

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL
Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas

Título del trabajo

**Producción de bioetanol a partir de hidrólisis enzimática con
Trichoderma spp y posterior fermentación alcohólica con
saccharomyses cerevisiae de cáscara de cacao.**

PROYECTO INTEGRADOR

Previo a la obtención del Título de:
Ingeniero Químico

Presentado por:

Viviana Andrea Corrales Mendoza
Fernanda Carolina Chacha Coyago

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2021

DEDICATORIA

El presente proyecto se lo dedico a Dios, quien ha sido mi principal motor y fortaleza, para no rendirme a pesar de las adversidades.

A mis padres Omar y Karina, quienes me apoyaron desde el primer día, aun cuando eso significaría alejarme de ellos para vivir sola en otra ciudad. Gracias mamá, por creer en mi madurez y responsabilidad, teniéndome siempre en sus oraciones.

A mi novio Carlos, quien siempre estuvo presente cuando lo necesité; me brindó sus consejos con paciencia y amor, recordándome que todo es posible si tengo fe y disciplina.

A mis hermanos Omar y Marcos, demás familiares y amigos, por festejar mis logros con mucho cariño y ser también mi soporte en las tristezas.

Viviana Corrales

DEDICATORIA

Deseo dar gracias a Dios Elohim por su amor infinito y especialmente por permitir que mi familia este unida.

Este proyecto se lo dedico a mis padres, Laura Coyago y Victor Chacha, por todos los esfuerzos, apoyo incondicional y por ser mi ejemplo de vida. Papi y mami muchas gracias.

A mis hermanos, demás familiares y amigos por sus buenos deseos y ayuda en diversas situaciones.

A una persona grandiosa que me dio grandes enseñanzas y consejos que me ayudaron a progresar en mi vida estudiantil y profesional.

Fernanda Chacha

AGRADECIMIENTO

Mi más sincero agradecimiento a nuestro tutor PhD. Joel Vielma, quien, con su guía y apoyo constante, nos motivó a desarrollar habilidades en el área de investigación.

A los Dres. Fernando Espinoza y Luis Galarza, por su disponibilidad y enseñanzas dentro del CIBE. Sin ellos no hubiera sido posible la ejecución del proceso microbiológico.

Del mismo modo al PhD. Joan Vera, quien nos compartió su conocimiento y tiempo valioso, para resolver inquietudes inherentes al proyecto.

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *Viviana Andrea Corrales Mendoza* y *Fernanda Carolina Chacha Coyago* damos nuestro consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”



Viviana Corrales



Fernanda Chacha

EVALUADORES

NADIA MAGALY
FLORES
MANRIQUE

Firmado digitalmente
por NADIA MAGALY
FLORES MANRIQUE
Fecha: 2021.09.22
14:46:48 -05'00'

M. Sc. Nadia Flores Manrique

PROFESOR DE LA MATERIA



Firmado electrónicamente por:
**JOEL EDUARDO
VIELMA PUENTE**

PhD. Joel Vielma Puente

PROFESOR TUTOR

RESUMEN

El incremento en la demanda de combustibles fósiles y la disminución de este recurso no renovable, han permitido buscar nuevas fuentes de energía limpia que utilicen los desperdicios como materia prima, de esta forma se reduce la cantidad de *Gases de Efecto Invernadero (GEI)* que son los causantes de varias enfermedades del cuerpo humano. Actualmente el empleo de biomasa lignocelulósica constituye una de las opciones más viables en la producción de *Biocombustibles de Segunda Generación*, pero la metodología aplicada no siempre es la más óptima; por ello, en el presente proyecto se desea obtener bioetanol a partir de la cáscara de cacao, integrando un proceso de *Hidrólisis Enzimática* al proceso tradicional de fermentado, mediante un hongo *Trichoderma* de la especie *ghanense*.

La caracterización fue realizada con base en las Normas AOAC. Luego, para la obtención de etanol, la biomasa fue tratada con un proceso químico alcalino, el propósito fue disminuir la lignina presente y acceder más fácilmente al porcentaje de celulosa. Después, se realizó la inoculación con el hongo a diferentes concentraciones, manteniendo un pH de 4.5 y un período de hidrólisis de 11 días, y por último se llevó a cabo el proceso de fermentación. Para la cuantificación de bioetanol se utilizó un cromatógrafo de gases.

De acuerdo con el diseño de experimento, se emplea tres concentraciones diferentes del hongo; evidenciando que, al aumentar la concentración, disminuye el volumen de bioetanol producido. Por lo que finalmente se determina, que la concentración (C1) de 0 esporas/mL es la más óptima para el proceso de producción.

Palabras Clave: Gases de Efecto Invernadero, Metodología, Fermentación, *Trichoderma ghanense*.

ABSTRACT

The increase in the demand for fossil fuels and the decrease of this non-renewable resource, have allowed the search for new sources of clean energy that use waste as raw material, thus reducing the amount of Greenhouse Gases (GHG) that are the cause of several diseases of the human body. Currently, the use of lignocellulosic biomasses constitutes one of the most viable options in the production of Second-Generation Biofuels, but the methodology applied is not always the most optimal; therefore, in the present project we wish to obtain bioethanol from cocoa shells, integrating an Enzymatic Hydrolysis process to the traditional fermentation process, by means of a Trichoderma fungus of the ghanense species.

The characterization was carried out based on the AOAC Standards. Then, to obtain ethanol, the biomass was treated with an alkaline chemical process, the purpose was to reduce the lignin present and access more easily to the percentage of cellulose. Afterwards, inoculation with the fungus was carried out at different concentrations, maintaining a pH of 4.5 and a hydrolysis period of 11 days, and finally the fermentation process was carried out. A gas chromatograph was used for bioethanol quantification.

According to the experiment desing, we use three different concentrations of fungus and it was found that, as the concentration increases, the volume of bioethanol produced decreases; therefore, it is finally determined that the concentration (C1) of 0 spores/mL is the most optimal for the production process.

Keywords: *Greenhouse Gases, Methodology, Fermentation, Trichoderma ghanense*

ÍNDICE GENERAL

EVALUADORES	6
RESUMEN	I
ABSTRACT.....	II
ÍNDICE GENERAL.....	III
ABREVIATURAS	V
SIMBOLOGÍA.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Descripción del problema	1
1.2 Justificación del problema	2
1.3 Objetivos	3
1.3.1 Objetivo General.....	3
1.3.2 Objetivos Específicos.....	4
1.4 Marco Teórico	4
1.4.1 Composición de residuos lignocelulósicos de cacao CCN-51	5
1.4.2 Hongo <i>Trichoderma spp.</i>	6
1.4.3 Bioetanol mediante la conversión de la biomasa lignocelulósica	7
1.4.4 Caracterización del etanol	9
CAPÍTULO 2	12
2. METODOLOGÍA.....	12
2.1 Diseño Experimental	12
2.2 Equipos	13
2.3 Muestra o Población.....	14
2.4 Preparación de la muestra	14
2.5 Caracterización de la biomasa	14
2.5.1 Determinación de contenido de humedad.....	15
2.5.2 Determinación del contenido de cenizas.....	15
2.5.3 Determinación de la holocelulosa	16
2.5.4 Determinación del contenido de celulosa.....	17
2.5.5 Determinación de la hemicelulosa	18

2.5.6	Determinación del contenido de Lignina	18
2.6	Procedimiento para la obtención del bioetanol	19
2.6.1	Siembra del hongo <i>Trichoderma ghanense</i>	20
2.6.2	Pretratamiento alcalino	20
2.6.3	Hidrólisis enzimática	21
2.6.4	Fermentación.....	23
2.7	Cuantificación del bioetanol.....	24
2.7.1	Cromatógrafo de gases	24
2.7.2	Preparación de concentraciones.....	25
2.8	Tratamiento estadístico de los resultados	26
2.8.1	ANOVA de un factor	27
2.8.2	Estadístico F	27
2.8.3	Prueba de Tukey	27
CAPÍTULO 3	28
3.	RESULTADOS Y ANÁLISIS	28
3.1	Caracterización de la biomasa	28
3.2	Análisis estadístico.....	32
3.2.1	Prueba de Normalidad	32
3.2.2	Análisis de tabla ANOVA para cada tratamiento	35
3.3	Cromatografía de gases (etanol)	40
CAPÍTULO 4	43
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	43
4.1	Conclusiones.....	43
4.2	Recomendaciones.....	44
BIBLIOGRAFÍA	45
ANEXOS	50

ABREVIATURAS

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
AOAC	Asociación de Químicos Agrícolas
GEI	Gases de Efecto Invernadero
CIBE	Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador
DCA	Diseño Completamente Aleatorizado
CFA	Cacao Fino de Aroma
CG	Cromatografía de Gases
CGS	Cromatografía de Gases Sólida
CGL	Cromatografía de Gases Líquida
ANOVA	Análisis de Varianza
PDA	Agar Papa Dextrosa
CCN-51	Variedad de Cacao
ATP	Adenosín Trifosfato
SCR	Suma de Cuadrados de la Regresión
SCE	Suma de Cuadrados de los Residuos
MSE	Cuadrado Medio del Error

SIMBOLOGÍA

W_i	Peso inicial de la muestra
W_c	Peso del crisol vacío y seco
W_o	Peso final de la muestra seca
W_{co}	Peso del crisol con la muestra calcinada
mL	Mililitros
μm	Micrómetros
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
mg	Miligramo
pH	Potencial de Hidrógeno
n	Número total de observaciones en la muestra
k	Grados de libertad
w	Comparador de Tukey
q	Valor crítico de Tukey
r	Número de repeticiones
NaOH	Hidróxido de sodio
H_2SO_4	Ácido Sulfúrico
$(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$	Celulosa
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_5$	Glucosa
H_2O	Agua
CO_2	Dióxido de Carbono
$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	Etanol
SiO_2	Dióxido de Silicio
Cl	Cloro
SO_3	Trióxido de Azufre
Al_2O_3	Óxido de Aluminio
Fe_2O_3	Trióxido de dihierro
P_2O_5	Pentóxido de difósforo
CaO	Óxido de Calcio
MgO	Óxido de Magnesio
$(\text{Na},\text{K})_2\text{O}$	Óxido de Sodio y Óxido de Potasio

C ₁₁	Concentración 1 Nivel 1
C ₁₂	Concentración 2 Nivel 1
C ₁₃	Concentración 3 Nivel 1
C ₂₁	Concentración 1 Nivel 2
C ₂₂	Concentración 2 Nivel 2
C ₂₃	Concentración 3 Nivel 2
C ₃₁	Concentración 1 Nivel 3
C ₃₂	Concentración 2 Nivel 3
C ₃₃	Concentración 3 Nivel 3

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Taxonomía del hongo <i>Trichoderma ghanense</i>	7
Figura 2.1 Cacao especie CCN-51	14
Figura 2.2 Cáscara de cacao seca	15
Figura 2.3 Cenizas de la cáscara de cacao	16
Figura 2.4 Celulosa de la cáscara de cacao	17
Figura 2.5 Lignina de la cáscara de cacao	18
Figura 2.6 Diagrama de bloque del proceso de producción de etanol	19
Figura 2.7 Cultivo de <i>Trichoderma ghanense</i>	20
Figura 2.8 Biomasa a los 8 días de inoculación	22
Figura 2.9 Biorreactor.....	23
Figura 2.10 Cromatógrafo de gases con inyector automatizado	25
Figura 3.1 Prueba de Anderson Darling	33
Figura 3.2 Histogramas de residuos A) Histograma resultante del análisis total de datos obtenidos en la experimentación B) Histograma resultante sin datos aberrantes.	33
Figura 3.3 Residuos vs. Ajustes	34
Figura 3.4 Residuos vs orden.....	35
Figura 3.5 Prueba individual de Fisher para cada combinación de niveles.....	37
Figura 3.6 Prueba Tukey de combinación de niveles a un 95% de confianza	38
Figura 3.7 Diagrama de cajas de Volumen de etanol vs los tres niveles de concentración.....	39
Figura 3.8 Gráfica de valores individuales de Volumen de etanol vs Concentración	39
Figura 3.9 Curva de calibrado	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Composición lignocelulósica del cacao CCN-51	5
Tabla 2.1 Diseño de experimentos	12
Tabla 2.2 Variables controladas y no controladas durante el experimento	13
Tabla 2.3 Nombres y marcas de los equipos utilizados	13
Tabla 2.4 Condiciones de operación del equipo	24
Tabla 2.5 Concentraciones del Estándar	25
Tabla 3.1 Resultados del porcentaje de humedad.....	28
Tabla 3.2 Resultados del contenido de cenizas.....	29
Tabla 3.3 Resultados del contenido de holocelulosa	30
Tabla 3.4 Resultados del contenido de celulosa.....	30
Tabla 3.5 Resultados del contenido de hemicelulosa	30
Tabla 3.6 Resultados del contenido de lignina	30
Tabla 3.7 Resultados finales de la caracterización de la cáscara de cacao CCN-51	31
Tabla 3.8 Hipótesis propuestas para el tratamiento.....	35
Tabla 3.9 Información del factor	35
Tabla 3.10 Análisis de Varianza	36
Tabla 3.11 Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias.	36
Tabla 3.12 Pruebas individuales de Fisher.....	37
Tabla 3.13 Agrupación de información utilizando el método de Tukey	38
Tabla 3.14 Puntos de la curva de calibración	40
Tabla 3.15 Porcentaje volumen a volumen de las muestras.....	41

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Descripción del problema

Los combustibles fósiles son considerados como la fuente principal de energía debido a que satisfacen el 80% de la demanda del sector industrial, logístico y eléctrico; esta alta demanda ha permitido que la actividad de extracción de petróleo genere grandes ingresos económicos para muchos países, incluyendo Ecuador; ya que según reportes nuestro país exporta un aproximado de 30 millones de barriles de petróleo anualmente. (eluniverso.com, 2020) Aunque estos combustibles fósiles tienen una alta carga energética, han sido los principales responsables de las emisiones de Gases de Efecto Invernadero (GEI), desencadenando en lo que conocemos como calentamiento global.

