



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

**SEDE CUENCA**

**CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

COMPARACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA A PARTIR DE DOS ENZIMAS EN  
LA CÁSCARA DEL CACAO (*Theobroma cacao* L.) PARA LA OBTENCIÓN DE  
AZÚCARES REDUCTORES Y SU POSIBLE APLICACIÓN EN PROCESOS DE  
FERMENTACIÓN

Trabajo de titulación previo a la obtención del  
título de Ingeniera Biotecnóloga

AUTORAS: SHIRLEY NAYELLY CALLE CASTRO

DANIELA BELÉN TUFÍÑO BEJARANO

TUTORA: DRA. MYRIAM XIMENA MANCHENO CÁRDENAS, MGTR.

Cuenca - Ecuador

2024

## CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotras, Shirley Nayelly Calle Castro con documento de identificación N° 0302571146 y Daniela Belén Tufiño Bejarano con documento de identificación N° 0105513154; manifestamos que:

Somos las autoras y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Cuenca, 04 de marzo de 2024

Atentamente,



---

Shirley Nayelly Calle Castro  
0302571146



---

Daniela Belén Tufiño Bejarano  
0105513154

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE  
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotras, Shirley Nayelly Calle Castro con documento de identificación N° 0302571146 y Daniela Belén Tufiño Bejarano con documento de identificación N° 0105513154, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autoras del Trabajo experimental: “Comparación de la hidrólisis enzimática a partir de dos enzimas en la cáscara del cacao (*Theobroma cacao* L.) para la obtención de azúcares reductores y su posible aplicación en procesos de fermentación”, el cual se ha desarrollado para optar el título de: Ingeniera Biotecnóloga, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 04 de marzo de 2024

Atentamente,



---

Shirley Nayelly Calle Castro

0302571146



---

Daniela Belén Tufiño Bejarano

0105513154

## CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Myriam Ximena Mancheno Cárdenas con documento de identificación N° 0602018160, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: COMPARACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA A PARTIR DE DOS ENZIMAS EN LA CÁSCARA DEL CACAO (*Theobroma cacao* L.) PARA LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES Y SU POSIBLE APLICACIÓN EN PROCESOS DE FERMENTACIÓN, realizado por Shirley Nayelly Calle Castro con documento de identificación N° 0302571146 y por Daniela Belén Tufiño Bejarano con documento de identificación N° 0105513154, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción de Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 04 de marzo del 2024

Atentamente,



---

Dra. Myriam Ximena Mancheno Cárdenas, Mgtr.

0602018160

## **DEDICATORIA**

A mi amada madre, Miriam, cuyo apoyo incondicional y sabias palabras han sido la luz que ha guiado los pasos de mi trayecto. Su sacrificio y dedicación han sido la fuerza impulsora detrás de cada éxito alcanzado.

A mis queridos abuelitos, Rosita y Vicente, cuyo legado de sabiduría ha dejado una huella imborrable en mi corazón, siendo mi constante fuente de inspiración. A través de sus enseñanzas, han inculcado la importancia de la educación y la exploración intelectual. Asimismo, han fortalecido en mí la comprensión de la relevancia de los lazos familiares, la importancia de la unidad y el apoyo mutuo.

A mis hermanos Marco y Gael, espero que puedan ver en mí un ejemplo a seguir. Los amo infinitamente y, a pesar de que su ausencia física fue difícil, siempre los llevé conmigo. Estoy segura de que cada sacrificio tiene su recompensa, espero que se sientan orgullosos de su hermana mayor.

Han sido pilares fundamentales en mi desarrollo personal y académico, al brindarme oportunidades que impulsaron mi crecimiento y me proporcionaron la valentía para dejar a un lado el temor al fracaso, acogiendo desde el principio mi deseo de superación. Este logro no solo es mérito propio, sino también suyo; el amor y la confianza que depositaron en mí contribuyeron al fortalecimiento de mi carácter. Cabe destacar que la perseverancia fue la clave para cumplir este objetivo de vida.

