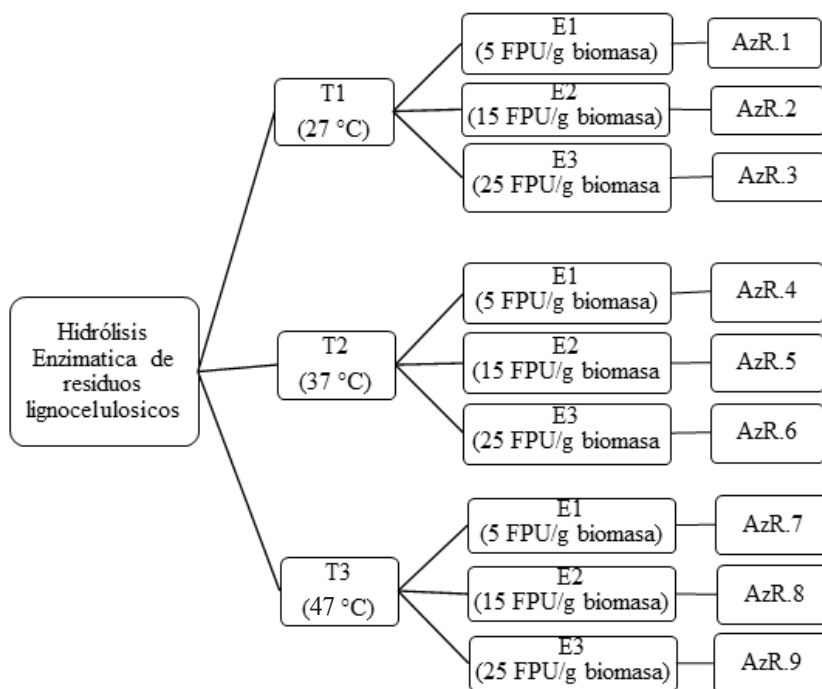


Figura 1. Diseño Experimental

El diseño experimental que se presenta en la Figura 1, en donde se utilizó una sola relación Sólido/Líquido siendo esta de 1/3 y se evaluaron las variables como la concentración Enzima/Sustrato en 5 FPU/ g biomasa, 15 FPU/ g biomasa y 25 FPU/ g biomasa evaluando también 3 diferentes valores de temperaturas que fueron 27 °C, 37 °C y 47 °C para valorar si existe alguna influencia en los rendimientos de obtención de azúcares reductores con un diseño experimental de 3<sup>2</sup> con su respectiva réplica obteniendo un total de 27 muestras para cada residual sumando 54 en total.

## Hipótesis

La temperatura y la carga enzimática inciden en la producción de azúcares reductores durante la etapa de hidrólisis enzimática y en el rendimiento final de bioetanol

## Identificación De Variables

### Variables Independientes

- Temperatura de hidrólisis
- Carga enzimática
- Composición de la materia prima.

### Variables Dependientes

- Liberación de azúcares reductores
- Rendimiento de bioetanol

## Operacionalización De Variables

**Tabla 2.** Obtención de bioetanol de segunda generación

Variables	Dimensiones	Indicadores	Instrumento o técnica	Referencia
Dependiente: Liberación de azúcares reductores	Evaluación fisicoquímica	Concentración de azúcares reductores en relación al tiempo	Método de DNS	(Miller, 1959)
Dependiente: Rendimiento de bioetanol	Evaluación fisicoquímica	Concentración de bioetanol	Cromatografía Gaseosa	(Mansur et al, 2022)
Independiente: Composición de la materia prima	Evaluación fisicoquímica la materia prima	FDN FDA LDA	Analizador de fibra ANKOM 2000	ANKOM Technology Method
		Análisis elemental (CHONS)	Analizador elemental	UNE-EN ISO 16948
Independiente: Temperatura de hidrólisis	Evaluación de la actividad enzimática	Grados Celsius (°C)	Incubadora orbital de temperatura controlada	(Conesa et al, 2018)
Independiente: Carga enzimática	Evaluación de la actividad enzimática	FPU/gr biomasa		(Conesa et al, 2018)

## MÉTODOS

### Acondicionamiento de la materia prima

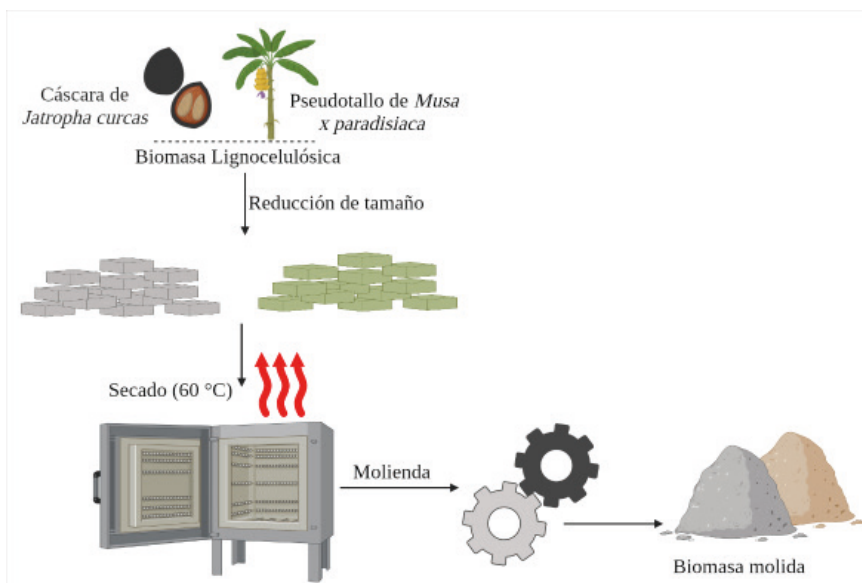


Figura 2. Acondicionamiento de CJC y PMP.

La cáscara de *Jatropha curcas* y el pseudotallo de *Musa paradisiaca* frescos fueron proporcionados por la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí (ESPAM). La metodología aplicada (figura 2), consistió en la eliminación de impurezas con agua de grifo, luego las muestras se cortaron en piezas pequeñas y fueron sometidas a secado en una estufa (Mermmert) a 60 °C hasta peso constante, posteriormente, se redujo el tamaño de partícula en un molino automático de laboratorio (Pro-02), las muestras molidas se pasaron por un tamiz de 1 mm de diámetro, y finalmente, se almacenaron hasta su uso en bolsas de papel a temperatura ambiente, para prevenir la humedad (Legodi et al, 2021). Este proceso se realizó para aumentar la superficie de contacto de las partículas que serán sometidas a hidrólisis, con el fin de mejorar la producción de azúcares.

## Pretratamiento químico

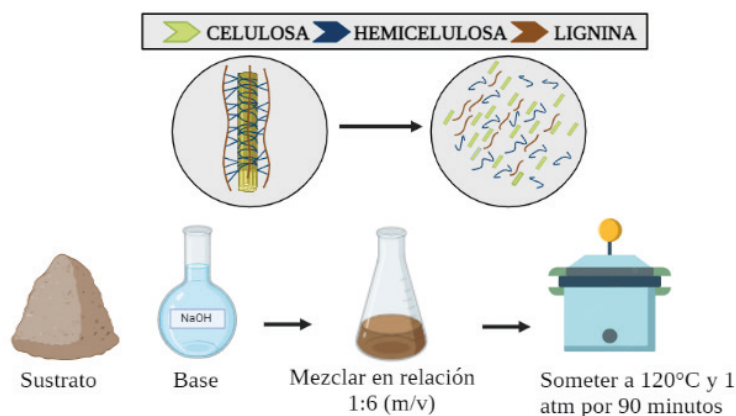


Figura 3. Pretratamiento Básico.

Una vez estandarizada la materia prima, esta se sometió a hidrólisis alcalina (Figura 3) la cual implicó la suspensión de la materia en una solución de NaOH al 3% en proporción 1:6 (m/v), la cual fue esterilizada en autoclave (Biobase de 220V) a 120 °C y 1 atm de presión por 90 minutos según la metodología descrita por (Legodi et al., 2021). Luego se filtró el licor negro residual con gasa estéril y se reguló el pH de la muestra con HCl al 1,6 % hasta  $\pm 5$ . Este procedimiento se aplicó principalmente para remover parte de la lignina presente en la biomasa, la cual inhibe el rendimiento de las enzimas durante la hidrólisis enzimática.

## Hidrólisis Enzimática

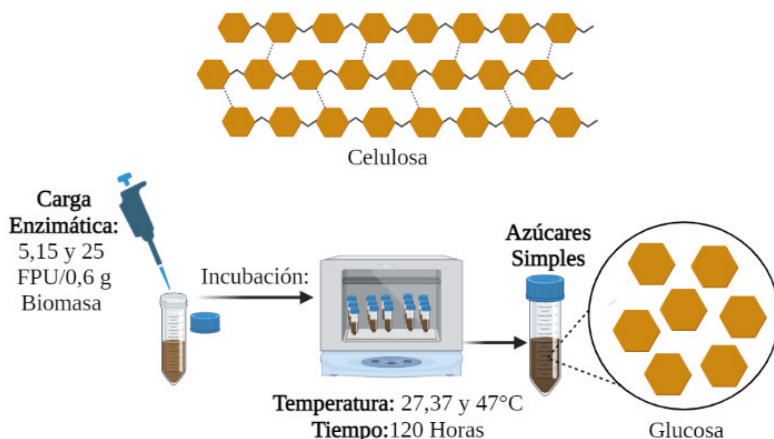


Figura 4. Representación de la Hidrólisis Enzimática.

La hidrólisis enzimática del hidrolizado químico se llevó a cabo en tubos falcon de 50 ml donde se adicionó 0,6 g (base seca) de biomasa pretratada suspendida en 15 ml de agua destilada (carga de sólidos del 4%) y celulasa de *Aspergillus niger* diluida en relación 1:14 (m/v) con buffer acetato de sodio (pH 5,2) (Conesa et al., 2018). Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. La figura 4 presenta la metodología empleada durante el proceso de optimización de las condiciones de operación de la hidrólisis enzimática. Para lo cual se empleó un diseño factorial 3<sup>2</sup>. Siendo los factores considerados la temperatura (27, 37, 47 °C) y la carga enzimática (5, 15 y 25 FPU/ g biomasa). Por otra parte, el análisis estadístico, desarrollado en el software OriginPro, buscó establecer las mejores condiciones para de operación y la interacción entre las variables estudiadas, aplicando un análisis de varianza de dos vías, la prueba de rangos de Tukey, diagrama estandarizado de Pareto y superficie de respuesta, para los cuales se considera un intervalo de confianza del 95%.

## Fermentación alcohólica



Figura 5. Representación de proceso de la Fermentación Alcohólica.

Concluida la hidrólisis enzimática se procedió a realizar la fermentación alcohólica del residuo lignocelulósico. En la figura 5 se muestra que el hidrolizado que presentó mayor rendimiento fue repetido con una carga mayor de sólido siendo este de 20 g de biomasa (esto se realiza con el fin de obtener mayor cantidad de productos y residuos los cuales se usaran para ser estudiados a través de análisis físico-químicos) para luego ser sometido a fermentación alcohólica con 0,75 g de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) (Sefale S-04) a 30 °C y 150 RPM por 120 horas de incubación la cual tiene como finalidad generar alcohol etílico (Schneider et al., 2017).