Por tal razón, los científicos siguen buscando nuevas materias primas para la obtención de biocombustibles, siendo los residuos lignocelulósicos los más adecuados, ya que los residuos orgánicos en el mundo oscilan en unos 155 billones de toneladas por año. Por ejemplo, la industria cervecera utiliza sólo el 8% de los nutrientes del grano, mientras que la industria cafetera tiene un residual del 90.5% (ya que sólo utiliza el 9.5% para preparar la bebida); todos estos residuos en la mayoría de los casos terminan en depósitos de basura y luego se convertirán en emisores de gases de efecto invernadero como CH₄, N₂O y CO₂. (Cury R, Aguas M, & Martinez M, 2017)

Según registros durante los años 2007 a 2012, en nuestro país se incrementó la exportación de grano tostado y cascarilla de cacao en un 184%, posesionando a Ecuador como uno de los mayores productores y exportadores de cacao a nivel mundial. (Llerena, Guevara, & Mora, 2019) Por otro lado, esto ocasiona una alta generación de desechos que podrían ser reutilizados como materia prima para la obtención de Biocombustibles de Segunda Generación. (Cury R, Aguas M, & Martinez M, 2017)

Esta biomasa, al ser voluminosa y más dura en comparación con otros residuos agroindustriales de donde también se obtiene etanol (cáscara de naranja o piña), demanda un aumento en los costos de logística y producción. (Barazarte, Sangronis, & Unai, 2008) Por otro lado, la cáscara tiene un bajo porcentaje de celulosa en la composición que va desde el 4.59% al 27.04% según el tipo de cacao utilizado, y adicional posee una abundante cantidad de lignina y hemicelulosa, lo que finalmente produce bajos rendimientos del proceso debido a la barrera que se forma e impide la conversión de dicha celulosa en biocombustible. (Hernández J. S., 2019)

Ante esto, la mayor problemática es la metodología actualmente empleada que ha dado como resultado altos costos y bajos porcentajes de rendimiento en la producción de bioetanol, ya que en el proceso de hidrólisis enzimática se utiliza como reactivos a enzimas comerciales costosas. Por esta razón, se desea proponer una nueva metodología en la que se mejore la conversión de la celulosa reemplazando a las enzimas comerciales, para así mejorar el rendimiento de producción y rentabilidad económica. (Suryanarayana & Yogendra, 2017)

1.2 Justificación del problema

La ejecución de este proyecto es de gran importancia, puesto que, al no existir metodologías adecuadas para la obtención de biocombustibles, se seguirá incrementando el uso de combustibles fósiles que generan grandes cantidades de GEI. Así mismo, no se aprovecharían los residuos lignocelulósicos agroindustriales, que por lo general no tienen un tratamiento adecuado y terminan convirtiéndose en una fuente importante de contaminación; un ejemplo de ello es la Industria Chocolatera, que sólo utiliza para su producción los granos de cacao correspondientes a un 30% del total del fruto, ya que el otro 70% corresponde a las cáscaras y pulpa mucilaginosas. (Hernández J. S., 2019)

Es por ello que, es necesario buscar alternativas que permitan una rentabilidad sostenible para la obtención de Bioetanol de Segunda Generación, por lo que se plantea utilizar las cáscaras de cacao como materia prima, considerando que el Ecuador es el Cuarto Productor de Cacao a Nivel Mundial (Coba, 2021) y por tanto genera alrededor de 225 400 toneladas por año de residuos agrícolas. (Hernández J. S., 2019) Así mismo, se propone utilizar un hongo endógeno de la familia de los *Trichoderma spp* para reemplazar a las enzimas comerciales en la etapa de hidrólisis enzimática, que es donde el material celulósico se convierte en azúcares monoméricos únicamente mediante enzimas que degradan a la celulosa y hemicelulosa. (Perales, 2015)

De esta manera, se conseguirá el aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica como materia prima, que representa bajos costos de producción comparado al uso de cultivos feculentos. Además, los cultivos feculentos no son tan eficientes energéticamente (Abril & Navarro, 2012) y tampoco sustentables desde el punto de vista ético, ya que los granos o semillas podrían ser direccionados a más de 820 millones de personas que padecen de deficiencia alimenticia. (FAO, 2019) Por su parte, con el hongo endógeno se espera obtener mayores rendimientos de bioetanol, y como consecuencia, incentivar a un mayor uso de las bioenergías en nuestro país, lo que no sólo tendrá un impacto positivo en el medioambiente, sino que también aportará beneficios socioeconómicos.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Obtener bioetanol a partir de cáscaras de cacao mediante hidrólisis enzimática del hongo *Trichoderma ghanense*, para la evaluación de su rendimiento como materia prima de biocombustibles.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Determinar el porcentaje de celulosa, hemicelulosa y lignina contenida en la cáscara de cacao, mediante un proceso de caracterización.
- Realizar la hidrólisis enzimática a diferentes concentraciones del hongo *Trichoderma ghanense*, para la determinación del valor óptimo.
- Cuantificar el bioetanol producido por medio de un cromatógrafo de gases, para la determinación del porcentaje de rendimiento volumétrico.

1.4 Marco Teórico

En el Ecuador existe una gran diversidad de vegetación que es utilizada para muchos fines, siendo el más característico el destinado a la alimentación. El problema está cuando no se tiene una clara disposición de los residuos agroindustriales, haciendo que la contaminación del suelo, aire y agua se vean muy afectados. Con ello nace el concepto de las biorrefinerías, que utilizan dichos residuos como materia prima para la generación de fuentes de energía renovables tales como los biocombustibles (bioetanol, biogás y biodiesel). (Sigüencia, Delgado, Fausto, & Johanna, 2020)

Dicho esto, se puede analizar que el uso de biocombustibles es una excelente alternativa para el reemplazo de combustibles fósiles, los cuales actualmente constituyen la base energética y la principal materia prima de la industria. Cabe recalcar que las biorrefinerías deben cumplir ciertos objetivos de sostenibilidad ecológica, que son: i) las materias primas deben provenir únicamente de biomasa procesada. ii) tanto los productos y reactivos utilizados deben ser biodegradables y iii) los procedimientos deben basarse en los conceptos de Química Verde y Tecnologías Limpias. (Wojtusik, 2019)

Adicionalmente, las biorrefinerías se pueden clasificar según el tipo de material base utilizado, sean estos azúcares libres, cultivos ecológicos

o energéticos, aceites de semillas, biomasa forestal y lignocelulósica. Para este proyecto se utilizará la biomasa lignocelulósica como materia prima del Biocombustible de Segunda Generación, ya que para su obtención no se desvían los recursos alimenticios, sino que se utilizan restos agrícolas como bagazo de caña o cáscaras de frutas. La única desventaja es que se libera más cantidades de GEI, en comparación a los Biocombustible de Primera Generación. (Perales, 2015)

1.4.1 Composición de residuos lignocelulósicos de cacao CCN-51

Esta biomasa lignocelulósica contiene ésteres extraíbles, proteínas, carbohidratos, celulosa, hemicelulosa, lignina y material mineral; siendo entonces una fuente importante donde se almacena energía, de hecho, según un estudio de aprovechamiento energético se logró determinar que esta energía representa unos 215 477 MJ. (Sánchez J. , 2013)

Tabla 1.1 Composición lignocelulósica del cacao CCN-51 (Torres Y. , 2016)

	Porcentaje
Celulosa	27.04%
Hemicelulosa	2.97%
Lignina	45.39%

Nota: Estos valores son aproximados, ya que dependen de la zona y del tiempo del cultivo de la mazorca de cacao.

Tanto la celulosa, hemicelulosa y lignina están organizadas en microfibras que regulan la pared celular vegetal. (Perales, 2015) Así mismo, la celulosa es un biopolímero que tiene como estructura a la celobiosa unida por enlaces de hidrógenos intramoleculares que le dan un aspecto cristalino e influyen en la morfología, rigidez y resistencia de la pared vegetal. La hemicelulosa en cambio tiene como estructura carbohidratos formados por distintos polímeros, tales como las pentosas, hexosas y ácido urónicos.

Es importante aclarar que, a diferencia de la celulosa, la hemicelulosa no siempre tiene la misma estructura y composición, por lo que algunos microorganismos no son capaces de metabolizar los azúcares para convertirlos en etanol. Por último, la lignina es un heteropolímero amorfo que está formado por alcoholes aromáticos, los cuales brindan soporte, rigidez e impermeabilidad a los polisacáridos estructurales tales como la celulosa y hemicelulosa. (Perales, 2015)

1.4.2 Hongo *Trichoderma spp.*

Este género de hongo comúnmente se encuentra en el suelo y materia vegetal en descomposición. (Kubicek & E, 2002, págs. 3,4) La investigación de estos microorganismos ha permitido avances en la ciencia y un amplio impacto positivo en la humanidad, ya que debido a su naturaleza y alta competitividad son usados como controladores biológicos, productores de enzimas para tratamientos de diferentes tipos de biomasas, entre otras aplicaciones. (Sreepat & Emma, 2013, pág. 1)

El *Trichoderma* es un hongo anaeróbico que tiene un mayor desarrollo en suelos con un pH entre (3 – 6) y a un rango de temperatura entre (25 – 30°C). Es capaz de segregar enzimas que son usadas para la degradación de una amplia variedad de biomasas que a su vez contienen celulasa, hemicelulasa y quitinasa; una vez que dicho material se degrada, lo convierte en monómeros o azúcares más simples como la hexosa, glucosa y pentosa. (Hernández, Ferrera, & Alarcón, 2019)

Por otro lado, tiene una taxonomía complicada ya que se basa en características morfológicas (fig. 1.1), en la cual existe una amplia variedad de 27 especies conocidas y otras aún en estudio. (Ruiz, 2017) El *Trichoderma ghanense* es un tipo de *Trichoderma spp* muy particular para este proceso, ya que tiene como función la actividad de la hidroxilasa para unirse a la celulosa y posteriormente la hidrolificación de compuestos de O-glicosil. (Consortium, 2018)

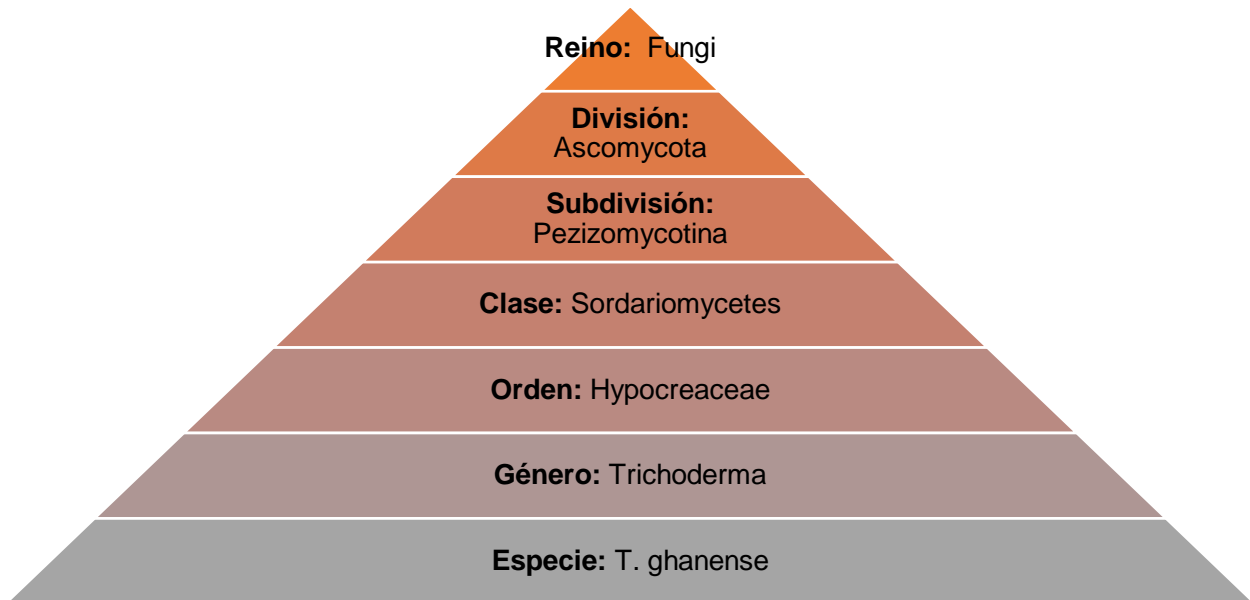


Figura 1.1 Taxonomía del hongo *Trichoderma ghanense* (Love Your Planet, s.f.)

1.4.3 Bioetanol mediante la conversión de la biomasa lignocelulósica

Para llegar a una conversión total del material lignocelulósico a biocombustible se llevan a cabo tres etapas importantes que son: Pretratamiento, Hidrólisis de la celulosa y Fermentación.

1.4.3.1 Pretratamiento

Según su naturaleza existen pretratamientos físicos, químicos, fisicoquímicos y biológicos. Entre los pretratamientos químicos existen tres tipos: Alcalino, Ácido y Oxidativo. La función principal de este pretratamiento es romper la barrera de la lignina que impide la accesibilidad de las enzimas a la celulosa y hemicelulosa, transformando la estructura y tamaño de la biomasa para facilitar el proceso de hidrólisis. (Perales, 2015)

En el pretratamiento alcalino se utilizan bases como el hidróxido de sodio, con el propósito de que la biomasa se hinche y sea más accesible para las enzimas; las dos reacciones efectuadas durante el proceso son solvatación y saponificación. Cabe recalcar que con este pretratamiento se solubilizan la hemicelulosa y parte de

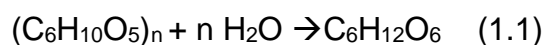
la lignina, mientras que la celulosa cambia su estructura a una más estable termodinámicamente. La desventaja es que se pierden azúcares fermentables y se produce en muchas ocasiones compuestos inhibitorios. (Quintero & Cardona, 2009)

Por otro lado, en el pretratamiento ácido se usan ácidos diluidos o concentrados para solubilizar la hemicelulosa y tener mayor accesibilidad a la celulosa, haciendo que la lignina se condense y precipite rápidamente. Además, es mejor utilizar ácidos diluidos en vez de los concentrados, puesto que las reacciones secundarias pueden ser eliminadas más fácilmente. (Quintero & Cardona, 2009)

Finalmente, en el pretratamiento oxidativo se agrega una sustancia oxidante a la biomasa tal como el peróxido de hidrógeno o ácido peracético, el cual se suspende en agua. En este proceso se llevan a cabo varias reacciones como la sustitución electrolítica, desplazamiento de cadenas laterales o rompimiento de enlaces alquil aril éter, lo que provoca que una gran cantidad de azúcares se pierda y se formen compuestos solubles de la lignina (posibles inhibidores). Sin embargo, variando ciertas condiciones como la temperatura y pH se puede obtener buenos resultados, por lo que sirve también para la deslignificación de la biomasa. (Quintero & Cardona, 2009)

1.4.3.2 Hidrólisis enzimática

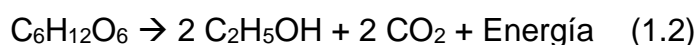
Se le llama así al proceso de sacarificación o conversión de polisacáridos a azúcares monoméricos, mediante enzimas celulasas producidas por distintos microorganismos aerobios o anaerobios. Estos pueden ser algunas bacterias u hongos filamentosos como el *Trichoderma spp*, que es idóneo porque produce celulasas y degrada la celulosa nativa a través de las enzimas que secreta (endo- β -1,4-glucanasa, exo- β -1,4-glucanasa y β -1,4-glucosidasa). (Perales, 2015)



1.4.3.3 Fermentación alcohólica

Es un proceso biológico anaerobio en el que se produce alcohol y gas carbónico como productos finales, (Perales, 2015) se utilizan microorganismos como las levaduras que tienen ciertas ventajas tales como una alta productividad, fácil separación post fermentación y poca inhibición. Algunas de las levaduras que se utilizan para el proceso de fermentación son *Saccharomyces (cerevisiae, carisbergensis, rouxii)*, *Kluyveromyces (fragilis, lactis)* y *Candida utilis*, de ellas la *S. cerevisiae* es muy eficiente, puesto que tiene una gran afinidad con los sustratos de glucosa, fructosa, galactosa, maltosa, maltotriosa y xilulosa presentes en la biomasa lignocelulósica. (Sánchez N. , 2018)

La reacción producida es exotérmica, que a su vez también va acompañada con la liberación de ATP y moléculas orgánicas de energía liberadas durante la fermentación, las cuales sirven para la supervivencia de los microorganismos. (Valenzuela, 2012)