Shirley Nayelly Calle Castro.

## **AGRADECIMIENTO**

A mi madre y mis abuelitos maternos, mi principal fuente de inspiración y motivación, les agradezco por enseñarme que, en el camino de la vida, el verdadero triunfo reside en superar obstáculos con determinación. Sus lecciones sobre el valor del esfuerzo y el sacrificio me han recordado que todo lo que realmente vale la pena requiere un compromiso genuino

A la Doctora Myriam Mancheno, desde el primer momento que la conocí, me generó empatía por su amplio conocimiento en el área de química. Siendo mi tutora, su sabiduría y experiencia fueron una guía invaluable durante este proceso de aprendizaje. A la Laboratorista Sandy Gavilanes, por ayudarnos a resolver dudas y apoyarnos en cada decisión durante todo el proceso experimental. A mi querida Doctora Yaroslava, por ser una docente dedicada y comprometida con su vocación. Por demostrarme que todavía existen docentes que motivan y tienen ese lado humano que inspira a los estudiantes a superarse.

A todas las personas que han sido parte de mi vida en los últimos cinco años, y a aquellas que han estado presentes desde mucho antes, nunca podré expresar suficiente gratitud por las risas, los momentos de lágrimas, los consejos brindados y las palabras de aliento en los momentos más difíciles. Su cariño ha sido un verdadero abrazo al corazón, y el tiempo de calidad compartido sin duda alguna reconfortó mi ser, haciéndome sentir como en casa, incluso estando lejos de ella. En serio, gracias por formar parte de mi historia y por enriquecer mi camino con su presencia y afecto, esta vivencia universitaria no hubiera sido maravillosa si no los hubiera conocido.

Shirley Nayelly Calle Castro.

## **DEDICATORIA**

A mi abuelito Mario, mi fuente de inspiración y motivo para seguir esta carrera, dedico este logro con todo mi amor y gratitud. Gracias por ser mi guía desde el cielo.

A mi abuelita Mariana, por su cariño y sabiduría inquebrantable, gracias por confiar siempre en mí y por ser mi luz en este proceso académico.

A mis queridos padres, Fabián y Mónica, mi pilar incondicional, les agradezco de todo corazón por su amor inquebrantable, por ser mis primeros maestros en la vida y por haberme inculcado valores de esfuerzo, dedicación y perseverancia. Cada sacrificio que han hecho por mi educación ha sido el cimiento sobre el cual he construido mi camino académico. Su constante apoyo, confianza y aliento han sido la fuerza impulsora detrás de cada logro alcanzado en esta carrera.

A mis hermanos Doménica, Marcelo y David, mis pilares de apoyo incondicional y fuente inagotable de alegría, les agradezco por estar siempre presentes, por animarme a seguir adelante. Sus palabras de aliento fueron mi motor para seguir adelante.

A mi compañero de vida, gracias por estar a mi lado en este arduo pero gratificante recorrido, por motivarme a superar mis metas y ser mejor cada día.

Daniela Belén Tufiño Bejarano.

## **AGRADECIMIENTO**

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a mi familia por su amor incondicional, paciencia y apoyo durante estos cinco años de estudio. Gracias por creer en mí, por motivarme a seguir adelante y por ser mi mayor inspiración. Este logro también es de ustedes.

A mi tutora de tesis, Dra. Myriam Mancheno, por su invaluable guía, sus consejos certeros y su dedicación. Su paciencia, experiencia y conocimientos fueron fundamentales para culminar con éxito este trabajo. Su orientación ha sido fundamental en mi desarrollo académico y profesional, y le estaré eternamente agradecida por todo su apoyo.

A mis colegas, gracias por hacer de estos 5 años un camino lleno de aprendizaje y momentos inolvidables. Ustedes hicieron que este largo camino fuera más llevadero y divertido.

Asimismo, quiero extender mi gratitud a todas las personas que, de una forma u otra, contribuyeron a mi formación académica y al logro de esta meta. Cada gesto de apoyo, cada palabra de aliento ha sido invaluable en este camino hacia la culminación de mis estudios.