## Estequiometria y cinética de fermentación

Los coeficientes de rendimiento para la fermentación ( $Y_{X/S}$ ;  $Y_{P/S}$ ;  $Y_{CO_2/S}$ ), se determinaron a partir de la metodología descrita por (Doran, 2012) basada en la ecuación estequiométrica del proceso fermentativo de células heterótrofas (Ec.2) la cinética de fermentación se realiza con el propósito de estudiar los cambios de las concentraciones de los productos formados. a través del tiempo.



**Dónde:**  $C_w H_x O_y N_z$ : Sustrato;  $NH_i$ : Fuente de nitrógeno;  $CH_a O_\beta N_\delta$ : Biomasa generada;  $C_j H_k O_l N_m$ : Producto.

## Destilación

Una vez realizada la fermentación del hidrolizado enzimático se procedió a destilar según la norma técnica INEN 340 (2016) a la que fue el sometido el fermentado enzimático la cual se realiza con la intención de separar el etanol como producto de interés y la vinaza como residuo.

## TÉCNICAS

### Caracterización de materiales elemental (CHONS)

El análisis final (CHNS) fue desarrollado en un analizador elemental orgánico, mediante el método UNE-EN ISO 16948, el oxígeno se calculó por diferencia en peso

$$(O = 100\% - (C\% - H\% - N\% - S\% - \text{Cenizas (bs)\%}) \quad (\text{Ecuación 2})$$

### Determinación de fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA) y lignina detergente ácida (LDA).

Todas las muestras fueron secadas a una temperatura fija de 60 °C en una estufa de aire forzado hasta obtener un peso constante. A continuación, se molieron en un molino de martillos, utilizando una malla con un tamaño de paso de 1 mm. La determinación de fibra neutro detergente (FND) y de sus distintos componentes: fibra ácido detergente (FAD) y lignina ácido detergente (LAD), se realizó mediante el método secuencial de Goering y Van Soest (1970), empleando el analizador de fibra Tecator, y mediante el procedimiento de Ankom Technology Corporation®.

Los contenidos en celulosa (CEL) y hemicelulosa (HCEL) se estimaron por diferencia. En el método de Ankom se utilizaron bolsas de poliéster, libres de nitrógeno y cenizas (ANKOM Corp. #Fs1). En cada bolsa, previamente tarada, se pesaron 0,5 g. de

muestra. A continuación, se selló esta con calor y se agitó fuertemente para extender la muestra y lograr una distribución uniforme de las partículas en su interior. Una vez preparadas, se colocaron un total de 24 bolsas sobre un suspensor. El suspensor con las muestras fue introducido en la cubeta de digestión del analizador (Ankom200), relleniéndose esta con 2100 ml de una solución neutro detergente, preparada de la misma manera que en el sistema convencional, con la excepción de que se le añadieron 6 g de sulfito sódico.

La digestión tuvo una duración de 80 minutos, desde el momento en que la temperatura de la solución neutro detergente alcanzó los 100°C. Al cabo de este tiempo, se realizó el aclarado de las bolsas, que consistió en 5 lavados, de 5 minutos de duración cada uno, con agua. A continuación, se retiraron las bolsas del analizador y se sumergieron en acetona durante otros 5 minutos. Transcurrido este tiempo se retiraron y se dejaron secar al aire durante 1 hora. La desecación se completó en estufa hasta peso constante. EL contenido en FND se determinó por diferencia entre el peso de la bolsa y el peso de la bolsa con el residuo que permanece después de la digestión.

Para determinar el contenido en FAD, las bolsas con el residuo de FND se incubaron, siguiendo el mismo procedimiento empleado para determinar la FND, pero empleando una disolución ácido detergente de idéntica composición a la utilizada en el método convencional. Para determinar el contenido en LAD de las muestras, las bolsas con el residuo de FAD se introdujeron en una jarra de vidrio (28 bolsas/jarra) a la que se añadieron 500 ml de ácido sulfúrico al 72%. A continuación, se colocaron las jarras en un incubador (ANKOM Daisy) que las mantiene en constante rotación, permaneciendo en el mismo durante 3 horas. Pasado este tiempo, se lavaron las bolsas con agua caliente hasta obtener un pH neutro en el agua de lavado, se aclararon con acetona para remover el agua, se dejaron secar al aire y se completó la desecación en estufa a 100 °C durante 48 horas. Una vez secas, se pesaron y se incineraron en un horno mufla a 525 °C para determinar el contenido en cenizas.

Los datos obtenidos con los dos métodos se sometieron a un análisis de correlación y se compararon mediante una t para datos pareados. El coeficiente de variación (precisión) para cada método y componente químico se estimó a partir de la varianza residual, considerando la muestra como fuente de variación. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico SAS (SAS, 1989).



## Determinación de azúcares reductores.

La identificación de azúcares reductores se realizó según el método de Miller (1956), el cual se basa en la reducción del ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS). Se separó la parte líquida del hidrolizado mediante filtros de jeringa de nylon de diámetro 0,45  $\mu\text{m}$ , luego se colocó 0,5 ml del líquido en tubos de ensayo y se agregó 0,5 ml de reactivo DNS. La muestra se lleva a baño maría con una placa calefactora a 90°C por 5 minutos. La reacción se detiene por enfriamiento en hielo por cinco minutos y se agrega 5 ml de agua destilada a cada tubo, por último, se agita y se realiza la lectura de la absorbancia a 540 nm en el espectrofotómetro.

Para la preparación de la solución de DNS, se disolvió 1,6 g de NaOH en 40 ml agua destilada, luego se añadió lentamente 30 g de tartrato de sodio y potasio, se completa 20 ml de agua destilada y se agrega 1 g de ácido 3,5- dinitrosalicílico, se homogeniza bien y luego se afora hasta 100 ml, finalmente este se almacena en un frasco ámbar. La curva de calibración se realizó a partir de una solución patrón de 1000 mg/l, a partir de la cual se diluyó 6 estándares con las siguientes concentraciones: 50, 100, 150, 200, 400 y 600 mg/l (Burgos, 2020).

## Medición de Potencial de hidrógeno (pH)

Se hizo uso de un potenciómetro de marca OAKTON instruments, calibrado a partir de soluciones buffer de pH 4,7 y 10. La lectura de pH se realizó sumergiendo directamente el electrodo en las muestras de hidrólisis y fermentación.

## Detección de bioetanol por cromatografía gaseosa.

La concentración de bioetanol (ml/l) se evaluó según lo reportado por (Mansur et al., 2021) en un cromatógrafo de gases Trace serie 1310 (*Thermo Scientific*), acoplado a una columna TR-Fame (*Thermo Scientific*) [Película de 30 m(L)\*0,25 mm (DI) \*0,25  $\mu\text{m}$  de espesor] como fase estacionaria. La inyección se realizó en modo dividido (13:1) con un volumen de muestra de 0,1  $\mu\text{l}$ , manteniendo a 180 y 250 °C el inyector y el detector, respectivamente. Se utilizó como gas portador (helio, 10 ml/), hidrógeno (30 ml/min) y aire (300 ml/min).

Las muestras inyectadas fueron extraídas durante la etapa de fermentación, previo a su aplicación se centrifugaron y se colocó un ml de sobrenadante en los viales para proceder al análisis cromatográfico.

Se realizó una curva de calibración, a partir de una solución de bioetanol y otra de bioetanol (1 mg/ml), se mezcló un ml etanol/metanol absoluto en 9 ml de agua destilada, estas muestras se almacenaron en viales transparentes, se cerraron herméticamente y colocaron en el cromatógrafo para posteriormente ser analizadas. El tiempo de ejecución por cada muestra fue de siete minutos.

## Ensayos Estadísticos

La optimización de la hidrólisis enzimática fue desarrollada mediante un diseño factorial  $3^2$ , todas las muestras fueron analizadas por triplicado.

## Materiales o Reactivos

### Materiales e instrumentos

- I **Estufa:** Modelo SN30 Convención Natural, marca mermmet.
- I **Termobalanza:** Modelo BMA I50, marca Boeco Germany
- I **Balanza analítica:** Modelo PW serie 254, marca ADAM Equipment
- I **Cabina de flujo laminar:** Modelo BBS-H1100, marca Biobase
- I **Espectrofotómetro:** Modelo Genesys™ 180 UV-VIS, marca thermo scientific.
- I **Autoclave:** Modelo BkQ-B75 II, marca Biobase
- I **Incubadora orbital:** Modelo New Brunswick™ Excella 24 Inc Shaker, marca Eppendorf
- I **Cromatógrafo de gases:** Modelo Trace serie 1300, marca Thermo Scientific
- I **Digestor de fibra:** Marca Ankom<sup>200</sup>

### Reactivos e insumos

- I **Celulasa:** Enzima celulasa de *Aspergillus Níger*, Sigma-Aldrich (EE UU)
- I **Acetato de sodio:** Buffer pH 5.2, Sigma-Aldrich (EE UU)
- I **NaOH:** Hidróxido de sodio, grado reactivo (99%)
- I **HCl:** Ácido Clorhídrico, grado reactivo (99%)
- I **DNS:** Ácido 3,5-dinitrosalicílico, grado reactivo (99%) (Otto Chemie, India)
- I **Tartrato de sodio y potasio:** Lobachemi, India
- I **Saccharomyces cerevisiae:** Levadura comercial, Sefale S-04 de Fermentis (Francia).



## CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis proximal y elemental de cáscara de *Jatropha curcas* y pseudotallo de *Musa x paradisiaca*.

**Tabla 3.** Análisis proximal de la cáscara de *Jatropha curcas* y pseudotallo de *Musa x paradisiaca*.

Biomasa	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina	Ceniza	Humedad	Referencia
	%m/m					
CJC	32,7 ± 0,2	21,6 ± 1,3	11,2 ± 0,4	4,9	5,9	Este estudio
	27,0	15,0	11,0	-	-	(Lateef & Ogunsuyi, 2021)
	56,31	17,47	23,91	6,3	0,68	(Sricharoenchaikul et al, 2008)
	29,83	13,95	37,3	-	-	(Ewunie et al, 2022)
	42,2 ± 0,6	16,1 ± 0,5	25,9 ± 0,8	-	-	(Sinche & Ramírez, 2022)
	32,5	10,5	5,7	15,44	1,16	(Odetoeye et al, 2018)
PMP	33,1 ± 0,3	16,1 ± 0,5	5,8 ± 0,6	17,7	7,2	Este estudio
	32,5	13,0	32,2	12,5	10,2	(Taib et al, 2021)
	23,82	25,69	8,56	-	-	(Meng et al, 2019)
	42,35	22,63	15,36	18,7	4,73	(Md. Islam et al, 2019)
	44,6	36,0	19,4	-	-	(Costa et al, 2018)
	35.5 ± 0.7	11.9 ± 0.7	10.8 ± 0.7	-	-	(Li et al, 2021)

El análisis proximal y el contenido de lignocelulosa para la cáscara de *Jatropha curcas* y el pseudotallo de *Musa x paradisiaca* se resumen en la *tabla 3*. Como se puede observar alrededor del 50% de la biomasa en base seca, corresponde a la fracción holocelulósica (Celulosa y hemicelulosa), la cual es fuente importante de azúcares C6 y C5. En el caso particular de la CJC, el contenido de celulosa encontrado se asemeja a lo presentado por (Odetoeye et al., 2018) y (Ewunie et al., 2022).

Por otra parte, la fracción de lignina en el PMP fue notablemente inferior a lo registrado en la literatura (Costa et al., 2018; Islam et al., 2019; Taib et al., 2021). Mientras que, para la CJC, (Sinche & Ramírez, 2022) y (Ewunie et al., 2022) mostraron valores que van alrededor de 2 o 3 veces el contenido de lignina registrado en la biomasa analizada, así mismo, este fue similar a lo reportado por (Lateef & Ogunsuyi, 2021).