1.4.4 Caracterización del etanol

1.4.4.1 Cromatografía de gases (CG)

Es una técnica que permite identificar cantidades existentes de diferentes compuestos en una solución, esta técnica se emplea específicamente a muestras que son volátiles o poco volátiles, ya que para su funcionamiento se necesita volatilizar la muestra mediante el flujo de un gas inerte para luego ser transportada a través de la columna. (Ozores, s.f.) Finalmente, existen dos tipos de cromatografía: Cromatografía de gas sólido (CGS) y Cromatografía de gas líquido (CGL); siendo la CGL la más usada para los gases, en la que se utiliza como fase estacionaria un líquido inmovilizado sobre

un soporte sólido inerte; mientras que la CGS se la aplica mayormente a moléculas polares. (Barquero, 2006, pág. 1)

1.4.4.2 Análisis Estadístico

Se emplearán tres métodos estadísticos para analizar los resultados cuantitativos del bioetanol producido. Estos son:

- Análisis de la Varianza (ANOVA), que permite comparar las medias de dos o más poblaciones para determinar si son iguales o por lo menos una de ellas difiere, para ello se fija una variable de respuesta y se establece al menos un factor con dos o más niveles. Así mismo, se necesitan datos que sigan una distribución normal y varianzas iguales entre los niveles. (Soporte de Minitab ® 18, 2019)

- Test estadístico F, es un “cociente entre dos cantidades, que se espera sean aproximadamente iguales bajo la hipótesis nula”. (El Blog de Minitab, 2019) Al tener muestras aleatorias de un mismo tamaño con el mismo ANOVA, se puede obtener una distribución de muestreo con los diferentes valores F obtenidos. La fórmula correspondiente es:

$$F = \frac{\frac{SCR}{k}}{\frac{SCE}{n - k - 1}} \quad (1.3)$$

Donde SCR = Suma de cuadrados de la regresión

SCE = Suma de cuadrados de los residuos

n = Número total de observaciones en la muestra

k = Grados de libertad (Marco, 2018)

- Prueba de Tukey, que se la utiliza para “comparar las medias individuales provenientes de un análisis de varianza de varias muestras”. (Cajal, 2020)

En el caso que se hayan aplicado distintos procedimientos a un igual número de muestras, lo que se necesita es discernir si los resultados son distintos o no de manera significativa. Aquí se utiliza esta fórmula:

$$w = q \sqrt{\left(\frac{MSE}{r}\right)} \quad (1.4)$$

Donde el factor q se obtiene de una tabla, el factor MSE se saca de un análisis de varianza, y el factor r significa el número de repeticiones. (Cajal, 2020)

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

2.1 Diseño Experimental

Este proyecto se desarrolló experimentalmente, basándose en una investigación previa de fuentes de literatura científica. Por estos medios se reunió algunas condiciones y datos importantes de las diferentes etapas del proceso, identificando así la variable independiente principal. Además, también se determinó que la unión de la hidrólisis enzimática con el proceso de fermentación, mejorarían el rendimiento cuantitativo del bioetanol.

Para este proyecto se definió un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA) de tipo comparativo, que consta de un solo factor o *variable independiente*, la cual se designó como la concentración del hongo (C_i); y una *variable dependiente* o variable de respuesta que es el volumen de bioetanol obtenido. El factor independiente está compuesto a su vez de tres niveles o tres diferentes concentraciones empleadas (ver tabla 2.1), de las cuales se realizó tres repeticiones de cada nivel obteniendo un total de nueve réplicas.

Tabla 2.1 Diseño de experimentos

Factor	Niveles	Repeticiones
C_i	$C_1=0$ esporas/mL	C_{11}
		C_{12}
		C_{13}
	$C_2=1 \times 10^7$ esporas/mL	C_{21}
		C_{22}
		C_{23}
	$C_3=1 \times 10^9$ esporas/mL	C_{31}
		C_{32}
		C_{33}

Elaboración propia

Por último, existen factores externos que se pudieron controlar tales como el pH, humedad de la biomasa, tiempo de duración del proceso de hidrólisis y fermentación; al igual que otros factores incontrolables como la temperatura del ambiente.

Tabla 2.2 Variables controladas y no controladas durante el experimento

	Etapa	Parámetro	Valor
Variables controladas	Pretratamiento alcalino	Temperatura	120°C
		pH	4.5
	Hidrólisis Enzimática	Humedad	70 %
		Tiempo	11 días
		Volumen de inóculo	10 mL
	Variables no controladas	Fermentación	Tiempo
Temperatura			25 – 30°C

Elaboración propia

2.2 Equipos

Tabla 2.3 Nombres y marcas de los equipos utilizados

Balanza Analítica	Marca RADWAG, modelo AS220R2
Estufa	Marca Memmert
Mufla	Marca Brandsteas Thermolyne
Baño María	Marca Memmert
Centrífuga	Marca BIOBASE
Bomba de vacío	Marca GAST
Microscopio	Marca Zeiss, modelo Axioskop 2 Plus
Autoclave	Marca BKQ-B100 (II)
pH-metro	Marca Thermo SCIENTIFIC, modelo Orion Star A211
Cromatógrafo de Gases	Marca Thermo SCIENTIFIC, modelo Trace CG ultra
Columna Capilar	Marca Agilent Technologies, modelo DB - FFAP
Agitador Magnético	Marca ColeParmer
Micropipeta 100 – 1000 µL	Marca Thermo SCIENTIFIC, modelo FINNPIPETTE F1

Elaboración propia

2.3 Muestra o Población

Las cáscaras fueron recolectadas en la Finca “La Ernestina” del cantón Buena Fe provincia de Los Ríos, resultado de la cosecha de los granos de cacao especie CCN-51 durante los meses de abril y mayo.



Figura 2.1 Cacao especie CCN-51 (Anónimo, 2019)

2.4 Preparación de la muestra

Esta biomasa fue sometida a un proceso de secado al ambiente para luego triturarla, ya que es necesario disminuir su tamaño y aumentar la superficie de contacto para todos los tratamientos realizados durante el experimento. Para la separación del tamaño de partícula se utilizó una malla #18 marca USA Standard Test Sieve de 1 mm de porosidad.

2.5 Caracterización de la biomasa

La caracterización se la realizó siguiendo los procedimientos de la AOAC Internacional para determinar el porcentaje de humedad, cenizas, hemicelulosa, celulosa y lignina. Es importante recalcar, que para cada uno de los ensayos que implicaron secado de la biomasa, el crisol se lo ingresó a la estufa sin tapa hasta alcanzar un peso constante. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

2.5.1 Determinación de contenido de humedad

Se pesó 1 g de muestra y se colocó en crisoles previamente secos, en una estufa precalentada a una temperatura de 105°C se colocaron los crisoles y se los dejó a esa temperatura durante 3 horas. Transcurrido ese tiempo se sacó los crisoles y se los colocó en un desecador para que enfríen, procediendo luego a pesarlos y anotar los valores correspondientes.



Figura 2.2 Cáscara de cacao seca

Se colocó nuevamente la muestra en la estufa por 1 hora, y se repitió el proceso hasta que el peso fue constante, este procedimiento se lo realizó de acuerdo con AOAC (1991) N° 943.01. (Soderberg) Con el peso obtenido se procedió a calcular la humedad mediante la fórmula 2.1.

$$\%Humedad = \frac{W_i - W_0}{W_i} \times 100 \quad (2.1)$$

2.5.2 Determinación del contenido de cenizas

Según las normas AOAC (1965) N° 930.05, se inició precalentando la mufla a una temperatura de 540°C, en la que luego se introdujo las muestras del proceso anterior, cuya humedad ya había sido determinada. Posteriormente, se las dejó por un tiempo de 5 horas para después colocarlas en un desecador, finalizando con el pesado de los crisoles.

Seguidamente se introdujo las muestras en la mufla por una hora más, y se repitió el proceso hasta que se obtuvo un peso constante. (International, 1990, pág. 40)



Figura 2.3 Cenizas de la cáscara de cacao

El peso final se reemplazó en la siguiente fórmula:

$$\%Cenizas = \frac{W_{co} - W_c}{W_i} \times 100 \quad (2.2)$$

2.5.3 Determinación de la holocelulosa

En un vaso de precipitado se prepara una disolución de 1 g de Clorito de Sodio en 150 mL de agua destilada y 0.2 mL de Ácido Acético glacial. Luego se le agrega 6 g de muestra y se la lleva a baño maría a una temperatura de 75°C durante aproximadamente una hora; cabe recalcar que el proceso de reacción termina cuando existe cambio de color de café a un color blanquecino, caso contrario, repetir el proceso durante las veces que sea necesario.

Una vez alcanzado el blanqueamiento de la muestra se procedió a realizar en un baño de hielo a 10°C, seguido por una centrifugación a la misma temperatura y a 3500 rpm durante 15 minutos. El líquido sobrenadante se desecha y se lava el sólido con agua destilada, mediante un sistema de filtrado al vacío.

Para obtener el peso final la muestra tratada se coloca en un crisol, y luego en una estufa a una temperatura de 105°C durante 4 horas. Después se lo colocó en un desecador para enfriarlo y evitar que adquiera humedad del medio ambiente, posteriormente se lo pesó. Este proceso se repite hasta que no haya variación en el peso; una vez obtenido dicho valor, se lo reemplaza en la siguiente fórmula:

$$\%Holocelulosa = \frac{W_o}{W_i} \times 100 \quad (2.3)$$

2.5.4 Determinación del contenido de celulosa

Se pesó en una balanza 2 g de holocelulosa obtenida y se le agregó 10 mL NaOH al 17.5%, dejando reposar por un período de 5 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se agregó nuevamente 5 mL de NaOH al 17.5%, dejando reaccionar por 30 minutos; finalmente se agregó 30 mL de agua destilada y se dejó reposar durante una hora, para después realizar un lavado con agua destilada y NaOH al 17.5% en una proporción (30:25), para esto se utiliza un sistema de filtrado al vacío. (Pinos, 2019)



Figura 2.4 Celulosa de la cáscara de cacao

Luego se le agrega a la muestra 5 mL de Ácido Acético al 10%, y se lo deja reposar por 3 minutos para después lavar con agua destilada y secarlo en una estufa a 105°C por 12 horas. Finalmente, se vuelve a secar hasta obtener un peso constante y este valor se lo reemplaza en la fórmula (2.4).

$$\% Celulosa = \frac{W_o}{W_i} \times 100 \quad (2.4)$$

2.5.5 Determinación de la hemicelulosa

El porcentaje de hemicelulosa se lo determina mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Hemicelulosa} = \% \text{ Holocelulosa} - \% \text{ Celulosa} \quad (2.5)$$

2.5.6 Determinación del contenido de Lignina

A 1 g de muestra se le agregó 15 mL de H₂SO₄ al 72% en agitación constantemente por una hora, luego se le añadió 125 mL de agua destilada y se somete la muestra a un reflujo de 4 horas. Por medio de una filtración al vacío se lavó la muestra con agua destilada caliente.



Figura 2.5 Lignina de la cáscara de cacao

Finalmente se procedió a secar colocando la muestra en una estufa durante 3 horas a una temperatura de 105°C, desecar y pesar de acuerdo con la norma AOAC (1965) N° 932.01. Se repite el proceso hasta que no haya una variación considerable en el peso. (International, 1990, pág. 60) El valor del peso final se reemplazó en la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Lignina} = \frac{W_o}{W_i} \times 100 \quad (2.6)$$

2.6 Procedimiento para la obtención del bioetanol

Para la producción de bioetanol se siguió dos tipos de procedimientos, biológicos y químicos; estos procedimientos se los realizó a las condiciones de operación extraídas de fuentes bibliográficas y se procedió según el diagrama de bloque (Fig 2.6).

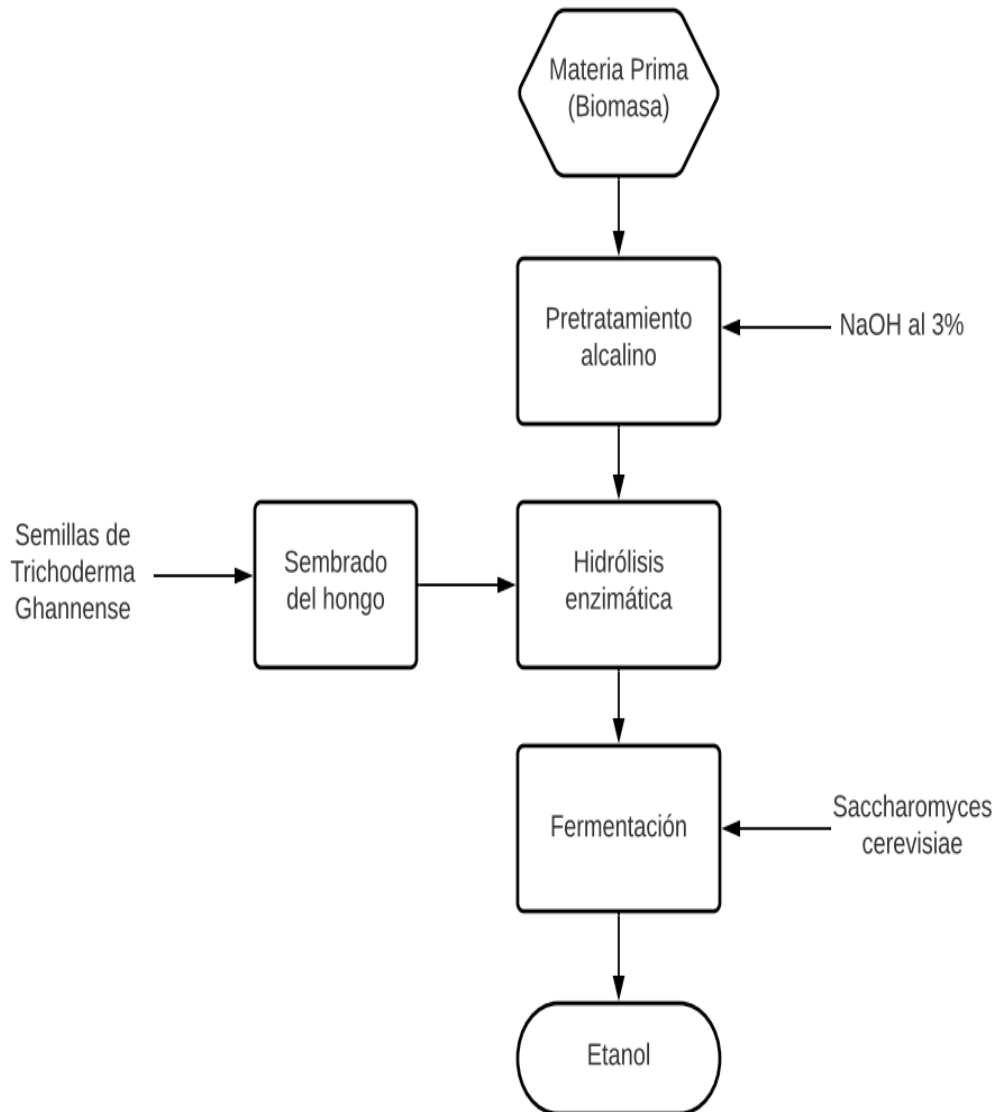


Figura 2.6 Diagrama de bloque del proceso de producción de etanol (Elaboración propia)

2.6.1 Siembra del hongo *Trichoderma ghanense*

Se utiliza como medio de cultivo el Agar Papa Dextrosa (PDA), (Michel, Otero, & Marínez, 2008) en donde se inoculan las esporas de *Trichoderma ghanense* anteriormente recolectadas de un cultivo de cacao que fueron proporcionadas por el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). La cepa del hongo se coloca en el centro de la caja Petri previamente adecuada con el PDA, luego se sella herméticamente con papel Parafilm y finalmente se la coloca en una incubadora a una temperatura de 27°C. El proceso de crecimiento es de 8 días. (Vallejo, 2014)

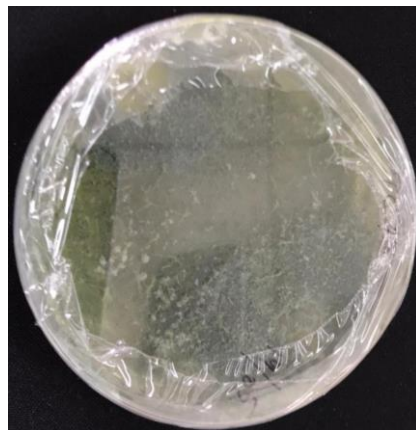


Figura 2.7 Cultivo de *Trichoderma ghanense*

2.6.2 Pretratamiento alcalino

El pretratamiento se lo realiza con la finalidad de desprender la lignina de la biomasa, y mejorar el acceso a la celulosa y hemicelulosa para el proceso de hidrólisis enzimática y posterior fermentación; mediante estudios realizados se logró probar que la hidrólisis alcalina permite un mayor porcentaje de rendimiento de etanol al finalizar el proceso. (Pinos, 2019)

Primero se tamizó la muestra en una malla # 18 de 1 mm de porosidad y se preparó una solución de NaOH al 3%. Para obtener una muestra final de 50 g se pesó 100 g de biomasa, a esta biomasa se le

agregó 750 mL de NaOH y posteriormente con la ayuda de una estufa se sometió el proceso a una temperatura de 120°C durante 1 hora y media.