¡Gracias a todos por ser parte de este importante capítulo en mi vida!

Daniela Belén Tufiño Bejarano.



# TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
CAPÍTULO 1 .....	3
1.1.    Introducción .....	3
1.2.    Planteamiento del problema .....	3
1.3.    Delimitación del problema .....	7
1.4.    Pregunta de investigación.....	7
1.5.    Justificación .....	7
1.6.    Objetivos .....	9
1.6.1.    Objetivo general .....	9
1.6.2.    Objetivos específicos .....	9
1.8.    Hipótesis.....	10
CAPÍTULO 2 .....	11
MARCO TEÓRICO .....	11
2.1.    Estado del arte.....	11
2.2.    Marco conceptual.....	13
2.2.1.    Carbohidratos .....	13
2.2.2.    Pretratamiento .....	13
2.2.3.    Pretratamiento alcalino .....	14
2.2.4.    Hidrólisis .....	14
2.2.5.    Fermentación.....	15
2.2.6.    Análisis cualitativo y cuantitativo.....	16
2.2.7.    Espectrofotometría.....	16
2.3.    Bases teóricas.....	17
2.3.1.    El cacao ( <i>Theobroma cacao</i> L.) .....	17
2.3.1.1.    Botánica del cacao .....	18
2.3.1.2.    Estructura de la mazorca del cacao.....	19
2.3.2.    Variedades de cacao en el Ecuador .....	21
2.3.3.    Biomasa lignocelulósica .....	22
2.3.4.    Composición de la biomasa lignocelulósica .....	24
2.3.4.1.    Celulosa .....	25
2.3.4.2.    Hemicelulosa.....	26
2.3.4.3.    Lignina .....	27

2.3.5.	Deslignificación.....	29
2.3.6.	Hidrólisis enzimática.....	30
2.3.7.	Enzimas.....	32
2.3.7.1.	Complejo enzima-sustrato.....	33
2.3.7.2.	Cinética enzimática.....	34
2.3.8.	Hidrolasas.....	35
2.3.8.1.	Celulasas.....	36
2.3.8.2.	Aplicaciones de las celulasas.....	38
2.3.9.	Enzimas comerciales.....	39
2.3.9.1.	Carezyme 1000L.....	40
2.3.9.2.	Cellic CTec2.....	40
2.3.10.	Azúcares reductores.....	40
2.3.11.	Grados Brix.....	41
2.3.12.	Determinación de la presencia de azúcares reductores.....	42
2.3.12.1.	Prueba de Fehling.....	42
2.3.13.	Cuantificación de azúcares reductores por espectrofotometría UV-visible.....	42
2.3.13.1.	Método DNS.....	44
CAPÍTULO 3	.....	46
METODOLOGÍA	.....	46
3.1.	Nivel de investigación.....	46
3.2.	Diseño de investigación.....	46
3.3.	VARIABLES.....	46
3.3.1.	Independientes.....	46
3.3.2.	Dependientes.....	46
3.3.3.	Intervinientes.....	46
3.3.4.	Extrañas.....	47
3.4.	Diseño del experimento.....	47
3.5.	Unidad experimental.....	47
3.6.	Técnicas empleadas.....	47
3.6.1.	Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	48
3.6.2.	Técnicas de análisis y procesamiento de datos.....	48
3.7.	Materiales, equipos y reactivos.....	48
3.7.1.	Sustrato.....	48
3.8.	Protocolo a implementar.....	50
3.8.1.	Acondicionamiento de la muestra.....	50