Tener un bajo contenido de lignina reduce problemas durante el proceso enzimático, puesto que este componente obstaculiza el acceso de las enzimas a la fracción holocelulósica, conduciendo a la unión improductiva de las enzimas sobre el mismo (Przybysz Buzafa et al., 2017). Debido a esto, es indispensable la eliminación parcial de lignina a través del pretratamiento de la biomasa, permitiendo aumentar el área de la superficie externa y la porosidad de la celulosa. Es así que, (Ewunie et al., 2022) consiguieron reducir del 37,3 al 16% de lignina para CJC, a partir de pretratamiento alcalino.

Por otra parte, se evidenció un bajo contenido de cenizas en la CJC (4,9%) en función a la del PMP (17,7%), el cual sobrepasa el límite sugerido por (Arif et al., 2019) para las materias primas empleadas en la producción de bioetanol 2G, correspondiente al 10%. Un alto porcentaje de cenizas podría afectar el rendimiento de bioetanol, debido a problemas como inhibición de la fermentación y la aparición de costras e incrustaciones en los equipos de destilación (Awoyale et al., 2021). Estudios previos han reportado una mayor reducción de compuestos inorgánicos (Ca, Al, Si, Cl y S) por medio de pretratamiento alcalino en comparación a lo obtenido vía ácida o hidrotermal (Awoyale et al., 2021; Olivo et al., 2021).

Cabe recalcar que, las diferencias significativas entre las biomases analizadas y lo presentado en la literatura, podría deberse a varios factores que pueden influir en la composición de la biomasa como la variación geográfica o estacional, diferencia en reactivos, métodos usados en la caracterización, fase de crecimiento de la biomasa, entre otros (Pfeil et al., 2021).

**Tabla 4.** Composición elemental de la Cáscara de *Jatropha curcas* y pseudotallo de *Musa x paradisiaca*.

Biomasa	C	H	O	N	S	C/N	Referencia
	%m/m						
CJC	44,2±0,1	7,3±0,2	42,4±0,2	0,8±0,1	0,2±0,1	58,7 ±8	Este estudio
	41,46	4,68	52,08	1,29	<0,10	32,14	(Odetoeye et al, 2018)
	49,04	5,76	40,03	0,60	0,44	81,73	(Pfeil et al, 2021)
	50,90	5,80	39,50	0,80	-	63,63	(Piloto et al, 2020)

	35,6±0,2	5,9±0,01	39±0,3	1,6±0,01	0,08±0,01	22,2 ±1	Este estudio
<b>PMP</b>	33,36	4,88	59,99	1,85	-	18,03	(Islam et al., 2019)
	37,93	4,46	55,37	1,87	0,37	20,28	(Taib et al., 2021)
	42,0	5,62	51,3	1,08	-	38,89	(Kumar et al., 2019)
<b>Paja de trigo</b>	41,9	5,6	52	0,3	0,33	135,39	(Mishra & Ghosh, 2019)
<b>Bagazo de caña</b>	39,91	5,34	54,26	0,28	0,22	142,55	(Mishra & Ghosh, 2019)
<b>Rastrojo de maíz</b>	43,57	5,84	49,98	0,56	0,05	77,80	(Mathanker et al., 2020)
<b>Bagazo de agave</b>	39,81	5,08	53,02	1,79	0,3	22,24	(Parascanu et al., 2017)

\*El porcentaje de oxígeno se calculó por diferencia en peso.

\*\*La relación (C/N) se calculó a partir del contenido de carbono y nitrógeno de las biomásas.

El análisis químico elemental de la cáscara de *Jatropha curcas* y pseudotallo de *Musa x paradisiaca* se muestra en la tabla 4, este permite determinar el contenido total de carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y azufre (C, H, O, N y S) de la biomasa, de la cual, se evidenció predominio de Carbono y oxígeno en ambos casos. Estos resultados fueron similares a lo presentado por (Pfeil et al., 2021) y (Odetoeye et al., 2018) para CJC, Así mismo, los valores mostrados por (Islam et al., 2019) y (Taib et al., 2021) se aproximan a lo visto en este estudio para PMP. Y a su vez son comparables, a lo visto en sustratos ampliamente estudiados para la producción de bioetanol como paja de trigo, rastrojo de maíz, bagazo de caña y bagazo de agave. (Mathanker et al., 2020; Mishra & Ghosh, 2019; Pahla et al., 2017; Parascanu et al., 2017). Lo que manifiesta su potencial uso para la producción de bioetanol.

Además, es evidente que la relación de carbono biodisponible a nitrógeno (C/N) de la CJC (58,7 ±7,9) es mayor a la encontrada en el PMP (22,19 ±1,0), sin embargo, (Uçkun & Liu, 2015) manifiestan que, la materia prima con una relación C/N mayor a 30 es deficiente de nitrógeno para procesos biológicos y que a su vez esta condición puede desencadenar la producción de etanol. En la misma investigación, se alcanzó la mayor producción de etanol a partir de residuos alimentarios con C/N igual a 28, mientras que al aumentar esta proporción a 35 se condujo a una ligera disminución en la concentración de etanol. Así mismo, (Imamoglu & Sukan, 2014) encontraron un contenido más alto de etanol a partir de hidrolizados de cascarilla de arroz y tallos de algodón con una relación C/N máxima de 27. Mientras que, Manikandan & Thangavelu, (2010), obtuvieron una máxima concentración de bioetanol a partir de almidón de tapioca con una relación C/N de 35,2 mediante el cocultivo de *Aspergillus Níger* y *Saccharomyces cerevisiae*.

Tanto el nitrógeno como el carbono, cumplen un papel fundamental en la síntesis, crecimiento y metabolismo de las células de todos los microorganismos, alcanzando una mayor descomposición microbiana cuando la relación C/N de los sustratos es de alrededor de 25 (Imamoglu & Sukan, 2014). En este sentido, se podría definir que la proporción de los elementos (C/N) influye directamente en la producción de bioetanol, de manera que, se puede considerar que la relación C/N más adecuada para la producción de bioetanol se encuentra en un rango de 28 a 35, según lo descrito por (Uçkun & Liu, 2015). Por lo cual el medio podría ser suplementado con nutrientes que mejoren las condiciones del proceso, alcanzando una relación C/N próxima a la presentada en la bibliografía, con el fin de mejorar el rendimiento en la producción de etanol.

### Pretratamiento Básico

Durante el pretratamiento de la biomasa se obtuvo un aumento en la concentración de azúcares reductores iniciando con 0,074 (g/l) en CJC y 0,086 (g/l) para PMP llegando a 0,5074 (g/l) y 0,6089 (g/l) respectivamente siendo este parte del licor negro formado durante el pretratamiento, utilizando 6 ml de solución de NaOH (3%) por cada gramo de sustrato acondicionado. La cantidad de azúcares generados es considerable, según (X. Li et al, 2022) al aplicar la hidrólisis enzimática después del pretratamiento básico, se pueden obtener concentraciones más elevadas demostrando que existe un mayor grado de conversión de celulosa en azúcares simples (Figura 6).

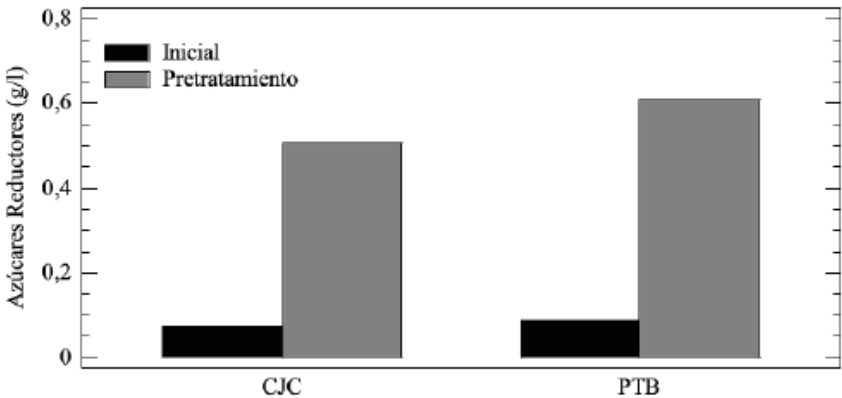


Figura 6. Azúcares reductores antes y después del pretratamiento básico.

\*Azúcares medidos en el lavado de la materia prima\*

## Hidrólisis Enzimática

Las hexosas (glucosa, fructosa, etc.) y las pentosas (xilosa, arabinosa, etc.), son los azúcares generados en mayor medida a partir de hidrólisis de la celulosa y la hemicelulosa (Conesa et al., 2018). Sin embargo, al no utilizar ningún catalizador específico para la hemicelulosa, se supone una conversión insignificante de este polímero durante esta experimentación, por lo que se considera únicamente la conversión de la celulosa. Las figuras 7 y 8 muestra el incremento en la concentración de azúcares en función del tiempo para las diferentes configuraciones evaluadas.

### Hidrólisis Enzimática de cáscara de *Jatropha curcas*.

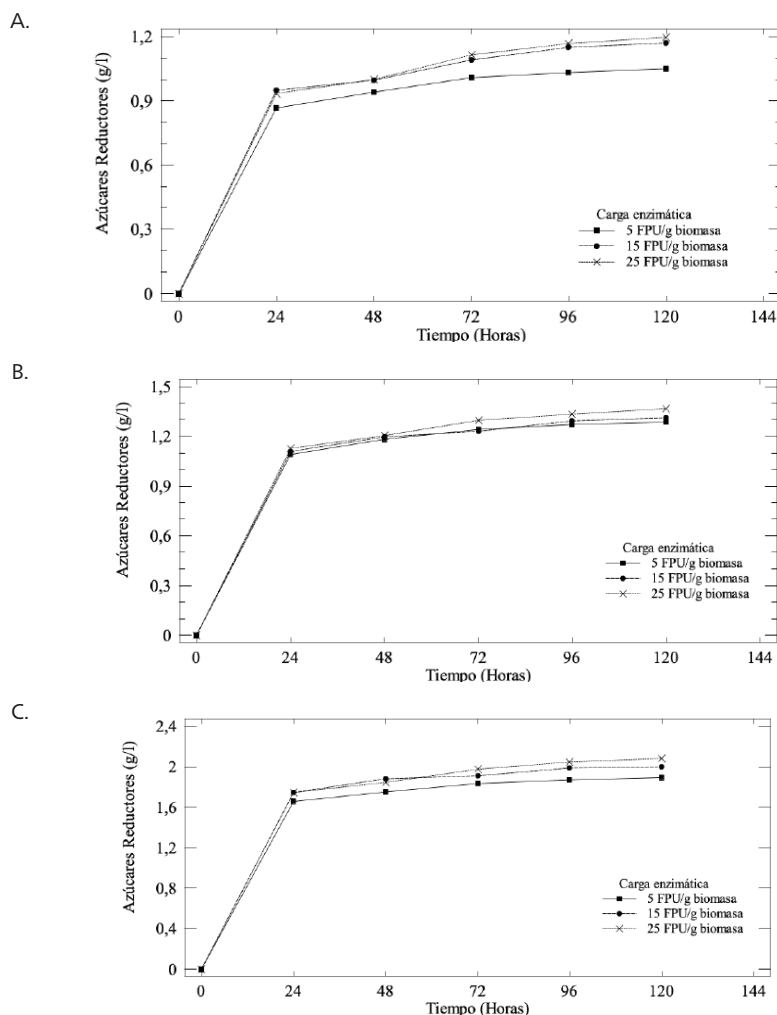


Figura 7. Producción de azúcares reductores en función del tiempo para biomasa de CJC. (A) 27 °C; (B) 37 °C; (C) 47 °C.