Transcurrido el tiempo se procedió a enfriar, filtrar y lavar con abundante agua destilada y HCl diluido hasta alcanzar un pH de 4.5, el cual es necesario para el posterior crecimiento del hongo. La muestra tratada se la secó en una estufa a 75°C y se la retiró luego de 48 horas de secado.

2.6.3 Hidrólisis enzimática

2.6.3.1 Preparación de disolución de conidios *Trichoderma ghanense*

Con agua destilada se realiza un lavado de las esporas del hongo cultivado en la caja Petri, y de esta solución madre se toma una alícuota de 1 mL para luego enrazar hasta un volumen de 10 mL; se continuó con la dilución hasta llegar a contar 1×10^7 esporas/mL y 1×10^9 esporas/mL en la cámara de Neubauer.

Para el conteo de esporas se toma una gota de la última disolución realizada, cuidando colocar la gota en la zona central entre los dos hemisferios de la cámara, luego se colocó un cubre objetos evitando que se formen burbujas internas y con la ayuda de un microscopio se realizó el conteo.

El conteo debe realizarse de izquierda a derecha, comenzando por el primer cuadrado ubicado en la parte superior izquierda de la cámara de Neubauer y se mantiene el mismo orden hasta terminar el conteo total de la fila; cuando se finaliza se baja hasta la segunda fila comenzando de derecha a izquierda y así sucesivamente hasta llegar al último cubículo. (Vallejo, 2014)

2.6.3.2 Inoculación del hongo en la biomasa

Se pesan 50 g de muestra y se la coloca en un matraz, para luego introducirla en una autoclave, una vez finalizado el proceso de esterilización se le añade agua destilada hasta llegar a una humedad de 70%. Luego, en la inoculación se le agrega 10 mL de esporas a diferentes concentraciones (ver tabla 2.1) y se procede a rotular.

A continuación, se utilizó un tapón de algodón para facilitar el paso de O_2 ; teniendo en consideración que este tapón es ideal para el crecimiento del hongo, ya que propicia un ambiente aeróbico mientras evita el ingreso de agentes externos. Se agitó la muestra con el propósito de que las esporas queden regadas de manera uniforme en toda la muestra, y se conservó a temperatura ambiente y un período alterno de luz/oscuridad, donde los primeros 6 días se lo dejó en un ambiente de luz natural y los siguientes 5 días en oscuridad (tiempo total de 11 días). (García, Mamani, Chávez, & Álvarez, 2016)



Figura 2.8 Biomasa a los 8 días de inoculación

Finalmente, las muestras se las llevó a la autoclave para eliminar el hongo que creció durante ese tiempo y así evitar la competencia microbiana en el proceso final de fermentación.

2.6.4 Fermentación

Para el proceso de fermentación se utilizó la levadura de tipo *Saccharomyces cerevisiae*, ya que es muy eficaz para la producción de alcohol debido a su gran capacidad fermentativa. (Angulo, 2017) Primero se realizó el proceso de activación de la levadura; para esto se pesó 0.5 g de azúcar y 15 g de levadura para luego disolverlos en 75 mL de agua destilada previamente hervida y enfriada hasta alcanzar una temperatura de 28°C, se dejó reposar por 20 minutos. Una vez activada la levadura se agregó agua destilada estéril hasta llegar a 250 mL.

La solución preparada de levadura se la incorporó al biorreactor que contenía los 50 g de muestra autoclavada, y seguidamente se selló el matraz para evitar la interacción con el ambiente (proceso anaeróbico); además se permite el desfogue de CO₂ mediante una manguera de purga que está acoplada al tapón, el terminal de esta manguera se sumerge en un vaso de agua destilada para recolectar dicho gas durante el proceso.

La fermentación se llevó a cabo durante un período de 4 días, a condiciones de opacidad para favorecer el proceso y temperatura ambiente de aproximadamente 25°C. (Angulo, 2017) Una vez finalizado el proceso se filtró y se reservó el líquido en tubos de ensayo, con el fin de que la levadura sedimente y se pueda analizar el líquido sobrenadante en el cromatógrafo de gases.



Figura 2.9 Biorreactor

2.7 Cuantificación del bioetanol

2.7.1 Cromatógrafo de gases

La cuantificación de etanol se la realizó por medio de un análisis en un cromatógrafo de gases marca Thermo SCIENTIFIC con inyector automatizado, a la cual se le incorporó una columna de alta polaridad necesaria para este análisis y se operó bajo condiciones establecidas (ver tabla 2.4).

Tabla 2.4 Condiciones de operación del equipo

Fase estacionaria	Polietilenglicol modificado con Ácido Nitrorreftálico (PEG)
Dimensión de la columna (Longitud: Diámetro Interno: Espesor)	60 m: 0.25 mm: 0.25 μ m
Fase móvil	He
Flujo del gas	2 mL/min
Temperatura del inyector	180°C
Modo de Inyección	Split
Temperatura de columna	250°C
Volumen de inyección	1 μ L
Tiempo de retención	4.18 min
Tiempo de análisis	14 min

Elaboración propia

El tipo de cromatografía que se empleó fue la de gas-líquido, ya que la sustancia al ingresar pasa por un proceso de vaporización, y mediante las polaridades del compuesto y fase estacionaria, puede ser detectada en el cromatógrafo. Finalmente da como resultado picos con áreas determinadas, y con base en esos datos se procede a calcular la concentración de etanol (%v/v).



Figura 2.10 Cromatógrafo de gases con inyector automatizado

2.7.2 Preparación de concentraciones

2.7.2.1 Curva de calibrado

En matraces volumétricos de 100 mL se transfirió una alícuota de etanol absoluto que fue tomada con la ayuda de una pipeta electrónica y se enrazó con agua tipo 1 hasta alcanzar las diferentes concentraciones descritas en la tabla 2.3. De dichas soluciones se transfirieron 1.5 mL a un vial, para posteriormente ser inyectado y analizado en el Cromatógrafo de Gases y poder construir la curva de calibrado.

Tabla 2.5 Concentraciones del Estándar

%(v/v)	Etanol (mL)	Agua (mL)
0	0	100
0.1	0.1	99.9
0.3	0.3	99.7
0.5	0.5	99.5
0.7	0.7	99.3
0.9	0.9	99.1

Elaboración propia

2.7.2.2 Análisis de la muestra

Debido a que el líquido resultante del fermentado era una mezcla heterogénea, se sometió a un proceso de centrifugación durante 30 minutos y a 3500 rpm con el fin de sedimentar los sólidos, finalmente con la ayuda de una jeringa de 3 mL y un filtro de 0.45 μm se logró eliminar la mayor parte de sólidos suspendidos y así evitar que se obstruya la columna de análisis.

Por último, el líquido de cada una de las 9 muestras obtenidas fue colocado en viales de 1.5 mL y correctamente rotulados para su análisis en el cromatógrafo.

2.7.2.3 Cálculo de las concentraciones de etanol

La concentración de etanol se calculó mediante la siguiente ecuación de la recta proveniente de la curva de calibración:

$$y = ax + b \quad (2.7)$$

Donde:

y= área del pico emitido por el cromatógrafo

x= concentración de etanol (%v/v)

a= pendiente de la recta

b= intersección con la ordenada.

2.8 Tratamiento estadístico de los resultados

Los datos obtenidos en el Cromatógrafo de Gases se procesaron en el software Minitab 20, que una herramienta muy utilizada para análisis estadístico de datos. En el diseño de experimento se designó como variable dependiente la concentración de hongo *Trichoderma ghanense* y por medio de un análisis estadístico se espera analizar qué concentración influye más en el volumen de etanol obtenido en el proceso de la fermentación.

2.8.1 ANOVA de un factor

Se realizó una tabla de análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía o un solo factor con 3 niveles, en el cual se estableció un intervalo de confianza del 95% y un tipo de intervalo de confianza bilateral, esto con el objetivo de medir el nivel de las diferencias o varianzas entre las medias de las muestras y aceptar o rechazar la hipótesis nula. La hipótesis nula y alterna se muestra a continuación:

H₀ = La cantidad de bioetanol obtenido será el mismo usando cualquier concentración del hongo en la hidrólisis enzimática.

H₁ = La cantidad de bioetanol variará de acuerdo con la concentración del hongo en la hidrólisis enzimática.

2.8.2 Estadístico F

Mediante un estadístico de prueba se analizó la variabilidad que hay entre cada nivel y si se tiene un efecto de la variable analizada sobre la variable de respuesta.

Mediante la comparación del valor crítico (Anexo 1.) y el valor de F, se puede aceptar o rechazar la hipótesis nula en el que se determinó un intervalo de confianza de 0.05.

2.8.3 Prueba de Tukey

En la prueba Tukey se realizó una comparación de cada uno de los tratamientos, y se determinó la diferencia significativa en cada combinación.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Caracterización de la biomasa

A partir de la metodología antes mencionada se determinó el contenido de humedad, cenizas, celulosa, hemicelulosa y lignina; obteniéndose los siguientes resultados.

Tabla 3.1 Resultados del porcentaje de humedad

	Réplica		
	1	2	3
Peso crisol + muestra húmeda	35.9151	31.7865	33.4882
Peso crisol + muestra seca	35.8012	31.6734	33.3741
Masa inicial	1.0199	1.0202	1.0202
Humedad	11.17%	11.09%	11.18%

De forma general se prefiere que la biomasa no tenga un alto porcentaje de humedad, ya que esto inhibe mayormente el crecimiento de los hongos. (Torres M. , 2019) Los valores de la Tabla 3.1 se determinaron mediante el cálculo de *humedad en base seca*, obteniendo una humedad promedio del 11.15%, que se encuentra en el rango de 6.4 - 14.1% dado por (Campos, Nieto, & Dave, 2018) y además se asemeja al valor de 10.50% obtenido por (Chun, Husseinsyah, & Ming, 2016).

Una de las razones por las que existen variaciones en los valores se debe a las condiciones y metodología utilizadas en el procedimiento, cambiando generalmente la temperatura y tiempo de secado. Por ejemplo, se puede trabajar a 60°C por 48 horas, (Sánchez Y. , 2018) a 80°C por 5 horas, (Carrillo & Jonathan, 2015) o a 105°C por 3 horas como es en nuestro caso. Finalmente, el porcentaje de humedad representa el contenido de agua por cada kilogramo de materia seca, y este también difiere del grado de maduración de la planta o del tipo de cacao, ya que, por lo general, cuando se trata de un *cacao maduro* los porcentajes de

humedad aumentan, (Torres M. , 2019, pág. 76) y así mismo difiere, si se trata del tipo de Cacao Fino de Aroma (CFA) comparado con el cacao de variedad CCN-51.

Tabla 3.2 Resultados del contenido de cenizas

	Réplica		
	1	2	3
Peso del crisol	34.9040	31.7749	32.4874
Muestra	1.0130	1.0021	1.0192
Peso crisol + muestra	35.9170	32.7770	33.5066
Peso crisol + muestra calcinada	35.0162	31.8792	32.596
% Cenizas	11.08%	10.41%	10.66%

Para el análisis del contenido de cenizas de la Tabla 3.2 se obtuvo un valor promedio de 10.72%, el cual representa la cantidad de materia sólida que no se combustionó a altas temperaturas por cada kilogramo de biomasa. (Carrillo & Jonathan, 2015) Este valor está dentro del rango de 5.8 - 13% dado por (Campos, Nieto, & Dave, 2018), y comparado con otros tipos como cáscara de Cacao Fino de Aroma (8.33%), cascarilla de Cacao Fino de Aroma (9.00%) y cascarilla de la variedad CCN-51 (8.73%) (Jessica, 2018) aumenta su valor levemente.

Por otro lado, las cenizas también brindan información sobre los diferentes minerales presentes en la biomasa; en la que, para las cenizas volátiles de la lignina, que es un componente de la cáscara de cacao, se han podido encontrar algunos minerales en diferentes proporciones tales como: 3.2% SiO₂, 0.06% Cl, 0.3% SO₃, 0.3% Al₂O₃, 0.3% Fe₂O₃, 1.1% P₂O₅, 44.8% CaO, 5.6% MgO y 3.3% (Na,K)₂O. (Centro de Estudios y Experimentación de Obras Públicas (CEDEX), 2014)

Tabla 3.3 Resultados del contenido de holocelulosa

	Réplica		
	1	2	3
Muestra inicial (g)	6.0018	6.0118	6.0201
Muestra final (g)	1.9192	1.9101	1.9150
% Holocelulosa	31.98%	31.77%	31.81%

Tabla 3.4 Resultados del contenido de celulosa

	Réplica		
	1	2	3
Muestra inicial (g)	2.0059	2.0092	2.0050
Muestra final (g)	0.5365	0.5302	0.5169
% Celulosa	26.75%	26.39%	25.78%

Tabla 3.5 Resultados del contenido de hemicelulosa

	Réplica		
	1	2	3
%Holocelulosa	31.98%	31.77%	31.81%
%Celulosa	26.75%	25.78%	26.39%
% Hemicelulosa	5.23%	5.99%	5.42%

Tabla 3.6 Resultados del contenido de lignina

	Réplica		
	1	2	3
Muestra inicial (g)	1.0189	1.0245	1.0211
Muestra final (g)	0.2881	0.2853	0.2995
% Holocelulosa	28.28%	27.85%	29.33%

A continuación, también se determinó el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina según las Tablas 3.4, 3.5 y 3.6, aquí se obtuvo valores promedios del 26.3%, 5.55% y 28.49% respectivamente, los que a su vez tiene una gran similitud comparado a los valores teóricos de referencia de (Chun, Husseinsyah, & Ming, 2016) que son 26.38%, 8.72% y 24.24%.