3.8.1.1.	Lavado de Cáscaras .....	50
3.8.1.2.	Secado.....	51
3.8.1.3.	Molienda .....	52
3.8.1.4.	Tamizado.....	52
3.8.2.	Caracterización de la materia prima.....	53
3.8.2.1.	Contenido de humedad.....	53
3.8.2.2.	Contenido de cenizas.....	54
3.8.2.3.	Eliminación de extraíbles .....	55
3.8.2.4.	Contenido de lignina .....	56
3.8.2.5.	Contenido de holocelulosa .....	57
3.8.2.6.	Contenido de $\alpha$ -celulosa.....	59
3.8.2.7.	Contenido de hemicelulosa .....	60
3.8.3.	Deslignificación.....	61
3.8.4.	Hidrólisis enzimática con Cellic CTec2 / Carezyme 1000L.....	62
3.8.5.	Determinación de azúcares reductores .....	63
3.8.5.1.	Prueba Fehling .....	63
3.8.6.	Cuantificación de azúcares reductores.....	64
CAPÍTULO 4 .....		66
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....		66
4.1.	Caracterización de la Materia Prima.....	66
4.2.	Deslignificación .....	68
4.3.	Caracterización posterior a la deslignificación .....	69
4.4.	Determinación de la ecuación experimental representativa de la etapa de hidrólisis enzimática.....	70
4.4.1.	Ecuación para la enzima Cellic CTec2.....	71
4.4.2.	Ecuación para la enzima Carezyme 1000L.....	73
4.5.	Presencia de los azúcares reductores.....	76
4.6.	Cuantificación de Azúcares Reductores.....	78
4.7.	Análisis estadístico de los datos.....	79
4.7.1.	Evaluación según grados Brix [ $^{\circ}$ Bx].....	79
4.7.2.	Evaluación según concentración en partes por millón [ppm] .....	84
CAPÍTULO 5 .....		89
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		89
5.1.	Conclusiones .....	89
5.2.	Recomendaciones .....	91

<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	93
<b>ANEXOS</b> .....	120

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Planta de cacao. ....	19
<b>Figura 2.</b> Mazorca de cacao. ....	20
<b>Figura 3.</b> Estructura química de la celulosa. ....	26
<b>Figura 4.</b> Estructura química de la hemicelulosa. ....	27
<b>Figura 5.</b> Estructuras monoméricas de lignina. ....	28
<b>Figura 6.</b> Recolección de las mazorcas de cacao. ....	49
<b>Figura 7.</b> Lavado de las cáscaras de cacao. ....	51
<b>Figura 8.</b> Secado de las cáscaras de cacao en la estufa. ....	51
<b>Figura 9.</b> Molienda manual y mecánica de las cáscaras de cacao. ....	52
<b>Figura 10.</b> Tamizaje del material triturado en el molino manual y mecánico. ....	53
<b>Figura 11.</b> Determinación de contenido de humedad en el material. ....	54
<b>Figura 12.</b> Determinación del contenido de cenizas en el material. ....	55
<b>Figura 13.</b> Eliminación de los compuestos extraíbles usando el Soxhlet. ....	56
<b>Figura 14.</b> Determinación del contenido de lignina en el material. ....	57
<b>Figura 15.</b> Determinación del contenido de holocelulosa en el material. ....	59
<b>Figura 16.</b> Determinación del contenido de celulosa en el material. ....	60
<b>Figura 17.</b> Proceso de deslignificación del material. ....	62
<b>Figura 18.</b> Proceso de hidrólisis con Cellic CTec2 y Carezyme 1000L. ....	63
<b>Figura 19.</b> Prueba de Fehling en las muestras del hidrolizado de Cellic CTec2 y de Carezyme 1000L. ....	64
<b>Figura 20.</b> Método DNS empleado para determinar la concentración de azúcares reductores. .	65
<b>Figura 21.</b> Muestra de Cellic CTec2 con la prueba de Fehling. ....	77
<b>Figura 22.</b> Muestra de Carezyme 1000L con la prueba de Fehling. ....	77
<b>Figura 23.</b> Hoja de especificación para Carezyme 1000L. ....	120
<b>Figura 24.</b> Hoja de especificación para Cellic CTec2. ....	120
<b>Figura 25.</b> Degradación del sustrato por parte de Cellic CTec2 y Carezyme 1000L. ....	121