## Hidrólisis Enzimática de Pseudotallo de *Musa x paradisiaca*.

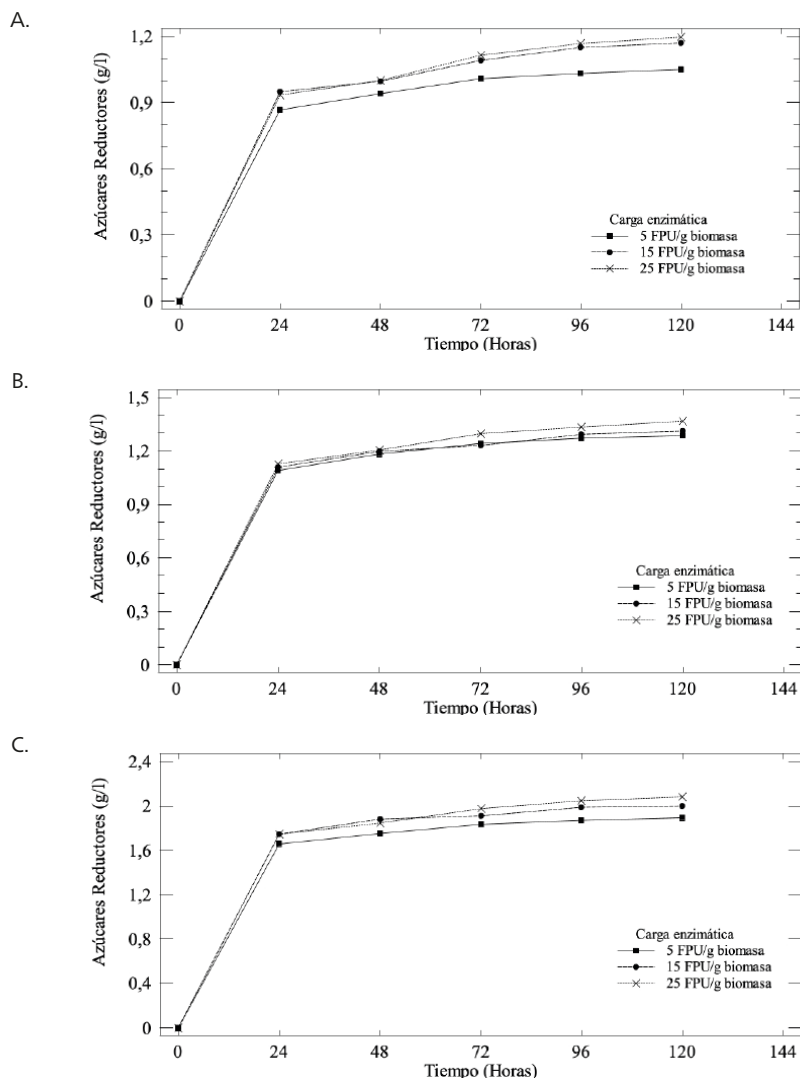


Figura 8. Producción de azúcares reductores en función del tiempo para biomasa de PMP. (A) 27 °C; (B) 37 °C; (C) 47 °C.

En la figura 7 se observa un incremento en las primeras 24 horas en la producción de azúcares reductores, tiempo después del cual la tendencia cambia y la reducción se mantiene constante lo cual indica el final del proceso. Se evidencia, también, que el incremento de la temperatura y concentración enzimática condujo a un mayor

rendimiento, sin embargo, como se muestra en la figura 8 en el caso del pseudotallo de *Musa x paradisiaca*, a pesar de registrarse un mayor incremento de sacarificación en las primeras 24 horas con la máxima concentración de enzimas analizada, se consiguió alcanzar valores muy cercanos en el contenido de azúcares entre el nivel máximo y el intermedio de carga enzimática. La máxima producción de azúcares fue de  $2,0798 \pm 0,00192$  y  $2,2113 \pm 0,0067$  g/l, para la cáscara de *Jatropha curcas* y pseudotallo de *Musa x paradisiaca*, respectivamente a 47°C y carga enzimática de 25 y 15 FPU/g biomasa para cada biomasa estudiada.

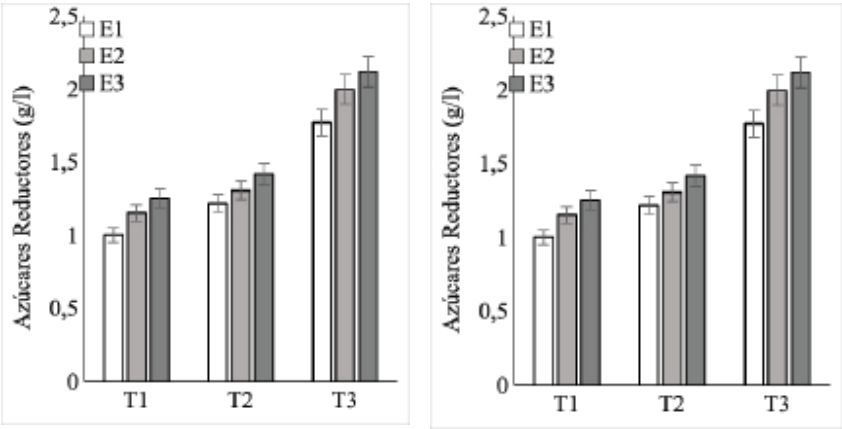
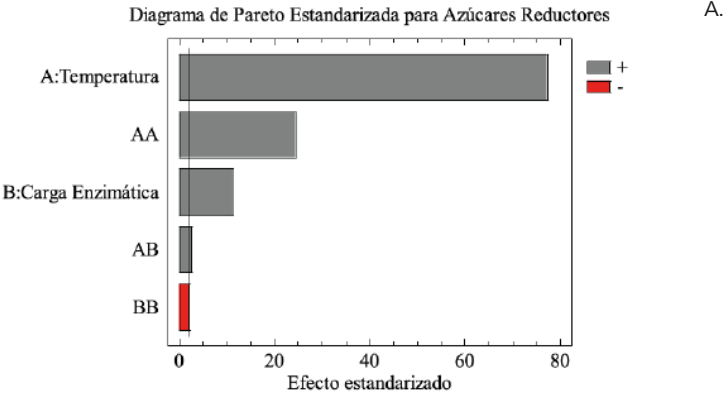


Figura 9. Gráfico de barras para la producción de azúcares reductores: (A) cáscara de *Jatropha curcas* y (B) pseudotallo de *Musa x paradisiaca*.

## Interacción de las variables del Proceso.



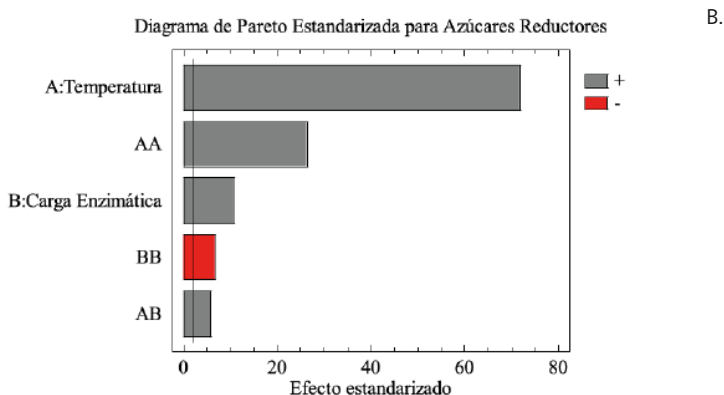


Figura 10. Diagrama de Pareto estandarizado para azúcares reductores a partir de biomasa de (A) cáscara de *Jatropha curcas* y (B) pseudotallo de *Musa x paradisiaca*.

Los resultados de los análisis estadísticos (anexo 5), mostraron que los dos factores (Temperatura y carga enzimática), así como sus interacciones presentaron diferencias significativas  $\alpha=95\%$ . Así mismo, la prueba de rangos (anexo 5), mostró que al utilizar cáscara de piñón los promedios fueron diferentes entre sí, a excepción de la configuración T1E2:T1E3. Mientras que, para el pseudotallo de *Musa x paradisiaca* no se encontró diferencias entre T1E2:T1E3; T2E2:T2E3; T3E2:T3E3 (Figura 10). Esto sugiere la posibilidad de reducir el consumo de enzima en un intervalo de 15 a 25 FPU/g biomasa, sin afectar en gran medida el rendimiento final de azúcares reductores.

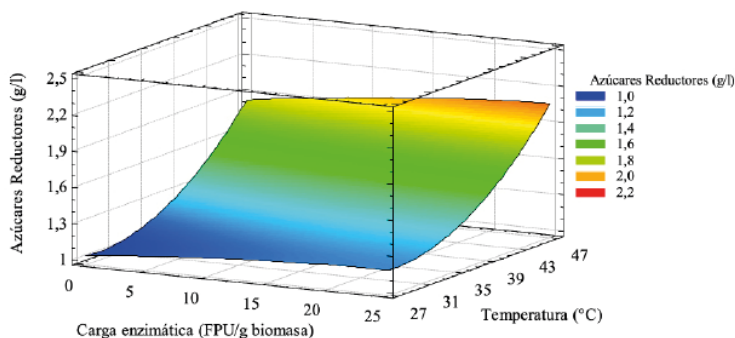
Así mismo, mediante el diagrama de Pareto para los efectos estandarizados (Figura 10A y 10B) se constató que las variables en este estudio y la interacción entre sí influyen de manera significativa sobre el proceso. Se deduce que la acción enzimática fue mayormente afectada por la temperatura en relación a la carga enzimática tanto al emplear como sustrato cáscara de piñón o pseudotallo de *Musa x paradisiaca*, por otra parte, la interacción de las variables (A: B) y el efecto cuadrático para la carga enzimática (B: B) poseen menor significancia en la producción de azúcares reductores.

En el estudio realizado por (Nurfahmi et al., 2019) evaluaron 3 niveles de temperatura (35, 70 y 90 °C) a una concentración fija de enzima 60 FPU/g de celulosa en donde la mayor cantidad de azúcares se obtuvieron a 90 °C durante 48 h utilizando como residuales racimos de frutos vacíos de palma aceitera, también (Ben et al., 2017) comprobó que al utilizar bajas temperaturas a un pH y concentración de enzimas constante se obtienen valores bajo en azúcares. En resumen, el aumento de este parámetro influye de manera positiva en la hidrólisis enzimática con la posibilidad de obtener iguales o mayores resultados con una carga menor de enzima, ya que la relación cuadrática de la carga enzimática refleja que el aumento en la concentración de enzimas podría conllevar a un menor rendimiento de azúcares.

Las gráficas de superficie de respuesta (Figura 11) nos permite evaluar la interacción que existe entre la concentración enzimática y temperatura en el proceso, a la vez que revela el nivel óptimo de las variables para maximizar el rendimiento del proceso. Sin embargo, en el presente estudio no se logró identificar niveles óptimos que permitan la mayor producción de azúcares, encontrando una mejor respuesta al emplear los niveles máximos estudiados, a excepción de la carga enzimática para pseudotallo de banano, con un valor de 21,9 FPU/g biomasa presentado en la Tabla 5 en esta misma también se visualiza el rendimiento estimado que se espera alcanzar a partir de los niveles seleccionados. De acuerdo con (Conesa et al, 2018) la mayoría de las celulasas fúngicas poseen un mayor rendimiento alrededor de los 50°C, por lo cual, la temperatura más adecuada en este estudio correspondió a los 47°C y no se descarta mejorar el rendimiento de la hidrólisis al evaluar temperaturas superiores a esta.