Los resultados indican que existe un ligero aumento en el contenido de lignina comparado al de celulosa, habiendo mayores limitaciones en el pretratamiento para disociar la matriz celulosa-lignina, ya que presenta una mayor dificultad en la disminución de la cristalinidad de la celulosa, y como consecuencia hace que también se disminuya la porosidad. Esto a su vez desencadena en una disminución de la conversión de polisacáridos a azúcares monoméricos en la etapa de fermentación, y, por ende, un menor volumen de bioetanol obtenido al finalizar el proceso. (Arellano, 2015, pág. 21)

Cabe destacar que estos tres últimos parámetros son los que mayor importancia tienen en el presente proyecto, ya que lo ideal sería tener una biomasa con mayor contenido de celulosa y menor porcentaje de hemicelulosa y lignina. (Loayza, 2020) En este proyecto también se determinó un porcentaje de hemicelulosa menor al teórico esperado, y se lo calculó a partir del contenido de holocelulosa de la Tabla 3.3.

Consecuentemente, hay que tomar en consideración que estas variaciones en los valores se dan por diversas razones, tales como la variedad del tipo de cacao, el tiempo de cosecha y clima presente, procedimiento o método de análisis empleado, entre otros. (Loayza, 2020)

Tabla 3.7 Resultados finales de la caracterización de la cáscara de cacao CCN-51

	Media	Desviación estándar	Coefficiente de variación
% Humedad	11.15%	0.05	0.45%
% Cenizas	10.71%	0.34	3.17%
%Celulosa	26.31%	0.49	1.86%
%Hemicelulosa	5.55%	0.40	7.21%
%Lignina	28.48%	0.76	2.67%

Por último, la Tabla 3.7 nos indica los resultados finales del proceso de caracterización, con sus respectivos valores de desviación estándar y coeficiente de variación de cada parámetro. Para el contenido de humedad (%) se determinó un valor de 11.15 ± 0.05 en la que se analizan las tres réplicas realizadas; para este caso dos valores cayeron en ese rango (el 66.67% de la población), por lo que se cumple el teorema de Chebyshev que dice que “aproximadamente el 68% de los valores de la población, cae dentro de + 1 desviación estándar a partir de la media”. (Gutierrez, 2015, pág. 6)

Del mismo modo, para el contenido de cenizas se tiene un valor de 10.71 ± 0.34 ; en el que analizando las tres réplicas se pudo determinar que dos valores caen en ese rango, por lo que también se cumple con el teorema de Chebyshev. A continuación, analizando las medias de celulosa, hemicelulosa y lignina que fueron 26.31 ± 0.49 , 5.55 ± 0.40 y 28.48 ± 0.76 respectivamente; también se pudo concluir que dos de cada tres muestras de la población están dentro de los rangos respectivos, por lo que se puede inferir que no existe gran desviación entre los datos obtenidos.

Sin embargo, el coeficiente de variación es el que nos indica con mayor precisión la variabilidad relativa de estos valores, por lo que observando los datos se determinó que la desviación estándar es del 0.45% al 7.21% de la media; además se sabe que la hemicelulosa y ceniza tienen más variación en relación con su media (7.21% y 3.17% respectivamente), comparado con la humedad o celulosa que tienen valores relativamente bajos (0.45% y 1.86% respectivamente).

3.2 Análisis estadístico

3.2.1 Prueba de Normalidad

Para el análisis estadístico primero se verificó si nuestro modelo de experimento es una distribución normal, y para esto aplicó el estadístico de Anderson Darling.

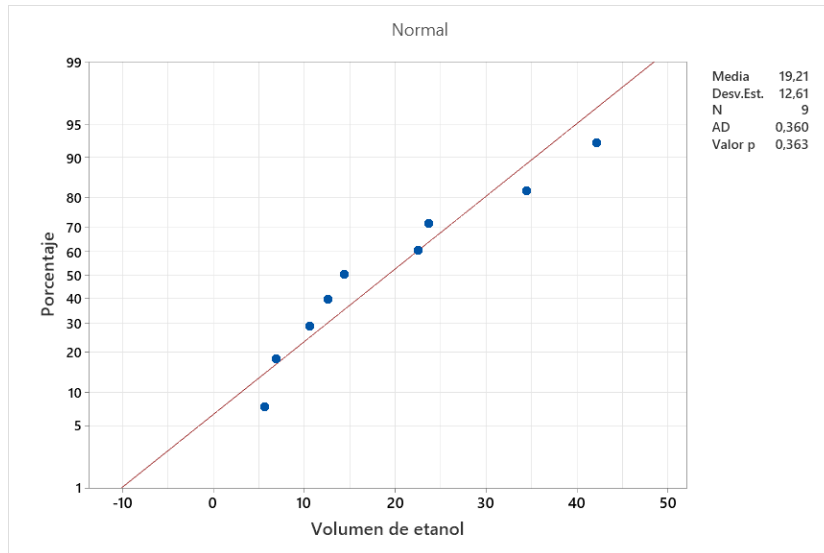


Figura 3.1 Prueba de Anderson Darling

En la figura 3.1 se observa que la mayoría de los puntos graficados están cerca de la recta de tendencia, y además el parámetro $p = 0.36$ es mayor al valor de significancia ($p > 0.05$); por lo que se puede garantizar que los datos obtenidos siguen una distribución normal.

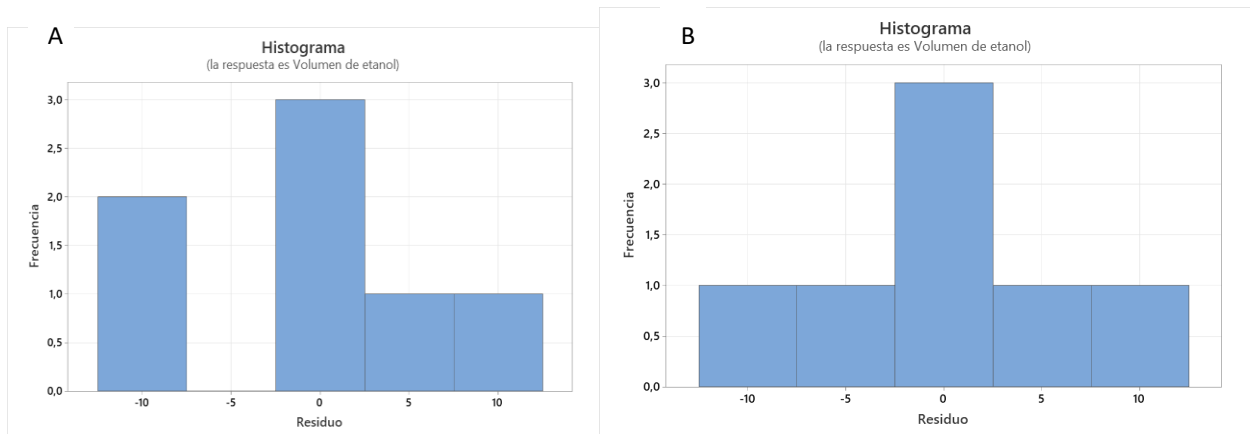


Figura 3.2 Histogramas de residuos A) Histograma resultante del análisis total de datos obtenidos en la experimentación B) Histograma resultante sin datos aberrantes.

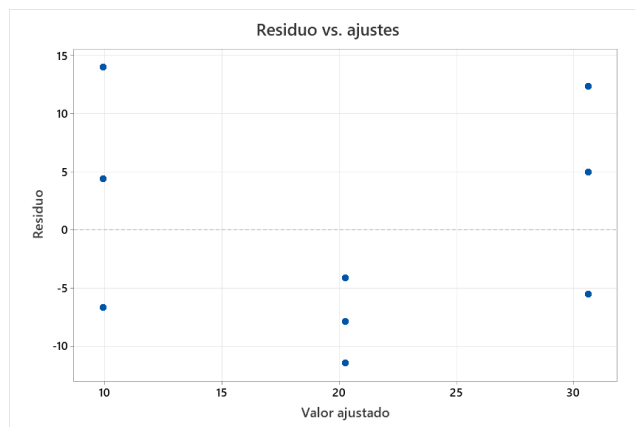


Figura 3.3 Residuos vs. Ajustes

En el histograma de residuos de la gráfica 3.2 A se puede observar la presencia de barras no continuas, que evidencian datos aberrantes en el conjunto de datos analizados. Por otro lado, en la figura 3.3 se puede visualizar que los puntos están ubicados de manera aleatoria, donde también se identifica un punto influyente que se encuentra cerca del eje 0 y alejado de los demás datos.

Cinco puntos en total están cerca de dicho eje, mientras que los otros cuatro están más alejados, por lo que se los identifican como *datos aberrantes*.

De los nueve datos se procedió a descartar solo dos puntos atípicos que están más alejados del “eje y”, y como resultado se obtuvo un nuevo gráfico de histograma de residuos (figura 3.2 B.), que tiene una campana más pronunciada y muestra una distribución normal. Sin embargo, debido a que los resultados son más robustos al tener veinte o más datos de análisis, se prefirió incluir los nueve puntos sin importar que contengan valores atípicos, ya que esto aumenta la confiabilidad del sistema.

Para evaluar la normalidad de la distribución también fue necesario realizar la figura 3.4 de los residuos, donde se observa que los puntos resultantes no presentan ninguna tendencia, con lo cual se puede

determinar que cada nivel es independiente uno del otro. Al cumplirse estos requisitos se logró aseverar que los datos analizados pertenecen a una distribución normal.



Figura 3.4 Residuos vs orden

3.2.2 Análisis de tabla ANOVA para cada tratamiento

Tabla 3.8 Hipótesis propuestas para el tratamiento

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales	$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$
Hipótesis alterna	Todas las medias no son iguales	$H_1 = \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$	

Tabla 3.9 Información del factor

	Niveles	Valores
Factor	3	Concentración 1; Concentración 2; Concentración 3

Tabla 3.10 Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	0.09264	0.046319	8.04	0.020
Error	6	0.03457	0.005762		
Total	8	0.12721			

Como se está trabajando con una distribución normal, se procedió a realizar una tabla ANOVA de un solo factor, compuesta por tres niveles que son las diferentes concentraciones del hongo *Trichoderma ghanense* en el proceso de hidrólisis; los datos de los resultados obtenidos para cada nivel fueron ingresados en el programa Minitab 20 y se partió de la premisa de que todas las medias son iguales (H_0) como lo muestra la tabla 3.8.

En la tabla ANOVA resultante (ver tabla 3.10) el parámetro p es igual a 0.020, valor que es menor al nivel de significancia ($p < 0.05$); por lo que se rechaza la hipótesis nula y se procede a aceptar la hipótesis alterna.

Esta hipótesis alterna establece que por lo menos una de las medias es diferente, o, en otras palabras, por lo menos uno de los tratamientos permite una mayor obtención de etanol.

Tabla 3.11 Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias.

Factor	N	Media	Agrupación	
C ₁	3	33.46	A	
C ₂	3	13.56		B
C ₃	3	10.62		B

Tabla 3.12 Pruebas individuales de Fisher

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
C ₂ - C ₁	-20.70	6.69	(-37.06; -4.33)	-3.09	0.021
C ₃ - C ₁	-22.09	6.69	(-38.46; -5.72)	-3.30	0.016
C ₃ - C ₂	-1.39	6.69	(-17.76; 14.97)	-0.21	0.842

Nivel de confianza simultánea = 89.08%

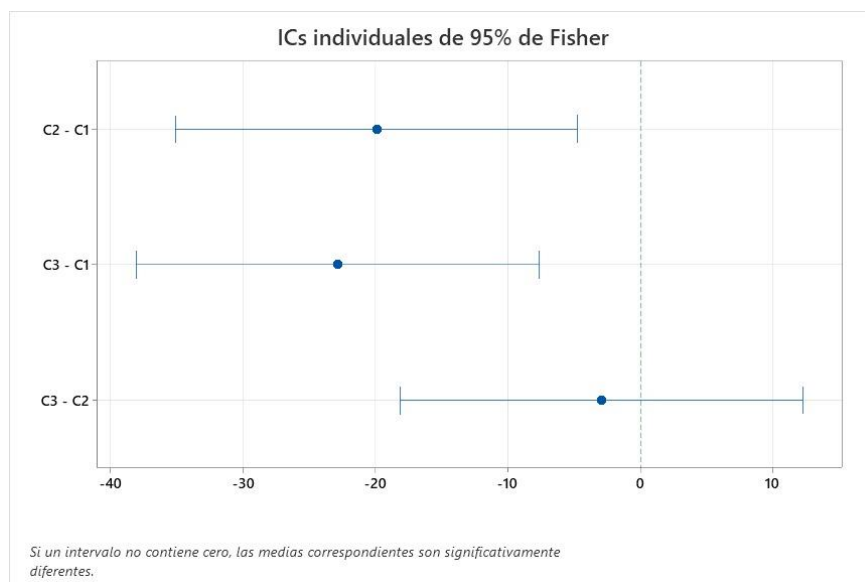


Figura 3.5 Prueba individual de Fisher para cada combinación de niveles

La tabla 13.11 separa los factores en dos grupos, donde la concentración 1 es designada como grupo A y la concentración 2 y 3 como grupo B; estos dos últimos factores muestran que la diferencia de medias no es tan significativa, comparado con la concentración 1 que pertenece al grupo A.

Por simple inspección se podría determinar que la concentración 1 es mayor, ya que tiene un valor medio más alto. Sin embargo, aunque la prueba Fisher evalúa cada nivel del factor con un 95% de confianza, el nivel de confianza simultánea es del 89.08%.

Así mismo, según la tabla 3.12 el valor de p para el tratamiento de concentración 2-3 es de 0.84, el mismo que es mayor al nivel de significancia ($p > 0.05$), lo cual indica que no es un modelo relevante comparado a los demás estudiados.