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1.</b> Grados Brix con relación al tiempo para hidrólisis enzimática con Cellic CTec2. ...	71
<b>Gráfica 2.</b> Gráfica de linealización para obtener parámetros cinéticos de la reacción de Cellic CTec2.....	72
<b>Gráfica 3.</b> Grados Brix con relación al tiempo para hidrólisis enzimática con Carezyme 1000L. ....	74
<b>Gráfica 4.</b> Gráfica de linealización para obtener parámetros cinéticos de la reacción de Carezyme 1000L.....	75
<b>Gráfica 5.</b> Producción de azúcares reductores expresada en ppm mediante enzimas. ....	78
<b>Gráfica 6.</b> Diagrama de cajas según °Bx obtenidos de Carezyme 1000L y Cellic CTec2. ....	84
<b>Gráfica 7.</b> Diagrama de cajas de azúcares reductores obtenidos en ppm de Carzyme 1000L y Cellic CTec2. ....	88

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Elementos químicos que constituyen la estructura básica de la biomasa lignocelulósica. ....	23
<b>Tabla 2.</b> Componentes principales de diversos materiales lignocelulósicos. ....	25
<b>Tabla 3.</b> Materiales, equipos y reactivos utilizados durante la fase experimental. ....	49
<b>Tabla 4.</b> Composición de las cáscaras del cacao.....	66
<b>Tabla 5.</b> Resultado del proceso de deslignificación.....	68
<b>Tabla 6.</b> Composición de las cáscaras de cacao posterior a la deslignificación. ....	69
<b>Tabla 7.</b> Grados Brix en función del tiempo durante hidrólisis enzimática con enzima Cellic CTec2.....	71
<b>Tabla 8.</b> Linealización de la ecuación para calcular la velocidad de reacción de Cellic CTec2. 72	
<b>Tabla 9.</b> Grados Brix en función del tiempo durante hidrólisis enzimática con enzima Carezyme 1000L.....	73
<b>Tabla 10.</b> Linealización de la ecuación para calcular la velocidad de reacción de Carezyme 1000L.....	74
<b>Tabla 11.</b> Grados Brix obtenidos por cada réplica completadas las 72 horas.....	80
<b>Tabla 12.</b> Resultado de la prueba estadística de Shapiro-Wilk utilizada para contrastar los grados Brix resultantes de la hidrólisis enzimática.....	81

<b>Tabla 13.</b> Resultado de la prueba estadística ANOVA.....	82
<b>Tabla 14.</b> Resultados de la prueba estadística de Tukey para la comparación de °Bx producidos por las enzimas.....	83
<b>Tabla 15.</b> Azúcares reductores obtenidos en ppm posterior a las 72 horas. ....	85
<b>Tabla 16.</b> Resultado de la prueba estadística de Shapiro-Wilk utilizada para contrastar los azúcares reductores en ppm resultantes de la hidrólisis enzimática. ....	86
<b>Tabla 17.</b> Resultado de la prueba estadística de Krustal-Wallis utilizada para contrastar los azúcares reductores en ppm resultantes de la hidrólisis enzimática. ....	87

## ÍNDICE DE ECUACIONES

<b>Ecuación 1</b> Michaelis-Menten. ....	34
<b>Ecuación 2</b> Contenido de cenizas.....	54
<b>Ecuación 3</b> Contenido de extraíbles.....	55
<b>Ecuación 4</b> Contenido de lignina. ....	57
<b>Ecuación 5</b> Contenido de holocelulosa. ....	58
<b>Ecuación 6</b> Contenido de celulosa. ....	60
<b>Ecuación 7</b> Contenido de hemicelulosa. ....	60
<b>Ecuación 8</b> Porcentaje de Deslignificación.....	61
<b>Ecuación 9</b> Cinética de la reacción. ....	70
<b>Ecuación 10</b> Ecuación logarítmica.....	70
<b>Ecuación 11</b> Ecuación logarítmica para Cellic CTec2.....	73
<b>Ecuación 12</b> Ecuación cinética experimental para Cellic CTec2. ....	73
<b>Ecuación 13</b> Ecuación logarítmica para Carezyme 1000L. ....	75
<b>Ecuación 14</b> Ecuación cinética experimental para Carezyme 1000L.....	76