A.

$$AR = 2,95 - 0,14 * T + 0,006 * E + 0,002 * T^2 + 0,0001 * T * E - 0,0002 * E^2$$



B.

$$AR = 3,65 - 0,174642 * T + 0,01 * E + 0,002 * T^2 + 0,001 * T * E - 0,001 * E^2$$

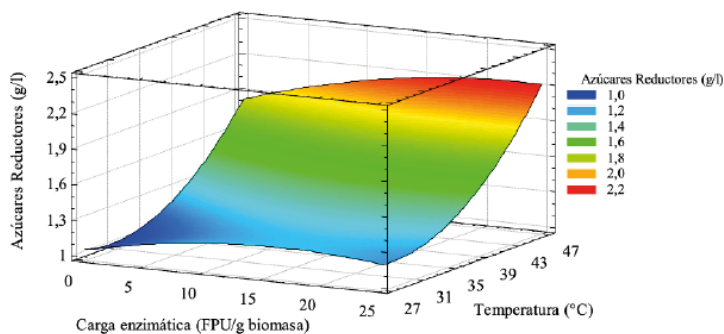


Figura 11. Superficie respuesta de la liberación de azúcares reductores a partir de diferentes condiciones de temperatura y carga enzimática. (A) Biomasa: cáscara *Jatropha curcas*. (B) Biomasa: Pseudotallo de *Musa x paradisiaca*

**Tabla 5.** Optimización de la etapa de hidrólisis enzimática

Biomasa	Temperatura (°C)	Carga Enzimática (FPU/g biomasa)	Concentración estimada de AzR (g/l)
CJC	47	25	2,0657
PMP	47	21,9	2,1293

Low et al. (2015) Reporta una conversión máxima de celulosa del 43,38% utilizando pseudotallo de *Musa x paradisiaca* como biomasa inicial y *Trichoderma reesei* con actividad de 30 FPU/g biomasa, como catalizador biológico de la reacción. Valor cercano, al registrado en el presente estudio, con una máxima tasa de hidrólisis del 41,33% para el mismo material, con una menor carga enzimática de celulasa de *A. Níger* correspondiente a 21,93 FPU/g biomasa. Mientras que Gonçalves et al. (2013) registra una conversión del 74 %, empleando el cóctel comercial de enzimas Novozymes® (complejo de celulasa,  $\beta$ -glucosidasa y hemicelulasa). Así mismo (Conesa et al., 2018) reporta una producción de 81 g/l de azúcares totales, al implementar el uso de celulasa y hemicelulasa de *A. Níger*, en el mismo estudio se señala, una mayor producción de azúcares con un pH de 4,9, 50°C y una carga enzimática de 0,4 % m/m.

Otros estudios han registrado mayor producción de azúcares reductores al emplear consorcios enzimáticos siendo ventajoso en lugar de utilizar enzimas individuales, ya que estos, están diseñados mediante la combinación de diferentes enzimas en proporciones fijas, para maximizar y acelerar la bioconversión de la lignocelulosa en azúcares fermentables (Bhardwaj et al., 2020). Así mismo, la adición de hemicelulasas hace posible la liberación de monómeros, propios de la hemicelulosa como la xilosa y la arabinosa como lo mencionó (Cruz et al., 2019).

## Fermentación Alcohólica

### Fermentación alcohólica de cáscara de *Jatropha curcas*

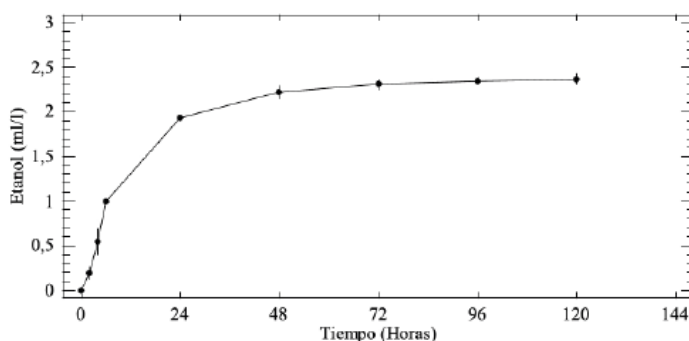


Figura 12. Producción de etanol en función del tiempo a partir de Cáscara de *Jatropha curcas*.

## Fermentación alcohólica de pseudotallo de *Musa x paradisiaca*.

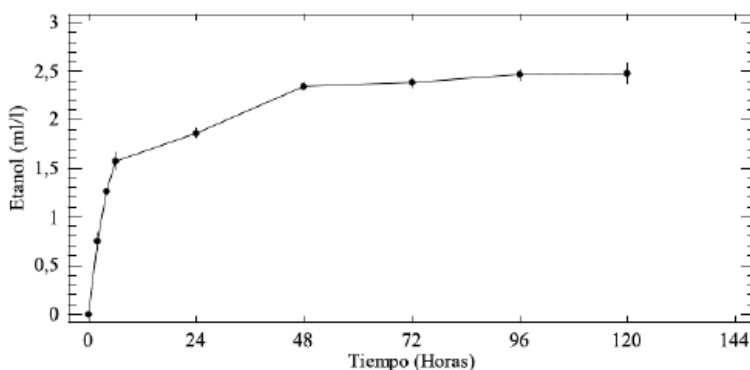


Figura 13. Producción de etanol en función del tiempo a partir de pseudotallo de *Musa x paradisiaca*.

Se puede observar que la mayor producción de etanol para la *CJC* y *PMP* en la etapa de fermentación alcohólica ocurre durante las primeras 48 horas posterior a este tiempo la concentración de etanol se mantiene constante.

Luego de establecer las condiciones óptimas de hidrólisis enzimática (tabla 6) se realizó el proceso de fermentación con una carga de sustrato de 20 g de biomasa inicial, alcanzando una concentración de azúcares reductores de  $2,431 \pm 0,0067$  g/l para cáscara de piñón y  $3,0398 \pm 0,099$  g/l para pseudotallo de *Musa x paradisiaca*. Estos hidrolizados fueron fermentados por un periodo de incubación de 120 horas con levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* a 30 °C y 150 RPM (Figura 12 y figura 13).

Estos resultados son menores a lo registrado por (Rajeswari et al., 2021), quienes, por medio del pretratamiento de la biomasa con agua caliente y aplicación de aditivos naturales elaborados a partir de extracto de proteína de soya, evitaron la redeposición de la lignina en la biomasa, mediante lo cual se obtuvo un contenido de glucosa de 870,11 mg/mL y una concentración máxima de bioetanol de 0,443 ml/g después de 10 días de fermentación. Por otra parte, (Khalil et al., 2015) reportan una producción de 10,5 ml/l de bioetanol destilado, a partir de hidrólisis ácida del bagazo de sorgo dulce, el mayor rendimiento de bioetanol, en comparación al presente estudio (2,45 y 2,36 ml/l), podría relacionarse al empleo del cultivo mixto de los microorganismos (Stewart, 2014) ATCC 7754 y (Kalnenieks et al., 2020) ATCC 29191, además de la suplementación de nutrientes en el medio, para alcanzar condiciones adecuadas para una óptima actividad de las levaduras durante el proceso fermentativo.

Se puede observar que los valores de la producción de etanol obtenidos en la presente investigación son bajos en comparación con los de otros autores, Esto puede deberse a que por una parte no hubo una eliminación eficaz de la lignina lo que provoca que no se liberara totalmente la celulosa. Otro factor que afecta la Hidrólisis enzimática es la utilización de la enzima celulasa de *Aspergillus Níger* la cual es una enzima comercial aislada, ya que al ser un residuo lignocelulósico puede utilizarse otro tipo de enzimas que ayude a obtener altos rendimientos, según lo reportado por (Cruz et al., 2019) al aplicarse un complejo enzimático en donde hay una combinación de varias enzimas, se puede obtener altos niveles de *azúcares* fermentables a comparación de la presente investigación.

CJC	$C_6H_{12}O_6 + 0,848 NH_3 \rightarrow 4,242 C_{1,83}O_{0,56}N_{0,2} + 0,67 CO_2 + 1,75 H_2O + 0,547 C_2H_6O$				
	$Y_{NH_3}/S$	$Y_{CH_{1,83}O_{0,56}N_{0,2}}/S$	$Y_{CO_2}/S$	$Y_{H_2O}/S$	$Y_{C_2H_6O}/S$
	0,08	0,60	0,16	0,18	0,14
PMP	$C_6H_{12}O_6 + 0,636 NH_3 \rightarrow 3,182 C_{1,83}O_{0,56}N_{0,2} + 1,002 CO_2 + 1,313 H_2O + 0,908 C_2H_6O$				
	$Y_{NH_3}/S$	$Y_{CH_{1,83}O_{0,56}N_{0,2}}/S$	$Y_{CO_2}/S$	$Y_{H_2O}/S$	$Y_{C_2H_6O}/S$
	0,06	0,45	0,24	0,13	0,23

**Tabla 6.** Rendimientos estequiométricos.

En la Tabla 6 se muestran los compuestos involucrados en la obtención de bioetanol, la ecuación estequiométrica y los coeficientes obtenidos (Anexo 7) durante la producción de etanol a partir de cáscara de *Jatropha curcas* y pseudotallo de *Musa x paradisiaca*.

Los rendimientos de los productos (YP/S) encontrados en esta investigación fueron de 0,14 para CJC y 0,23 para PMP gr  $C_2H_6O_1$ /gr  $C_6H_{12}O_6$  respectivamente, valor alejado al rendimiento máximo teórico ( $YP/S_{max}$ ) que se puede alcanzar, el cual es 0,51 gr  $C_2H_6O_1$ /gr  $C_6H_{12}O_6$  proporcionado por (Cevallos et al., 2021). Los rendimientos YP/S, obtenidos la presente investigación son menores a lo informado por (Boonchuay et al., 2021) quienes reportan un valor de 0,334 gr  $C_2H_6O_1$ /gr  $C_6H_{12}O_6$  esto pudo deberse a que aislaron y seleccionaron levaduras utilizando como residual mazorcas de maíz ricas en celulosa. Por otro lado, (Rahayuningsih et al., 2022) reportan un rendimiento similar al obtenido en el PMP siendo este de 0,23 gr  $C_2H_6O_1$ /gr  $C_6H_{12}O_6$  en donde utilizaron como materia prima residuos de tofu y levadura comercial sin aislar, en otras palabras el uso y aislamiento de la levadura está claramente influenciado en el proceso fermentativo ya que al tener la presencia de levaduras que se enfocan en la producción de biomasa y  $CO_2$  pueden afectar negativamente el rendimiento ya que no están completamente direccionadas a la obtención de alcohol.