Tabla 3.13 Agrupación de información utilizando el método de Tukey

Concentración	N	Media	Agrupación	
1	3	33.46	A	
2	3	13.56		B
3	3	10.62		B

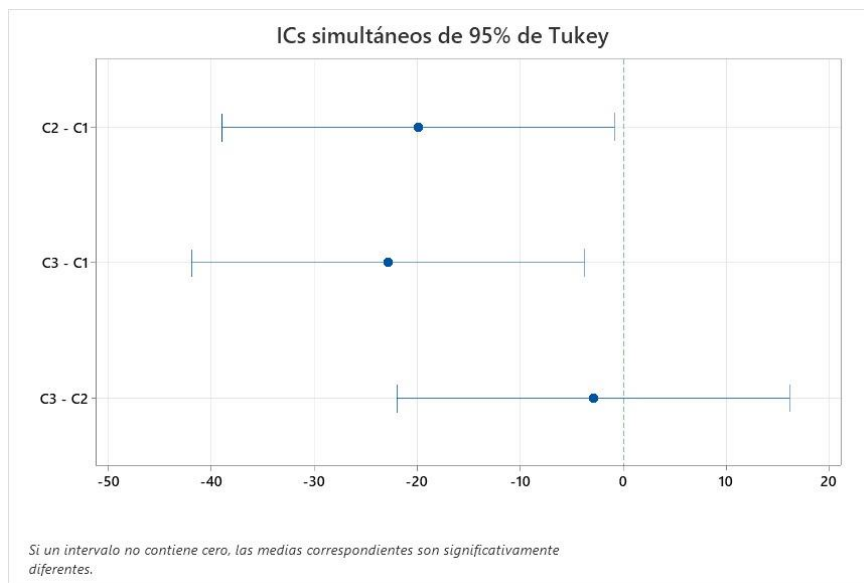


Figura 3.6 Prueba Tukey de combinación de niveles a un 95% de confianza

En la prueba Tukey se obtuvieron los resultados de la tabla 3.13, donde se muestran dos grupos diferentes A y B; la concentración 1 se encuentra en el grupo A, mientras que en el grupo B están las concentraciones 2 y 3. Observando las medias del grupo B no existen diferencias significativas, mientras que si se compara tratamientos con la concentración 1-2 o concentración 1-3, sí se puede notar una diferencia importante, esto también se logra corroborar en la figura 3.6 donde los intervalos de las combinaciones no contienen al punto cero.

De esta forma, la tabla 3.13 nos permite identificar a la concentración 1 como el valor más significativo, ya que su media es mayor y corresponde a 33.46% v/v.

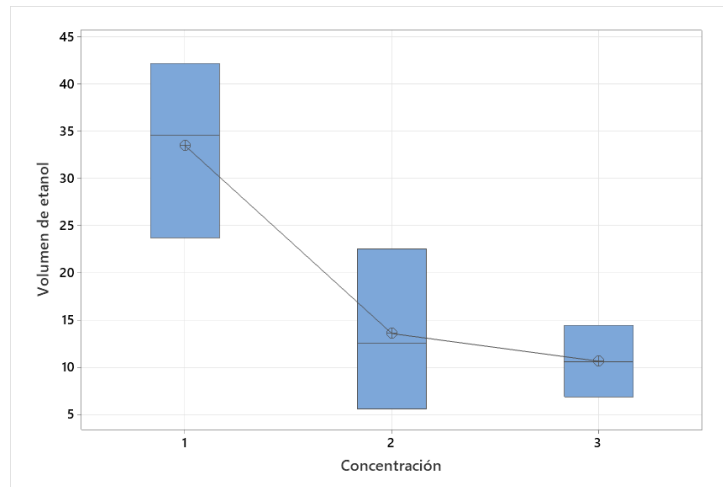


Figura 3.7 Diagrama de cajas de Volumen de etanol vs los tres niveles de concentración

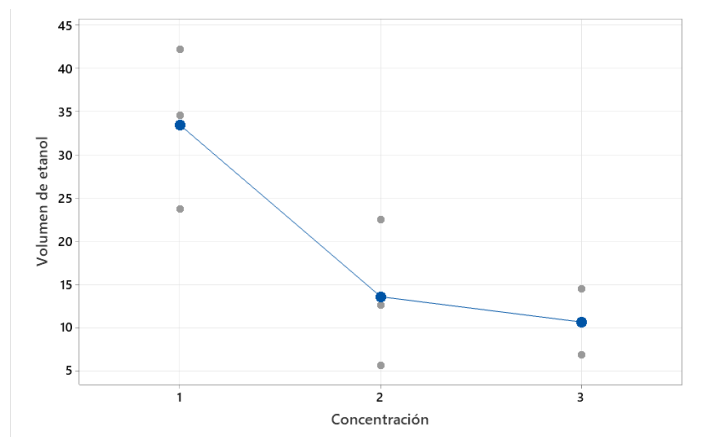


Figura 3.8 Gráfica de valores individuales de Volumen de etanol vs Concentración

A continuación, según la figura 3.7 se muestran los tres niveles ubicados en diagramas de caja diferentes, donde se puede identificar que el nivel 1 o concentración 1 tiene un mayor rendimiento del volumen de etanol comparado con los niveles 2 y 3 (concentraciones 2 y 3). Así mismo, esto se puede corroborar en la figura 3.8, la cual muestra todos los datos graficados (puntos plomos), y los puntos azules representan el valor medio para cada tratamiento.

Finalmente se puede aseverar que el gráfico tiene la misma tendencia con respecto a los análisis previos, en la que se coloca a la concentración 1, como el mayor valor de las medias correspondiente a 35 mL de etanol/L.

3.3 Cromatografía de gases (etanol)

Tabla 3.14 Puntos de la curva de calibración

Porcentaje	Área
0	3930409
0.1	34643911
0.3	48083991
0.5	55200005
0.7	73549822
0.9	85078743

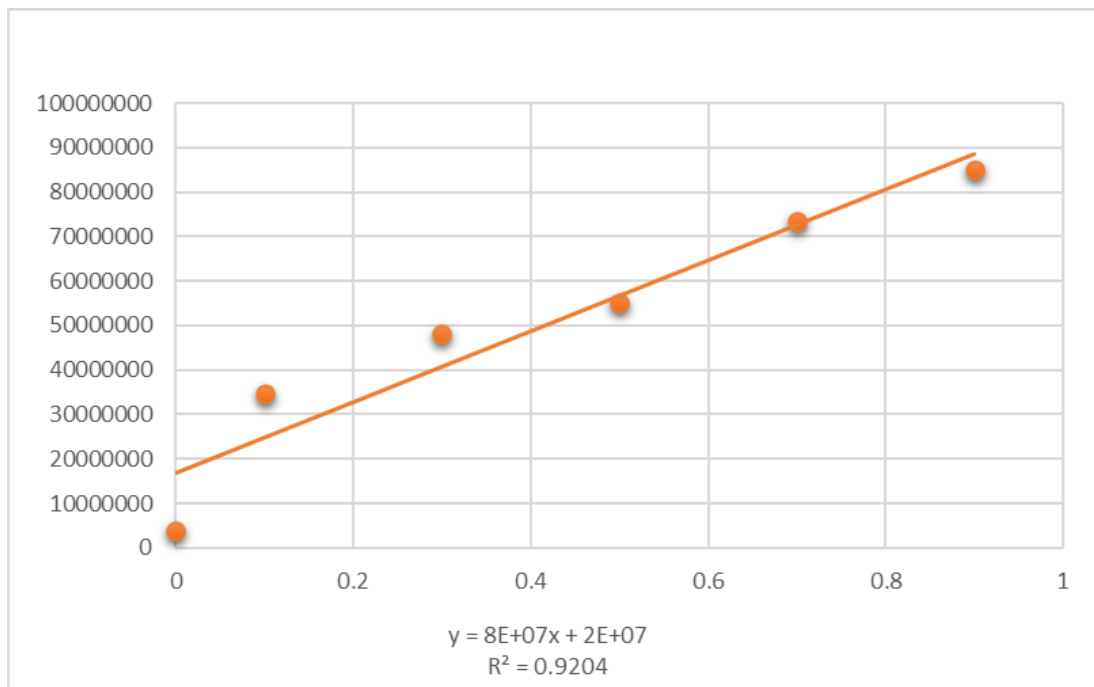


Figura 3.9 Curva de calibrado

Tabla 3.15 Porcentaje volumen a volumen de las muestras

Muestras	Área	Concentración Calculada	% v/v	Desviación estándar
C ₁₁	44404183	0.3452	34.52%	0.09
C ₁₂	35796731	0.2369	23.69%	
C ₁₃	50476540	0.4216	42.16%	
C ₂₁	26952665	0.1256	12.56%	0.08
C ₂₂	34859759	0.2251	22.51%	
C ₂₃	12527054	0.0559	5.59%	
C ₃₁	28444080	0.1444	14.44%	0.04
C ₃₂	25367161	0.1057	10.57%	
C ₃₃	22419508	0.0686	6.86%	

Para determinar las concentraciones de bioetanol se realizó un análisis cuantitativo mediante una curva de calibración (figura 3.9), donde la variable independiente 'x' fue la concentración del analito de interés y la variable dependiente 'y' corresponde a las áreas emitidas por el cromatógrafo de gases. Con respecto a la linealidad del sistema de medición se pudo observar que el coeficiente de determinación $r^2= 0.92$ no es un valor lo suficientemente alto, por lo que según (García A. , 2019, pág. 3) no es un criterio con el que se pueda aceptar la linealidad, ya que esta se considera cuando r^2 es mayor a 0.98. Esto puede deberse a que existen interferencias procedentes del equipo, y errores volumétricos al momento de preparar las concentraciones de las soluciones patrón.

Analizando los porcentajes calculados volumen a volumen de la tabla 3.15, se pudo determinar que a 0 esporas/mL (C₁₁, C₁₂ y C₁₃) el promedio de bioetanol obtenido fue de 33.46%, el mismo que difiere cuando la concentración de esporas es de 1×10^7 esporas/mL (C₂₁, C₂₂ y C₂₃), ya que en este caso se obtuvo un volumen promedio de bioetanol de 13.56%. Así mismo, con 1×10^9 esporas/mL se obtiene una cantidad promedio de bioetanol de 10.62%, determinando así que a menor concentración de esporas de *Trichoderma*, aumenta el rendimiento de bioetanol en el proceso de fermentación.

Una posible explicación de que no se haya alcanzado un mayor rendimiento de bioetanol al utilizar el hongo *Trichoderma ghanense*, es que probablemente durante los 4 días de fermentación ocurrió un agotamiento o estrés de la glucosa que hizo que las levaduras tomen otras fuentes de carbono incluido compuestos no fermentables como el etanol, por lo que disminuyó el rendimiento final. (García A. , 2019)

Así mismo, en la hidrólisis enzimática no se encontraron muchas investigaciones que determinen un rango de temperatura óptimo en la etapa de inoculación del hongo *Trichoderma ghanense*, por lo que se llevó a cabo a una temperatura ambiente. Sin embargo, según (Martínez, Infante, & Reyes, 2013) existe una estrecha relación entre la temperatura y el desarrollo del hongo, que depende en gran parte de la especie estudiada; por ejemplo, *T. viride* y *T. polysporum* toleran una temperatura de 31°C, mientras que *T. pseudokoningii* y *T. saturnisporum* trabajan a una temperatura de 40 - 41°C.

Otro de los parámetros importantes es la presencia o ausencia de luz en el desarrollo de las esporas, ya que según su naturaleza el hongo *Trichoderma spp.* es fotosensible, por lo que se prefirió dejarlo en un período alterno de luz/oscuridad.

A pesar de que, también hay estudios en donde se ha evaluado la producción enzimática del hongo a una exposición permanente de luz con una temperatura de 25°C, y se han encontrado resultados positivos. (Chávez, Montaña, & Martínez, 2009) Por lo que, según (Martínez, Infante, & Reyes, 2013) se puede trabajar en condiciones de luz alterna, donde se combina la luz blanca al inicio, para después dejarlo con zonadas concéntricas de color verde oscuro.

A partir de los cromatogramas se puede verificar la presencia de bioetanol mediante la formación de unos picos, en un tiempo de retención promedio de 4.186 min y en un tiempo de análisis total de 14 min. Adicional, estas gráficas muestran la relación de absorbancia con respecto a dicho tiempo de retención. (Salazar & Villamizar, 2019)

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Mediante la caracterización se determinó que, aunque la cáscara de cacao contenía un importante porcentaje de celulosa (26.31%) y hemicelulosa (5.5%), el contenido de lignina (28.48%) era ligeramente mayor, lo que representa una limitación al momento de realizar la conversión de los azúcares fermentables. A pesar de ello, es un valor que puede disminuir al realizarse un pretratamiento alcalino, por lo que se concluye que la cáscara de cacao es una biomasa lignocelulósica viable, siempre y cuando se lleve a cabo una metodología adecuada.
- El proceso de hidrólisis enzimática se llevó a cabo bajo tres escenarios o tres variaciones de la concentración del hongo *Trichoderma ghanense* (C₁, C₂, C₃); y se obtuvo un porcentaje promedio de *volumen etanol en volumen de solución* de 33.46%, 13.56%, y 10.62% respectivamente. Mediante un análisis estadístico del diseño de experimentos se procedió a rechazar la hipótesis nula, concluyendo que por lo menos una de las medias del tratamiento es diferente. Así pues, se designó a la concentración (C₁) de 0 esporas/mL como el tratamiento más significativo, al obtener un valor promedio mayor.
- Debido a la falta de información del hongo *T. ghanense* respecto a las condiciones elegidas de temperatura, exposición de luz, entre otras; no se obtuvo el rendimiento esperado al aumentar la concentración del hongo, de hecho, ocurrió un efecto contrario, por lo que se concluye que, a menor concentración, el porcentaje de bioetanol aumentará.
- A partir del análisis cromatográfico se logró obtener las áreas de los picos que indican la presencia de etanol, y con ello se obtuvo el mayor porcentaje *volumen a volumen* igual a 33.46% ±0.09; concluyendo que el primer tratamiento es el más óptimo.

4.2 Recomendaciones

- En los procesos de hidrólisis enzimática y fermentación la biomasa tiende a expandirse, por lo que se recomienda utilizar recipientes cerrados con un volumen 10 veces mayor al que ocupa la biomasa inicialmente.
- Se recomienda realizar un tiempo de autoclavado de 15 a 20 minutos, para evitar que el hongo *Trichoderma* permanezca activo y se produzca reacciones de competencia con la *Saccharomyces cerevisiae*.
- Debido a que en la mayor parte del proceso se emplean hongos, es importante esterilizar el agua antes de usarla, al igual que los materiales de laboratorio; con esto se evita la contaminación por la presencia de microorganismos externos, que pueden producir errores en los valores de respuesta.
- Se recomienda emplear diferentes especies del hongo *Trichoderma*, que tengan la capacidad de producir más enzimas hidrolíticas, para desdoblar mayor cantidad de biomasa en azúcares simples.
- Medir los grados Brix de las muestras después de la hidrólisis química, hidrólisis enzimática y al finalizar la fermentación, para controlar la cantidad de glucosa obtenida durante cada proceso.