## Balance de Masa.

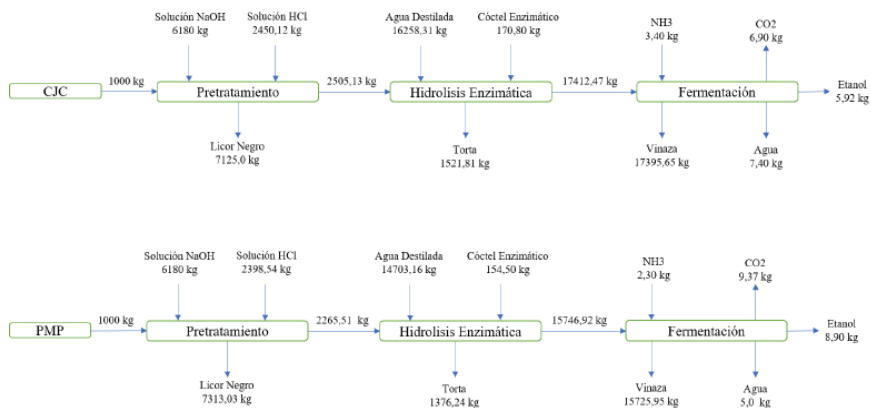


Figura 14. Balance de masa para CJC y PMP.

En la figura 14 se presenta un balance de masa para la cáscara de *Jatropha curcas* y pseudotallo de *Musa x paradisiaca* en el que se toma una base de 1000 kg de residuo para calcular la cantidad de cada una de las entradas, salidas y lo que se genera dentro del sistema para ambos residuales.

Es posible obtener etanol 2G de la cáscara de *Jatropha curcas* y pseudotallo de *Musa x paradisiaca* por el gran aprovechamiento de la celulosa contenida en las biomásas lignocelulósicas siendo esta convertida en azúcares fermentables, el efecto de la hidrólisis enzimática es notablemente positiva ya que representa una mejora en la producción del etanol siendo este considerado como un biocombustible alternativo.

Si procesamos 1000kg de biomasa de cada residuo lignocelulósico obtendríamos 5,92 kg de etanol para la cáscara de *Jatropha curcas* y 8,90 kg de etanol para el pseudotallo de *Musa x paradisiaca*, aquellos valores son bajos a comparación de otros autores como (Rajeswari et al., 2021) y (Khalil et al., 2015), para llevar a cabo el proceso se necesitan grandes cantidades de recursos, sin embargo, se debe tomar en cuenta que la materia prima utilizada es un residuo agroindustrial, lo cual generalmente no tiene muchas aplicaciones y gran parte de ésta es quemada al aire libre atribuyendo negativamente a los efectos sobre el medio ambiente (Olivo et al., 2021). También podemos apreciar que entre los insumos utilizado en mayor cantidad es el agua, ya sea en forma pura o en soluciones, la cual puede ser reutilizada al aplicarle un tratamiento específico. Después del proceso de fermentación de los hidrolizados, se obtienen subproductos de gran interés como vinaza y torta que podrían ser aprovechados para la generación de biogás (Parsaee et al., 2019) y empleado como abono mejorador de suelo en cultivos (Rusecki et al., 2019).





## CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### Conclusiones

- I La caracterización integral demostró que la presencia de carbono, nitrógeno, celulosa y hemicelulosa en la cascara de *Jatropha curcas* y pseudotallo de *Musa x paradisiaca* permitan utilizar estas biomasas lignocelulósicas para procesos de obtención de etanol 2G.
- I Los procesos de hidrólisis química con NaOH y enzimática con celulasa de *Aspergillus niger*, sobre las biomasas lignocelulósicas liberaron 2.07g/L de Azúcares reductores de la cáscara de *Jatropha curcas* y 2.13 g/L del pseudotallo de *Musa x paradisiaca*. Valores adecuados para someterse a procesos de fermentación.
- I El proceso de fermentación de los hidrolizados obtenidos para la cáscara de piñón y pseudotallo de *Musa x paradisiaca* muestra una producción alta de etanol hasta las 48 horas, tiempo después del cual el proceso se detiene. La producción de etanol alcanza un rendimiento de entre el 27% y 45% en función de los máximos termodinámicos posibles a partir de la glucosa y fructosa.
- I Los valores de rendimiento biológico ( $Y_{P/S}$ ,  $Y_{X/S}$  y  $Y_{CO_2/S}$ ) encontrados en el presente estudio, demuestran que la producción de etanol 2G a partir de la cáscara de *Jatropha curcas* y pseudotallo de *Musa x paradisiaca* es una de las alternativas viables para el uso y aprovechamiento de estas biomasas lignocelulósicas.

### Recomendaciones

- I Para una mayor precisión en la obtención de azúcares, es recomendable tener en cuenta la contaminación por hongos, levaduras u otro tipo de microorganismos que consuman los azúcares producidos por la hidrólisis enzimática. También tener presente las condiciones de pH necesarias en donde las enzimas puedan tener mayor actividad como en el presente

caso de la Celulasa "*Aspergillus Níger*" que opera con efectividad a un pH óptimo de 5.2.

- Para que la hidrólisis se lleve a cabo correctamente se debe de mantener la mezcla con una agitación constante, de forma que se mantiene homogenizada la mezcla y que los mostos tienen mayor superficie de contacto con las enzimas en la mezcla.
- Para la etapa de fermentación se debe controlar que no ingrese oxígeno al medio y así evitar la presencia de otros microorganismos que podrían generar la síntesis de productos no deseados y comprometer la asignación de efectos únicamente al caso de la enzima utilizada.

# BIBLIOGRAFÍA

al Rayaán, M. B. (2021). Recent advancements of thermochemical conversion of plastic waste to biofuel-A review. En *Cleaner Engineering and Technology* (Vol. 2). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.clet.2021.100062>

Almeida, M., & Colombo, R. (2021). Production Chain of First-Generation Sugarcane Bioethanol: Characterization and Value-Added Application of Wastes. *BioEnergy Research*. <https://doi.org/10.1007/s12155-021-10301-4>

Arellano, C. (2015). *Obtención de Bioetanol a Partir de Materiales Lignocelulósicos Sometidos a Hidrólisis Enzimática* [Tesis de Maestría en Ciencias en Procesos Biológicos]. Universidad Veracruzana.

Arif, A. B., Budiyanto, A., Diyono, W., Hayuningtyas, M., Marwati, T., Sasmitaloka, K. S., & Richana, N. (2019). Bioethanol Production from Sweet Sorghum Bagasse Through Enzymatic Process. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 309(1), 012033. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/309/1/012033>

Arismendy, A. (2021). *Cascarilla de Arroz: Obtención de Bioetanol a Partir de la Hidrólisis y Fermentación Simultánea* [Tesis Doctoral en Ciencias Aplicadas]. Universidad Nacional de Misiones.

Awad, O. I., Mamat, R., Ibrahim, T. K., Hammid, A. T., Yusri, I. M., Hamidi, M. A., Humada, A. M., & Yusop, A. F. (2018). Overview of the oxygenated fuels in spark ignition engine: Environmental and performance. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 91, 394–408. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.107>

Awoyale, A., Lokhat, D., & Okete, P. (2021). Investigation of the effects of pretreatment on the elemental composition of ash derived from selected Nigerian lignocellulosic biomass. *Scientific Reports*, 11(1), 21313. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00672-1>

Baig, K. S. (2020). Interaction of enzymes with lignocellulosic materials: causes, mechanism and influencing factors. *Bioresources and Bioprocessing*, 7(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s40643-020-00310-0>

Ben, I., Fickers, P., Chniti, S., & Hassouna, M. (2017). Optimization of enzymatic hydrolysis and fermentation conditions for improved bioethanol production from potato peel residues. *Biotechnology Progress*, 33(2), 397–406. <https://doi.org/10.1002/btpr.2427>

Benítez, L. (2017). *Caracterización de las principales enzimas celulolíticas de Myceliophthora thermophila implicadas en la degradación de biomasa lignocelulósica y mejora de la hidrólisis de hemicelulosa para la producción de bioetanol de segunda generación* [Tesis Doctoral]. Universidad de Sevilla.

Bhardwaj, N., Kumar, B., Agrawal, K., & Verma, P. (2020). Bioconversion of rice straw by synergistic effect of in-house produced ligno-hemicellulolytic enzymes for enhanced bioethanol production. *Bioresource Technology Reports*, 10, 100352. <https://doi.org/10.1016/j.bi-teb.2019.100352>

Boonchuay, P., Techapun, C., Leksawasdi, N., Seesuriyachan, P., Hanmoungjai, P., Watanabe, M., Srisupa, S., & Chaiyaso, T. (2021). Bioethanol Production from Cellulose-Rich Corn cob Residue by the Thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* TC-5. *Journal of Fungi*, 7(7), 547. <https://doi.org/10.3390/jof7070547>

Branco, R. H. R., Serafim, L. S., & Xavier, A. M. R. B. (2019). Second generation bioethanol production: On the use of pulp and paper industry wastes as feedstock. En *Fermentation* (Vol. 5, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/fermentation5010004>

Burgos, Lady. (2020). Cuantificación de azúcares reductores del sustrato en residuos de piña con el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico. *Questionar: Investigación Específica*, 7(1), 57–66. <https://doi.org/10.29097/23461098.308>

Carrigan, J. (2016). Applications of Cellulase in Biofuel Industry. En *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Cellulase System Properties and Applications* (pp. 177–184). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63507-5.00015-0>

Cevallos, D., Víneces, Verónica, & Rosero, E. (2021). Análisis Técnico-Económico Para La Obtención De Etanol Celulósico A Partir De La Cáscara De Maní. *Polo Del Conocimiento*, 6. <https://doi.org/DOI: 10.23857/pc.v6i10.3232>

Chávez, M., & Domine, M. (2013). Lignina, Estructura y Aplicaciones: Métodos de Despolimerización para la Obtención de Derivados Aromáticos de Interés Industrial. *Avances En Ciencias e Ingeniería*, ISSN: 0718-8706.

Conesa, C., Seguí, L., & Fito, P. (2018). Hydrolytic Performance of *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei* Cellulases on Lignocellulosic Industrial Pineapple Waste Intended for Bioethanol Production. *Waste and Biomass Valorization*, 9(8), 1359–1368. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9887-z>

Coral, J., Álvarez, E., & Tello, J. (2022). Uso del Etanol para Control y Disminución de Gases contaminantes en Automotores. *Polo Del Conocimiento*, 70. <https://doi.org/10.23857/pc.v7i8>

Costa, S., Rugiero, I., Larenas Uria, C., Pedrini, P., & Tamburini, E. (2018). Lignin Degradation Efficiency of Chemical Pre-Treatments on Banana Rachis Destined to Bioethanol Production. *Biomolecules*, 8(4), 141. <https://doi.org/10.3390/biom8040141>

Cruz, Y., Cadena, E., & Arango-Tobón, J. C. (2019). Procesamiento de la Cascarilla de Cebada Cervecera por Vía Enzimática para la Obtención de Azúcares Fermentables. *Información Tecnológica*, 30(4), 41–50. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642019000400041>

Ewunie, G., Yigezu, Z., & Morken, J. (2022). Biochemical methane potential of *Jatropha curcas* fruit shell: comparative effect of mechanical, steam explosion and alkaline pretreatments. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 12(9), 4081–4094. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-01159-1>

FAO. (2020). *Banana Market Review 2020*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Food and Organization of the United Nations. (2017). *Strategic Work of FAO for Sustainable Food and Agriculture*. [www.fao.org/sustainability](http://www.fao.org/sustainability)

Galbe, M., & Zacchi, G. (2007). Pretreatment of Lignocellulosic Materials for Efficient Bioethanol Production. En *Biofuels* (pp. 41–65). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/10\\_2007\\_070](https://doi.org/10.1007/10_2007_070)

Gonçalves, L., Achilles, G., Marangoni, C., Sellin, N., Marangoni, C., & Souza, O. (2013). Hydrolysis of banana tree pseudostem and second-generation ethanol production by *saccharomyces cerevisiae*. *Formerly Part of Journal of Environmental Science and Engineering*, 2, 65–69. <https://www.researchgate.net/publication/291134973>

González, M. (2021). *Intensificación del Proceso de Producción de Etanol Lignocelulósico* [Tesis Doctoral en Ciencias Naturales e Ingeniería]. Universidad Autónoma Metropolitana.

Guarnizo, A., Martínez, P., & Valencia, H. (2009). Pretratamientos de la Celulosa y Biomasa para la Sacarificación. *Scientia Et Technica*, XV(ISSN 0122-1701).

Guo, Z., Zhang, Q., You, T., Ji, Z., Zhang, X., Qin, Y., & Xu, F. (2019). Heteropoly acids enhanced neutral deep eutectic solvent pretreatment for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of *Miscanthus x giganteus* under mild conditions. *Bioresource Technology*, 293, 122036. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122036>

Harun, R., & Danquah, M. K. (2011). Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production. *Chemical Engineering Journal*, 168(3), 1079–1084. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.01.088>

Hoşgün, E. Z., & Bozan, B. (2020). Effect of Different Types of Thermochemical Pretreatment on the Enzymatic Hydrolysis and the Composition of Hazelnut Shells. *Waste and Biomass Valorization*, 11(7), 3739–3748. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00711-z>

Islam, Md., Asad, M., Hossain, M., Paul, S., & Sujon, S. M. (2019). Bioethanol Production from Banana Pseudostem by Using Separate and Cocultures of Cellulase Enzyme with *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Environmental Science and Technology*, 12(4), 157–163. <https://doi.org/10.3923/jest.2019.157.163>

Islam, Md. Z., Asad, M. A., Hossain, Md. T., Paul, S. C., & Sujon, S. M. A. (2019). Bioethanol Production from Banana Pseudostem by Using Separate and Cocultures of Cellulase Enzyme with *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Environmental Science and Technology*, 12(4), 157–163. <https://doi.org/10.3923/jest.2019.157.163>

Jayasekara, S., & Ratnayake, R. (2019). Microbial Cellulases: An Overview and Applications. In *Cellulose*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84531>

Joelsson, E., Erdei, B., Galbe, M., & Wallberg, O. (2016). Techno-economic evaluation of integrated first- and second-generation ethanol production from grain and straw. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0423-8>

Kalnenieks, U., Pappas, K. M., & Bettenbrock, K. (2020). *Zymomonas mobilis* metabolism: Novel tools and targets for its rational engineering (pp. 37–88). <https://doi.org/10.1016/bs.ampps.2020.08.001>

Khalil, S. R. A., Abdelhafez, A. A., & Amer, E. A. M. (2015). Evaluation of bioethanol production from juice and bagasse of some sweet sorghum varieties. *Annals of Agricultural Sciences*, 60(2), 317–324. <https://doi.org/10.1016/j.aas.2015.10.005>

Kucharska, K., Rybarczyk, P., Hołowacz, I., Łukajtis, R., Glinka, M., & Kamiński, M. (2018). Pretreatment of Lignocellulosic Materials as Substrates for Fermentation Processes. *Molecules*, 23(11), 2937. <https://doi.org/10.3390/molecules23112937>

Kumar, A., Mylapilli, S. V. P., & Reddy, S. N. (2019). Thermogravimetric and kinetic studies of metal (Ru/Fe) impregnated banana pseudo-stem (*Musa acuminata*). *Bioresource Technology*, 285, 121318. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121318>

Laltha, M., Sewsynker-Sukai, Y., & Gueguim Kana, E. B. (2022). Simultaneous saccharification and citric acid production from paper wastewater pretreated banana pseudostem: Optimization of fermentation medium formulation and kinetic assessment. *Bioresource Technology*, 361, 127700. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127700>

Lateef, F., & Ogunsuyi, H. (2021). Jatropha curcas L. biomass transformation via torrefaction: Surface chemical groups and morphological characterization. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 4, 100142. <https://doi.org/10.1016/j.crgsc.2021.100142>

Legodi, L., Lagrange, D., Jansen, E., & Ncube, I. (2021). Enzymatic Hydrolysis and Fermentation of Banana Pseudostem Hydrolysate to Produce Bioethanol. *International Journal of Microbiology*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/5543104>

Legodi, L. M., Lagrange, D. C., Jansen Van Rensburg, E. L., & Ncube, I. (2021). Enzymatic Hydrolysis and Fermentation of Banana Pseudostem Hydrolysate to Produce Bioethanol. *International Journal of Microbiology*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/5543104>

Li, J., Liu, F., Yu, H., Li, Y., Zhou, S., Ai, Y., Zhou, X., Wang, Y., Wang, L., Peng, L., & Wang, Y. (2021). Diverse Banana Pseudostems and Rachis Are Distinctive for Edible Carbohydrates and Lignocellulose Saccharification towards High Bioethanol Production under Chemical and Liquid Hot Water Pretreatments. *Molecules*, 26(13), 3870. <https://doi.org/10.3390/molecules26133870>

Low, J. C., Halis, R., Shah, U. K. M., Paridah, M. T., Abood, F., Tuhaila, T., Danial, M. I., Lakarim, L., & Razali, N. (2015). Enhancing Enzymatic Digestibility of Alkaline Pretreated Banana Pseudostem for Sugar Production. *BioResources*, 10(1). <https://doi.org/10.15376/biores.10.1.1213-1223>

Macias, A., Pérez, J., & Torres, J. (2022). Pasado, Presente y Perspectiva del Bioetanol en Ecuador. *Revista Ciencia UNEMI*, 15. <https://doi.org/https://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol15iss40.2022pp38-51>

Manikandan, K., & Thangavelu, V. (2010). Optimization of C/N ratio of the medium and fermentation conditions of ethanol production from tapioca starch using co - Culture of *aspergillus niger* and *sachormyces cerevisiae*. *Article in International Journal of ChemTech Research*, 2(2), 947–955. <https://www.researchgate.net/publication/286177399>

Martins, F., Felgueiras, C., Smítikova, M., & Caetano, N. (2019). Analysis of fossil fuel energy consumption and environmental impacts in European countries. *Energies*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/en12060964>

Mateus, Lady. (2011). *Evaluación de los pretratamientos con ácido sulfúrico diluido y AFEX en la biomasa lignocelulósica del tipo pasto gigante "Pennisetum Sp"* [Tesis de Maestría en Ingeniería Química]. Universidad Nacional de Colombia.

Mathanker, A., Pudasainee, D., Kumar, A., & Gupta, R. (2020). Hydrothermal liquefaction of lignocellulosic biomass feedstock to produce biofuels: Parametric study and products characterization. *Fuel*, 271, 117534. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117534>

Meneses, M., Agatón, L., Mejía, L., Guerrero, L., & Botero, J. (2010). *APROVECHAMIENTO INDUSTRIAL DE RESIDUOS DE COSECHA Y POSCOSECHA DEL PLÁTANO EN EL DEPARTAMENTO DE CALDAS*. <https://educacioneningenieria.org/index.php/edi/article/view/14/13>

Meng, F., Zhang, X., Yu, W., & Zhang, Y. (2019). Kinetic analysis of cellulose extraction from banana pseudo-stem by liquefaction in polyhydric alcohols. *Industrial Crops and Products*, 137, 377–385. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.05.025>

Mishra, A., & Ghosh, S. (2019). Bioethanol production from various lignocellulosic feedstocks by a novel "fractional hydrolysis" technique with different inorganic acids and co-culture fermentation. *Fuel*, 236, 544–553. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.09.024>

Mohd Azhar, S. H., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Mohd Faik, A. A., & Rodrigues, K. F. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production. En *Biochemistry and Biophysics Reports* (Vol. 10, pp. 52–61). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.03.003>

Mohnot, D., Biswas, R., & Bisaria, V. S. (2016). Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Residues. En *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery* (pp. 543–560). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802323-5.00023-2>

Murgueitio, E., Campo, M., Nirchio, M., Cuesta, O., & Tocto, J. (2019). Composición Química y Actividad Biológica del Pseudotallo de Musa x Paradisiaca L (BANANO). *Ciencia Unemi*, 12.

Neto, A. C., Guimarães, M. J. O. C., & Freire, E. (2018). Business models for commercial scale second-generation bioethanol production. *Journal of Cleaner Production*, 184, 168–178. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.02.220>

Nurfahmi, R., Mofijur, M., Ong, H., Jan, B., Kusumo, F., Sebayang, A., Husin, H., Silitonga, A., Mahlia, T., & Rahman, M. (2019). Production Process and Optimization of Solid Bioethanol from Empty Fruit Bunches of Palm Oil Using Response Surface Methodology. *Processes*, 7(10), 715. <https://doi.org/10.3390/pr7100715>



Odetoye, T. E., Afolabi, T. J., Abu Bakar, M. S., & Titiloye, J. O. (2018). Thermochemical characterization of Nigerian *Jatropha curcas* fruit and seed residues for biofuel production. *Energy, Ecology and Environment*, 3(6), 330–337. <https://doi.org/10.1007/s40974-018-0104-0>

Olivo, M., Díaz, B., Haro, C., & Borrás, L. (2021). Optimización De La Hidrólisis Para El Tratamiento De Biomasa lignocelulósica Con Enzimas De *Aspergillus Niger*. *Ciencia En Desarrollo*, 12(1), 99–111. <https://doi.org/10.19053/01217488.v12.n1.2021.12820>

Oluseun, I., & Adebukola, O. (2021). Agricultural Solid Wastes: Causes, Effects, and Effective Management. En *Strategies of Sustainable Solid Waste Management*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.93601>

Osman, A. I., Qasim, U., Jamil, F., Al-Muhtaseb, A. H., Jrai, A. A., Al-Riyami, M., Al-Maawali, S., Al-Haj, L., Al-Hinai, A., Al-Abri, M., Inayat, A., Waris, A., Farrell, C., Maksoud, M. I. A. A., & Rooney, D. W. (2021). Bioethanol and biodiesel: Bibliometric mapping, policies and future needs. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 152, 111677. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111677>

Pahla, G., Mamvura, T. A., Ntuli, F., & Muzenda, E. (2017). Energy densification of animal waste lignocellulose biomass and raw biomass. *South African Journal of Chemical Engineering*, 24, 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2017.10.004>

Parascanu, M., Sandoval, F., Soreanu, G., Valverde, J. L., & Sanchez-Silva, L. (2017). Valorization of Mexican biomasses through pyrolysis, combustion and gasification processes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 71, 509–522. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.079>

Parsaee, M., Kiani, M., & Karimi, K. (2019). A review of biogas production from sugarcane vinasse. *Biomass and Bioenergy*, 122, 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.01.034>

Patel, H., Khimani, M., Vekariya, R., & Mahatma, L. (2021). A sustainable production of lignocellulolytic enzymes and value added metabolites from banana pseudostem waste by *Bacillus wakoensis* NAULH-4. *Process Biochemistry*, 105, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.03.021>

Patel, H., Rajai, V., Das, P., Charola, S., Mudgal, A., & Maiti, S. (2018). Study of *Jatropha curcas* shell bio-oil-diesel blend in VCR CI engine using RSM. *Renewable Energy*, 122, 310–322. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.01.071>

Pfeil, M., Tobío, I., Denfeld, D., Díaz, Y., Pohl, S., & Piloto, R. (2021). Characterization and assessment of *Jatropha curcas* and *Moringa oleifera* husk and their potential use in gasification. *Energy, Ecology and Environment*, 6(2), 170–182. <https://doi.org/10.1007/s40974-020-00179-x>