BIBLIOGRAFÍA

- Abril, A. J., & Navarro, E. A. (Octubre de 2012). ResearchGate. Obtenido de Etanol a partir de biomasa lignocelulósica:
https://www.researchgate.net/publication/241216642_Etanol_a_partir_de_biomasa_lignocelulosica
- Angulo, G. (2017). Evaluación del proceso fermentativo del mucílago del cacao aplicando *saccharomyces cerevisiae* para la producción de bioetanol. Quevedo, Los Ríos, Ecuador.
- Anónimo. (Septiembre de 2019). *Cacao Híbrido CCN-51 cuenta con certificación de calidad*. Obtenido de Ministerio de Agricultura y ganadería del Ecuador:
<https://www.agricultura.gob.ec/cacao-hibrido-ccn-51-cuenta-con-certificacion-de-calidad/>
- Arellano, C. (Marzo de 2015). Obtención de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos sometidos a hidrólisis enzimática. Orizaba, Veracruz.
- Astudillo, G., & Pacheco, M. (2017). *El Comercio*. Obtenido de La Ecopaís está disponible en el 40% de las estaciones: <https://www.elcomercio.com/actualidad/gasolina-ecopais-disponible-estaciones-ecuador.html#:~:text=La%20Ecopa%C3%ADs%20est%C3%A1%20compuesta%20en%20un%205%25%20por,entre%2085%20y%2087%2C%20igual%20que%20la%20extra>
- Barazarte, H., Sangronis, E., & Unai, E. (2008). La cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.): una posible fuente comercial de pectinas. Caracas, Venezuela.
- Barquero, M. (2006). Principio y Aplicaciones de la Cromatografía de Gases. Costa Rica.
- Cajal, A. (10 de Enero de 2020). *lifeder*. Obtenido de Prueba de Tukey, en qué consiste, caso de ejemplo, ejercicio resuelto: <https://www.lifeder.com/prueba-de-tukey/>
- Campos, R., Nieto, K., & Dave, B. (2018). Cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husk: renewable source of bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 49.
- Carrillo, V., & Jonathan, V. (2015). Estudios de las posibilidades de Peletización de la cáscara de cacao y su utilización como combustible. Guayaquil, Ecuador.

- Centro de Estudios y Experimentación de Obras Públicas (CEDEX). (Diciembre de 2014). *Cenizas Procedentes de la Biomasa*. España.
- Chávez, M., Montaña, J., & Martínez, M. (2009). Efecto del sustrato y la exposición a la luz en la producción de una cepa de *Trichoderma* sp. Bogotá, Colombia.
- Chun, K., Husseinsyah, S., & Ming, C. (2016). Effect of green coupling agent from waste oil fatty acid on the properties of polypropylene/cocoa pod husk composites. *Springer*, 3.
- Coba, G. (Enero de 2021). *Primicias*. Obtenido de El confinamiento aumentó el consumo de cacao en el mundo: <https://www.primicias.ec/noticias/economia/confinamiento-mercados-internacionales-consumo-cacao/>
- Consortium, U. (Abril de 2018). Obtenido de UniProtKB - Q66PN1 (Q66PN1_9HYPO): <https://www.uniprot.org/uniprot/Q66PN1>
- Cury R, K., Aguas M, Y., & Martinez M, A. (2017). Residuos agroindustriales su impacto, manejo y aprovechamiento. Córdoba, Colombia.
- El Blog de Minitab*. (18 de Abril de 2019). Obtenido de Comprensión del Análisis de Varianza (ANOVA) y la Prueba F: <https://blog.minitab.com/es/comprencion-del-analisis-de-varianza-anova-y-la-prueba-f>
- eluniverso.com. (Marzo de 2020). *El Universo*. Obtenido de Baja en 53% demanda de combustibles en Ecuador, dice Ministerio de Energía: <https://www.eluniverso.com/noticias/2020/03/19/nota/7788690/baja-53-demanda-combustibles-ecuador-dice-ministerio-energia/>
- Facultad Regional Mendoza UTN. (s.f.). *Tabla D.9: Valores críticos de la Distribución F (0.05)*. Obtenido de <http://www.mat.uda.cl/hsalinas/cursos/2008/probabilidad/TablaF05.pdf>
- FAO. (Julio de 2019). *Organización de las Naciones Unidas*. Obtenido de Noticias ONU: <https://news.un.org/es/story/2019/07/1459231>
- García, A. (Diciembre de 2019). Producción de Bioetanol a partir de residuos de mango (*Mangifera indica*). Colombia.
- García, C., Mamani, M., Chávez, G., & Álvarez, M. T. (Febrero de 2016). Evaluación de la actividad enzimática del *Trichoderma inhamatum* (BOL-12 QD) como posible biocontrolador. La Paz, Bolivia.

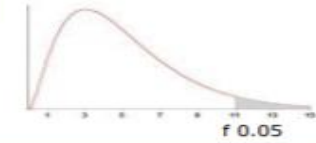
- Gutierrez, E. (2015). *Estadística descriptiva y probabilidad*. Obtenido de Repositorio Institucional de la Universidad Autónoma del Estado de México: <http://hdl.handle.net/20.500.11799/33964>
- Hernández, D., Ferrera, R., & Alarcón, A. (Mayo de 2019). Trichoderma: AGRICULTURAL AND BIOTECHNOLOGICAL IMPORTANCE, AND FERMENTATION SYSTEMS FOR PRODUCING BIOMASS AND ENZYMES OF INDUSTRIAL INTEREST. Estado de México, México.
- Hernández, J. S. (2019). Evaluación del uso de la cáscara de cacao como sustituto parcial de la matriz polimérica en la obtención de Espumas de Poliuretano. Bogotá D.C., Colombia.
- Hossain, M. F., Hasanuzzman, M., & Rahim, N. (s.f.). *IEEE Xplore*. Obtenido de Bio-ethanol as an alternative fuel from palm empty fruit bunches and environmental benefits: <https://ieeexplore.ieee.org/document/7151626>
- International, A. (1990). *AOAC: Official Methods of Analysis (Volume 1)*. Obtenido de <https://archive.org/details/gov.law.aoc.methods.1.1990/page/n69/mode/2up>
- Jessica, E. (27 de Julio de 2018). Determinación de parámetros cinéticos en la devolatilización de la biomasa residual de cacao ecuatoriano. Quito, Ecuador.
- Kubicek, C. P., & E, H. G. (2002). *Trichoderma & Gliocladium - Volume 1*. United States of America.
- Llerena, W. F., Guevara, M. D., & Mora, S. M. (2019). Exploración de la intención de consumo de la Cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L.) como infusión: caso Tungurahua-Ecuador*. Ambato, Ecuador.
- Loayza, K. (2020). Determinación de las condiciones óptimas de fermentación para la obtención de bioetanol a partir del hidrolizado ácido de la corteza del cacao (*Theobroma cacao*) proveniente de la industria cacaotera del Ecuador. Cuenca, Ecuador.
- Love Your Planet.* (s.f.). Obtenido de https://loveyourplanet.com/doc/trichoderma_ghanense
- Marco, F. (7 de Noviembre de 2018). *Economipedia*. Obtenido de Estadístico F: <https://economipedia.com/definiciones/estadistico-f.html>
- Martínez, B., Infante, D., & Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *SciELO*.

- Michel, A., Otero, M., & Marínez, R. (2008). Producción masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai en diferentes sustratos orgánicos. *Revista Chapingo. Serie Horticultura SciELO*, vol.14 no.2.
- Ozores, M. I. (s.f.). *Laboratorio de Técnicas Instrumentales UVA*. Obtenido de <https://laboratoriotecnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/cromatografa-de-gases>
- Perales, C. A. (Marzo de 2015). Obtención de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos sometidos a hidrólisis enzimática. Orizaba. Obtenido de <https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/46812/ArellanoPeralesCarla.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- Pinos, M. C. (5 de Diciembre de 2019). Efecto de diferentes tratamientos químicos sobre la producción de azúcares reductores y etanol en la fermentación alcohólica de la cáscara de la mazorca del cacao. Quito.
- Quintero, J., & Cardona, C. (Junio de 2009). *Avances Investigativos en la Producción de Biocombustibles*. Obtenido de Capítulo 9. Nuevas Tecnologías en la Producción de Bioetanol a partir de Biomasa Lignocelulósica: https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/9828/9789584452610_Parte6.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Ruiz, J. L. (Mayo de 2017). Evaluación de *Trichoderma Harzianum* para el control de *Moniliophthora roreri* en cacao El Tumbador, San Marcos. Coatepeque.
- Salazar, I., & Villamizar, J. (2019). Evaluación de la obtención de bioetanol partiendo de la fermentación de los azúcares concentrados en las bebidas gaseosas carbonatadas vencidas por medio de *Saccharomyces cerevisiae*. Bogotá, Colombia.
- Sánchez, J. (Octubre de 2013). Evaluación energética de cáscaras de cacao nacional y CCN-51. Cuenca, Ecuador.
- Sánchez, N. (2018). Obtención de Bioetanol de Segunda Generación (2G) a partir de cáscara de arroz. Una propuesta pro ambiental. Guayaquil, Ecuador.
- Sánchez, Y. (11 de Septiembre de 2018). Adsorción de Arsénico y Antimonio en soluciones acuosas mediante aplicación de biomasa lignocelulósica de cáscara de cacao. Machala, Ecuador.

- Sigüencia, J., Delgado, J., Fausto, P., & Johanna, S. (2020). Estimación del potencial de producción de bioetanol a partir de los residuos de la corteza del cacao en Ecuador. Ecuador.
- Soderberg, D. L. (s.f.). Meat and Meat Products. U.S.
- Soporte de Minitab ® 18. (2019). Obtenido de ¿Qué es ANOVA?: <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/anova/supporting-topics/basics/what-is-anova/>
- Sreepat, J., & Emma, M. (2013). Trichoderma Biology and Applications. United Kingdom: CAB International.
- Suryanarayana, V., & Yogendra, S. (August de 2017). Optimal control of dilute acid pretreatment and enzymatic hydrolysis for processing lignocellulosic feedstock.
- Torres, M. (2019). Obtención de celulosa a partir de la cáscara de cacao ecuatoriano (*Theobroma cacao* L.) mediante hidrólisis térmica para la elaboración de pulpa de papel. Quito, Ecuador.
- Torres, Y. (2016). Caracterización de biomasa lignocelulósica (*Theobroma Cacao* L) para su uso en la obtención de etanol por vía fermentativa. Bucaramanga.
- Valenzuela, M. L. (2012). Hidrólisis Enzimática del excedente orgánico del banano usando el Hongo *Trametes Versicolor* para la obtención de etanol. Quito, Ecuador.
- Vallejo, M. (2014). "Caracterización y clasificación de *Trichodermas* nativos aplicando diferentes medios de cultivo a nivel de laboratorio artesanal". Ambato, Ecuador.
- Wojtusik, M. W. (2019). Hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos. Madrid.

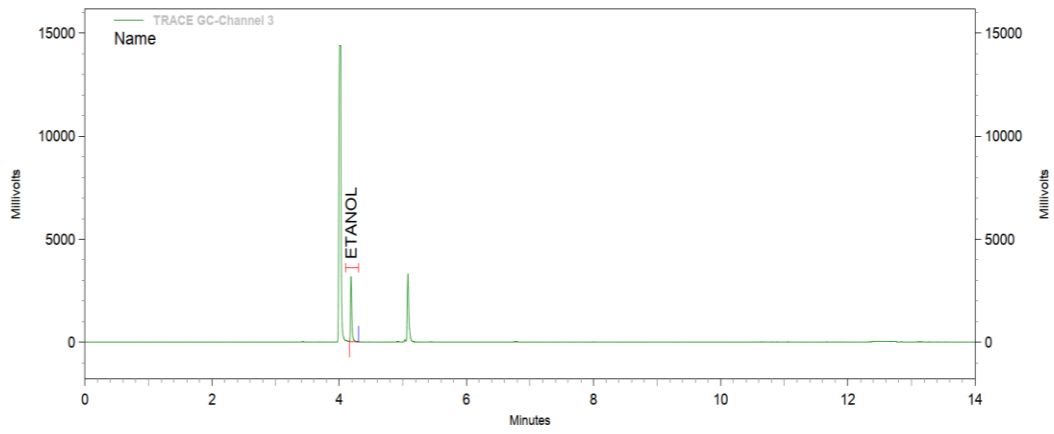
ANEXOS

Tabla D.9: VALORES CRÍTICOS DE LA DISTRIBUCIÓN F (0,05)