Piloto, R., Tobío, I., Ortiz, M., Díaz, Y., Konradi, S., & Pohl, S. (2020). An approach to the use of *Jatropha curcas* by-products as energy source in agroindustry. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 1–21. <https://doi.org/10.1080/15567036.2020.1749192>

Przybysz Buzala, K., Kalinowska, H., Przybysz, P., & Małachowska, E. (2017). Conversion of various types of lignocellulosic biomass to fermentable sugars using kraft pulping and enzymatic hydrolysis. *Wood Science and Technology*, 51(4), 873–885. <https://doi.org/10.1007/s00226-017-0916-7>

Rahayuningsih, M., Febrianti, F., & Syamsu, K. (2022). Enhancement of bioethanol production from tofu waste by engineered simultaneous saccharification and fermentation (SSF) using co-culture of mold and yeast. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1063(1), 012004. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1063/1/012004>

Rajeswari, K., Rekha, B., & Saravanathamizhan, R. (2021). Promotion of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass using natural additives for bioethanol production. *Environmental Quality Management*, 31(2), 43–49. <https://doi.org/10.1002/tqem.21705>

Ramírez, V., Martí, J., Romero, M., & Rivadeneira, D. (2019). Energy use of *Jatropha* oil extraction wastes: Pellets from biochar and *Jatropha* shell blends. *Journal of Cleaner Production*, 215, 1095–1102. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.01.132>

Redondo, C., Rodríguez, M., Vallejo, S., Murillo, J. P., Lopretti, M., & Vega-Baudrit, J. R. (2020). Biorefinery of Biomass of Agro-Industrial Banana Waste to Obtain High-Value Biopolymers. *Molecules*, 25(17), 3829. <https://doi.org/10.3390/molecules25173829>

Rezania, S., Oryani, B., Cho, J., Talaiekhozani, A., Sabbagh, F., Hashemi, B., Rupani, P. F., & Mohammadi, A. A. (2020). Different pretreatment technologies of lignocellulosic biomass for bioethanol production: An overview. *Energy*, 199. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2020.117457>

Rojas, J. (2019). *Producción de Bioetanol de Segunda Generación a Partir de Bagazo de Cerveza* [Tesis Doctoral]. Universidad de JAÉN.

Rusecki, H., Skowrońska, M., Chojnacka, S., Kraska, P., Andruszczak, S., & Mocek-Plócinia, A. (2019). Fertilizing Potential of Rye Stillage in a Maize Agroecosystem. *Agronomy*, 9(11), 688. <https://doi.org/10.3390/agronomy9110688>

Shahad, H. A. K., & Wabdan, S. K. (2015). Effect of Operating Conditions on Pollutants Concentration Emitted from a Spark Ignition Engine Fueled with Gasoline Bioethanol Blends. *Journal of Renewable Energy*, 2015, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2015/170896>

Sharma, B., Larroche, C., & Dussap, C.-G. (2020). Comprehensive assessment of 2G bioethanol production. *Bioresource Technology*, 313, 123630. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123630>

Sinche, D., & Ramírez, V. (2022). Sacarificación y fermentación simultánea de la cáscara de *Jatropha curcas* pretratada hidrotérmicamente para producción de bioetanol. *Revista de La Universidad de Costa Rica*, 32. <https://doi.org/10.15517/ri.v32i1.46884>

Smith, M. D. (2019). An Abbreviated Historical and Structural Introduction to Lignocellulose. *ACS Symposium Series*, 1338, 1–15. <https://doi.org/10.1021/bk-2019-1338.ch001>

Sricharoenchaikul, V., Pechyen, C., Aht-ong, D., & Atong, D. (2008). Preparation and Characterization of Activated Carbon from the Pyrolysis of Physic Nut (*Jatropha curcas* L.) Waste. *Energy & Fuels*, 22(1), 31–37. <https://doi.org/10.1021/ef700285u>

Stewart, G. G. (2014). SACCHAROMYCES | *Saccharomyces cerevisiae*. En *Encyclopedia of Food Microbiology* (pp. 309–315). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00292-5>

Suárez, C., Garrido, A., & Guevara, C. (2016). *Levadura Saccharomyces cerevisiae y la producción de alcohol*. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223148420004>

Sujan, S., Jamal, M., Asad, M., & Fakhruddin, A. (2019). Bio-ethanol production from *Jatropha curcas*. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, 54(1), 39–46. <https://doi.org/10.3329/bjsir.v54i1.40729>

Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)

Taib, R., Abdullah, N., & Aziz, N. (2021). Bio-oil derived from banana pseudo-stem via fast pyrolysis process. *Biomass and Bioenergy*, 148, 106034. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106034>

Tan, I. S., Lam, M. K., Foo, H. C. Y., Lim, S., & Lee, K. T. (2020). Advances of macroalgae biomass for the third generation of bioethanol production. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 28(2), 502–517. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2019.05.012>

Tan, I. S., & Lee, K. T. (2014). Enzymatic hydrolysis and fermentation of seaweed solid wastes for bioethanol production: An optimization study. *Energy*, 78, 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2014.04.080>

Traverso, L., Colangeli, M., Morese, M., Pulighe, G., & Branca, G. (2020). Opportunities and constraints for implementation of cellulosic ethanol value chains in Europe. *Biomass and Bioenergy*, 141. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105692>

Vázquez, H., & Dacosta, O. (2007). *Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas*. <https://www.scielo.org.mx/pdf/iit/v8n4/v8n4a4.pdf>

Wang, X., Yang, S., Shen, B., Yang, J., & Xu, L. (2022). Pyrolysis of Biomass Pineapple Residue and Banana Pseudo-Stem: Kinetics, Mechanism and Valorization of Bio-Char. *Catalysts*, 12(8), 840. <https://doi.org/10.3390/catal12080840>

Wojtusik, M. (2019). *Hidrólisis Enzimática de Materiales Lignocelulósicos* [Tesis Doctoral]. Universidad Complutense de Madrid.

## AUTORES

**KEVIN ADRIÁN ZAMBRANO PAZ:** Gobierno Autónomo descentralizado municipal de El Carmen; Facultad de ingeniería, industria y arquitectura. Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí.

<https://orcid.org/0009-0004-1359-1724>

**CARMEN ADELA SOLORIZANO PONCE:** Universidad Técnica de Manabí – Facultad de ciencias Físicas, Químicas y Matemáticas.

<https://orcid.org/0009-0001-9283-3549>

**ERNESTO ALONSO ROSERO DELGADO:** Facultad de Ciencias Físicas, Matemáticas y Químicas, Ing. Química, Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Ecuador.

<https://orcid.org/0000-0001-8878-8522>

**CHRISTHEL ANDRADE:** Facultad de Ciencias Físicas, Matemáticas y Químicas, Ing. Química, Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Ecuador.

<https://orcid.org/0000-0002-2448-6186>

**JULIO TORRES:** Departamento de Química, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Ecuador.

<https://orcid.org/0000-0002-1290-5240>

**YULIXIS CANO:** Departamento de Química, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Ecuador.

<https://orcid.org/0000-0003-4442-9039>

**LARISSA SACOTO:** Departamento de Química, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Ecuador.

<https://orcid.org/0000-0002-9062-9851>

**EFRAIN PÉREZ VEGA:** Departamento de Química, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Ecuador.

<https://orcid.org/0000-0003-4718-4479>

**JOHAN VICENTE CUSME CANDELA:** Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí - Facultad de ingeniería, industria y arquitectura.

<https://orcid.org/0009-0003-3964-4233>

**CARMEN MARÍA MOREIRA VASQUEZ:** Universidad Técnica de Manabí – Facultad de Agro ciencias.

<https://orcid.org/0009-0002-2609-4941>

**BESCY KEILA ALCIVAR PINARGOTE:** Universidad Técnica de Manabí – Facultad de Agro ciencias.

<https://orcid.org/0009-0007-7897-2773>

**Andrea Valeria García Palma:** Universidad Técnica de Manabí – Facultad de Ciencias Básicas.

<https://orcid.org/0009-0000-1982-0904>

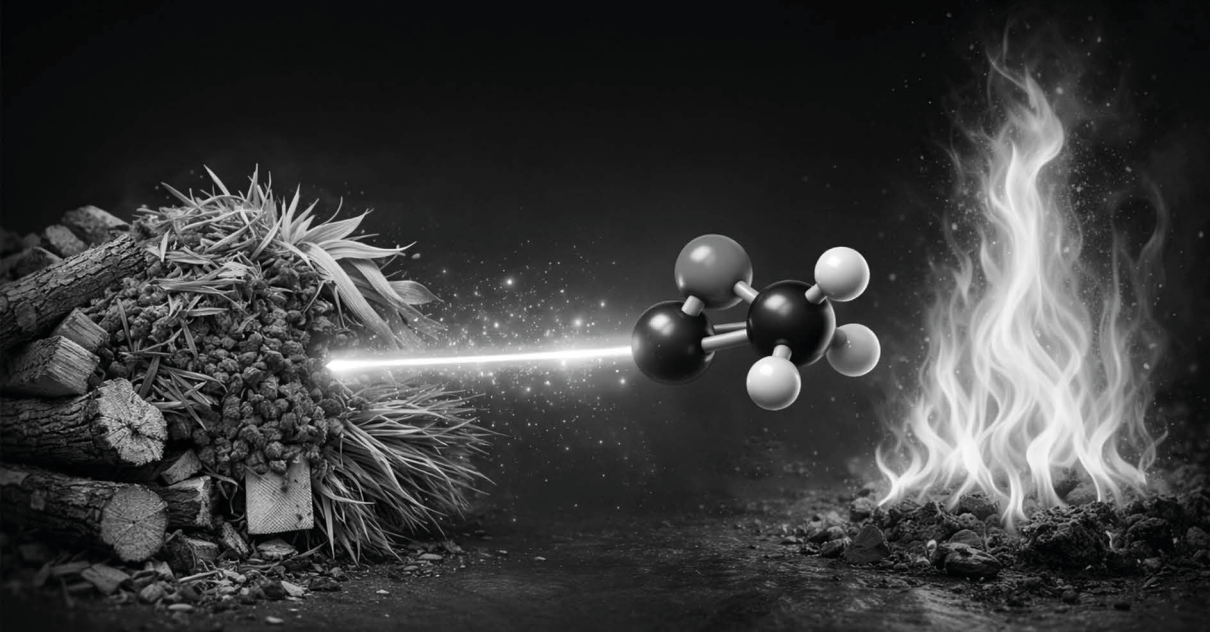
Guia para la Evaluación y Ajuste de la  
Hidrólisis Enzimática en Biomasa  
Lignocelulósica para la Producción de  
**BIOETANOL LIGNOCELULÓSICO**

🌐 [www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)

✉ [contato@atenaeditora.com.br](mailto:contato@atenaeditora.com.br)


📷 @atenaeditora

📘 [www.facebook.com/atenaeditora.com.br](https://www.facebook.com/atenaeditora.com.br)





Guia para la Evaluación y Ajuste de la  
Hidrólisis Enzimática en Biomasa  
Lignocelulósica para la Producción de  
**BIOETANOL LIGNOCELULÓSICO**

 [www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)

 [contato@atenaeditora.com.br](mailto:contato@atenaeditora.com.br)

 [@atenaeditora](https://www.instagram.com/atenaeditora)

 [www.facebook.com/atenaeditora.com.br](https://www.facebook.com/atenaeditora.com.br)