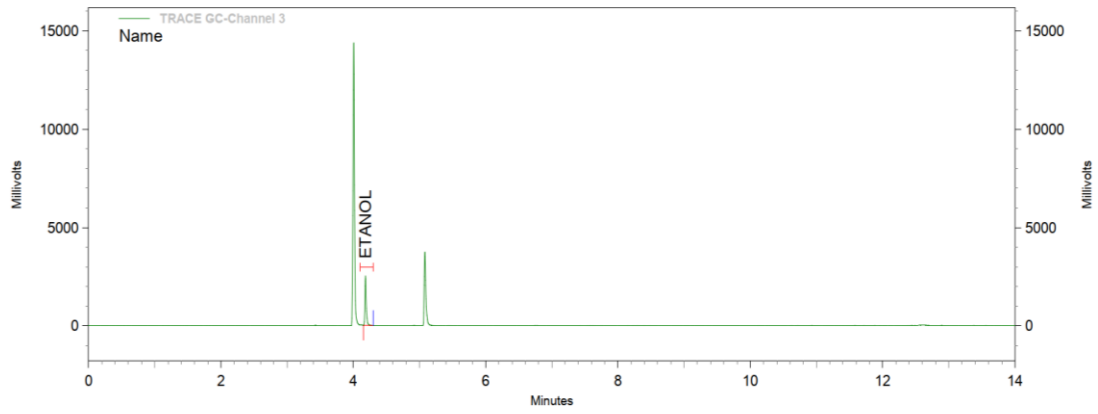


g.d.l	Grados de libertad del Numerador															g.d.l
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
1	161,4	199,5	215,7	224,6	230,2	234,0	236,8	238,9	240,5	241,9	243,0	243,9	244,7	245,4	245,9	1
2	18,513	19,000	19,164	19,247	19,296	19,330	19,353	19,371	19,385	19,396	19,405	19,413	19,419	19,424	19,429	2
3	10,128	9,552	9,277	9,117	9,013	8,941	8,887	8,845	8,812	8,786	8,763	8,745	8,729	8,715	8,703	3
4	7,709	6,944	6,591	6,388	6,256	6,163	6,094	6,041	5,999	5,964	5,936	5,912	5,891	5,873	5,858	4
5	6,608	5,786	5,409	5,192	5,050	4,950	4,876	4,818	4,772	4,735	4,704	4,678	4,655	4,636	4,619	5
6	5,987	5,143	4,757	4,534	4,387	4,284	4,207	4,147	4,099	4,060	4,027	4,000	3,976	3,956	3,938	6
7	5,591	4,737	4,347	4,120	3,972	3,866	3,787	3,726	3,677	3,637	3,603	3,575	3,550	3,529	3,511	7
8	5,318	4,459	4,066	3,838	3,687	3,581	3,500	3,438	3,388	3,347	3,313	3,284	3,259	3,237	3,218	8
9	5,117	4,256	3,863	3,633	3,482	3,374	3,293	3,230	3,179	3,137	3,102	3,073	3,048	3,025	3,006	9
10	4,965	4,103	3,708	3,478	3,326	3,217	3,135	3,072	3,020	2,978	2,943	2,913	2,887	2,865	2,845	10
11	4,844	3,982	3,587	3,357	3,204	3,095	3,012	2,948	2,896	2,854	2,818	2,788	2,761	2,739	2,719	11
12	4,747	3,885	3,490	3,259	3,106	2,996	2,913	2,849	2,796	2,753	2,717	2,687	2,660	2,637	2,617	12
13	4,667	3,806	3,411	3,179	3,025	2,915	2,832	2,767	2,714	2,671	2,635	2,604	2,577	2,554	2,533	13
14	4,600	3,739	3,344	3,112	2,958	2,848	2,764	2,699	2,646	2,602	2,565	2,534	2,507	2,484	2,463	14
15	4,543	3,682	3,287	3,056	2,901	2,790	2,707	2,641	2,588	2,544	2,507	2,475	2,448	2,424	2,403	15
16	4,494	3,634	3,239	3,007	2,852	2,741	2,657	2,591	2,538	2,494	2,456	2,425	2,397	2,373	2,352	16
17	4,451	3,592	3,197	2,965	2,810	2,699	2,614	2,548	2,494	2,450	2,413	2,381	2,353	2,329	2,308	17
18	4,414	3,555	3,160	2,928	2,773	2,661	2,577	2,510	2,456	2,412	2,374	2,342	2,314	2,290	2,269	18
19	4,381	3,522	3,127	2,895	2,740	2,628	2,544	2,477	2,423	2,378	2,340	2,308	2,280	2,256	2,234	19
20	4,351	3,493	3,098	2,866	2,711	2,599	2,514	2,447	2,393	2,348	2,310	2,278	2,250	2,225	2,203	20
21	4,325	3,467	3,072	2,840	2,685	2,573	2,488	2,420	2,366	2,321	2,283	2,250	2,222	2,197	2,176	21
22	4,301	3,443	3,049	2,817	2,661	2,549	2,464	2,397	2,342	2,297	2,259	2,226	2,198	2,173	2,151	22
23	4,279	3,422	3,028	2,796	2,640	2,528	2,442	2,375	2,320	2,275	2,236	2,203	2,175	2,150	2,128	23
24	4,260	3,403	3,009	2,776	2,621	2,508	2,423	2,355	2,300	2,255	2,216	2,183	2,155	2,130	2,108	24
25	4,242	3,385	2,991	2,759	2,603	2,490	2,405	2,337	2,282	2,236	2,198	2,165	2,136	2,111	2,089	25
26	4,225	3,369	2,975	2,743	2,587	2,474	2,388	2,321	2,265	2,220	2,181	2,148	2,119	2,094	2,072	26
27	4,210	3,354	2,960	2,728	2,572	2,459	2,373	2,305	2,250	2,204	2,166	2,132	2,103	2,078	2,056	27
28	4,196	3,340	2,947	2,714	2,558	2,445	2,359	2,291	2,236	2,190	2,151	2,118	2,089	2,064	2,041	28
29	4,183	3,328	2,934	2,701	2,545	2,432	2,346	2,278	2,223	2,177	2,138	2,104	2,075	2,050	2,027	29
30	4,171	3,316	2,922	2,690	2,534	2,421	2,334	2,266	2,211	2,165	2,126	2,092	2,063	2,037	2,015	30
31	4,160	3,305	2,911	2,679	2,523	2,409	2,323	2,255	2,199	2,153	2,114	2,080	2,051	2,026	2,003	31
32	4,149	3,295	2,901	2,668	2,512	2,399	2,313	2,244	2,189	2,142	2,103	2,070	2,040	2,015	1,992	32
33	4,139	3,285	2,892	2,659	2,503	2,389	2,303	2,235	2,179	2,133	2,093	2,060	2,030	2,004	1,982	33
34	4,130	3,276	2,883	2,650	2,494	2,380	2,294	2,225	2,170	2,123	2,084	2,050	2,021	1,995	1,972	34
35	4,121	3,267	2,874	2,641	2,485	2,372	2,285	2,217	2,161	2,114	2,075	2,041	2,012	1,986	1,963	35
40	4,085	3,232	2,839	2,606	2,449	2,336	2,249	2,180	2,124	2,077	2,038	2,003	1,974	1,948	1,924	40
60	4,001	3,150	2,758	2,525	2,368	2,254	2,167	2,097	2,040	1,993	1,952	1,917	1,887	1,860	1,836	60
80	3,960	3,111	2,719	2,486	2,329	2,214	2,126	2,056	1,999	1,951	1,910	1,875	1,845	1,817	1,793	80
90	3,947	3,098	2,706	2,473	2,316	2,201	2,113	2,043	1,986	1,938	1,897	1,861	1,830	1,803	1,779	90
100	3,936	3,087	2,696	2,463	2,305	2,191	2,103	2,032	1,975	1,927	1,886	1,850	1,819	1,792	1,768	100
120	3,920	3,072	2,680	2,447	2,290	2,175	2,087	2,016	1,959	1,910	1,869	1,834	1,803	1,775	1,750	120
inf.	3,841	2,996	2,605	2,372	2,214	2,099	2,010	1,938	1,880	1,831	1,789	1,752	1,720	1,692	1,666	inf.

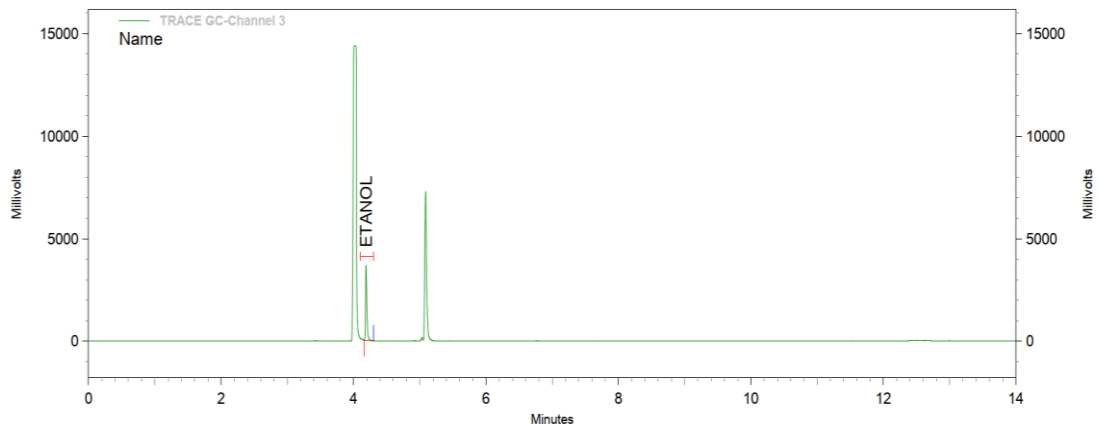
Anexo 1. Valores Críticos de la Distribución F (0.05) (Facultad Regional Mendoza UTN, s.f.)



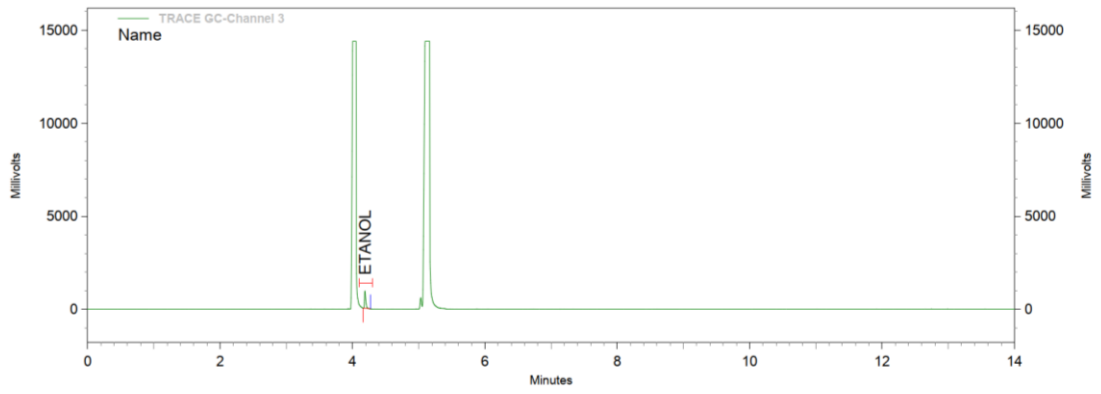
Anexo 2. Cromatograma de la C₁₁



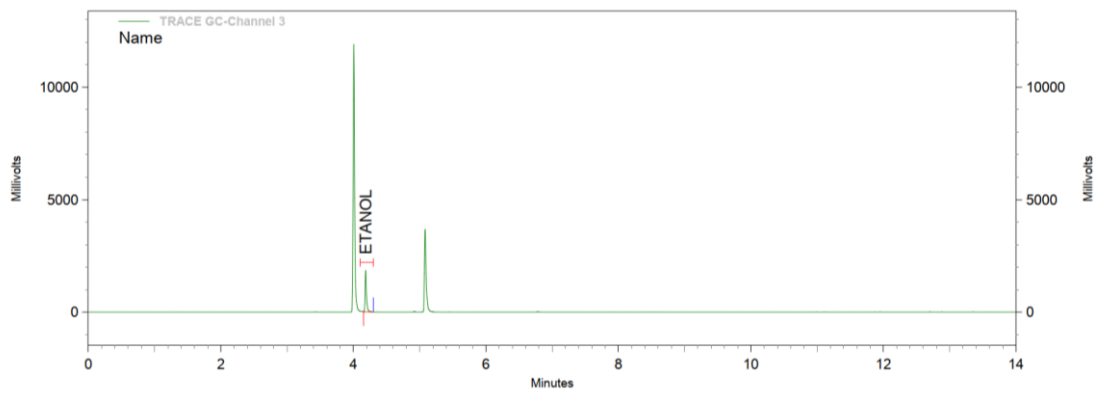
Anexo 3. Cromatograma de la C₁₂



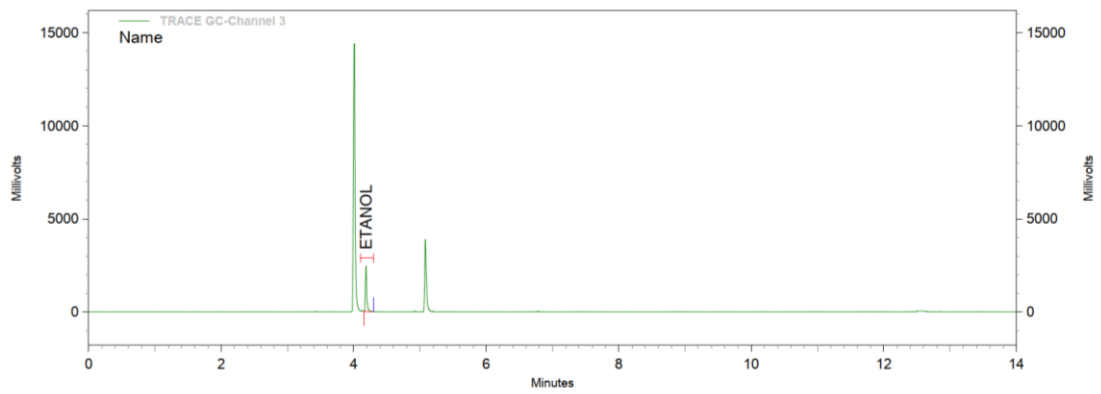
Anexo 4. Cromatograma de la C₁₃



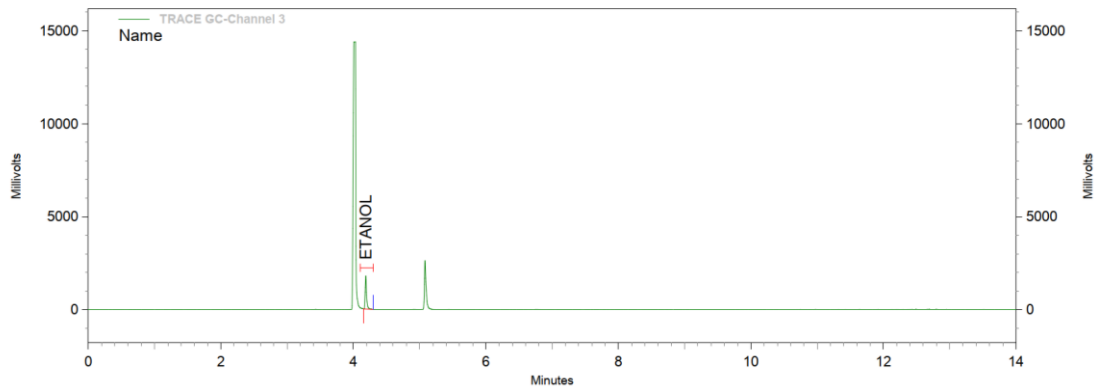
Anexo 5. Cromatograma de la C₂₁



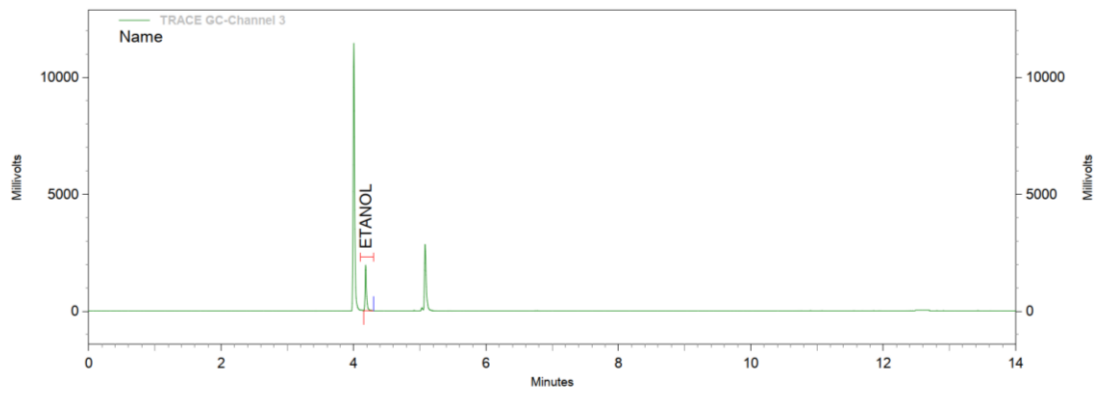
Anexo 6. Cromatograma de la C₂₂



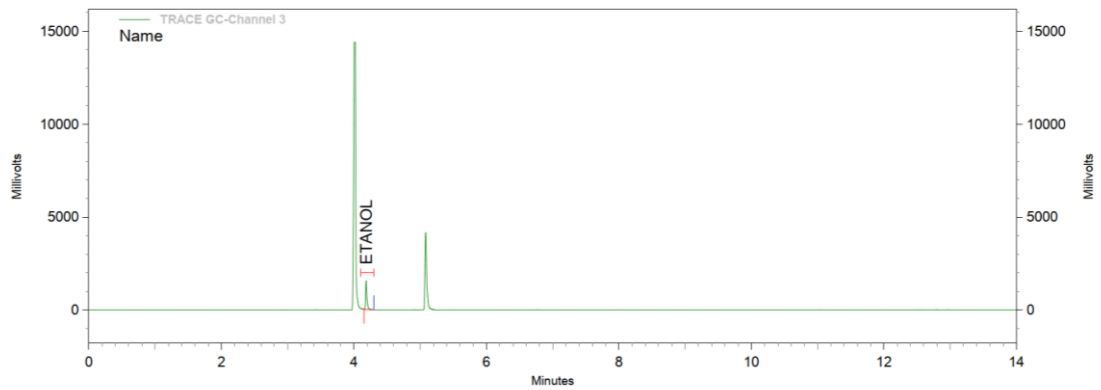
Anexo 7. Cromatograma de la C₂₃



Anexo 8. Cromatograma de la C₃₁



Anexo 9. Cromatograma de la C₃₂



Anexo 10. Cromatograma de la C₃₃