## RESUMEN

La siguiente investigación tuvo como objetivo comparar la eficiencia de la hidrólisis entre dos enzimas para la obtención de azúcares reductores de las cáscaras de cacao y determinar si existen diferencias entre ellas. Para la realización de la fase experimental se obtuvo la biomasa lignocelulósica de una finca de cacao, la cual fue acondicionada y sometida a análisis por métodos físicos y químicos para establecer la cantidad exacta de cada componente.

Antes del proceso enzimático, se eliminaron las barreras físicas que impiden la interacción efectiva de las enzimas con el sustrato. Para ello, se llevó a cabo una deslignificación, en la que la muestra se trató con KOH al 1 %.

En la hidrólisis se usaron 2.5 g de biomasa. Para Cellic CTec2, se los combinó con 1.7 mL de enzima en 25 mL de solución de acetato de sodio (50 mM, pH 5). Respecto a Carezyme 1000L, se los mezcló con 3 mL de enzima en 25 mL de solución de acetato de sodio (50 mM, pH 8.5). La reacción se lleva a cabo a 50°C durante 72 horas con agitación a 150 rpm. Posteriormente, se cuantificó su rendimiento mediante el método DNS. Los resultados mostraron que Cellic CTec2 registró 31,075.1 ppm, mientras que Carezyme 1000L obtuvo 2,709.3 ppm. Esto demuestra que Cellic CTec2 es más eficiente en la degradación del sustrato, siendo 11.5 veces superior en la cantidad de azúcares reductores producidos en relación a Carezyme 1000L.

**Palabras claves:** azúcares reductores, biomasa lignocelulósica, Carezyme 1000L, Cellic CTec2, hidrólisis, rendimiento.



## ABSTRACT

The objective of the following research was to compare the efficiency of hydrolysis between two enzymes for obtaining reducing sugars from cocoa shells and to determine if there are differences between them. For the experimental phase, lignocellulosic biomass was obtained from a cocoa farm, which was conditioned and subjected to analysis by physical and chemical methods to establish the exact amount of each component.

Before enzymatic processing, the physical barriers that prevent the effective interaction of the enzymes with the substrate were eliminated. For this purpose, delignification was carried out, in which the sample was treated with 1 % KOH.

In the hydrolysis, 2.5 g of biomass were used. For Cellic CTec2, they were combined with 1.7 mL of enzyme in 25 mL of sodium acetate solution (50 mM, pH 5). For Carezyme 1000L, they were mixed with 3 mL of enzyme in 25 mL of sodium acetate solution (50 mM, pH 8.5). The reaction is carried out at 50°C for 72 hours with stirring at 150 rpm. Subsequently, its yield was quantified using the DNS method. The results showed that Cellic CTec2 registered 31,075.1 ppm, while Carezyme 1000L obtained 2,709.3 ppm. This shows that Cellic CTec2 is more efficient in substrate degradation, being 11.5 times higher in the amount of reducing sugars produced relative to Carezyme 1000L.

**Key words:** reducing sugars, lignocellulosic biomass, Carezyme 1000L, Cellic CTec2, hydrolysis, yield.

# CAPÍTULO 1

## 1.1. Introducción

Los desafíos relacionados con la contaminación del medio ambiente se originan, en su mayoría, a partir de actividades humanas, y la generación de residuos se destaca como uno de los problemas preeminentes a nivel global debido a consideraciones económicas, ambientales y de seguridad alimentaria. Actualmente, existen numerosos procesos dedicados a producir azúcares fermentables con material residual, entre ellos destaca la hidrólisis enzimática, un enfoque biológico empleado por la especificidad de las enzimas, su menor impacto en el entorno ambiental y su capacidad para lograr un mayor rendimiento. En este estudio, se llevará a cabo una comparación detallada de la hidrólisis enzimática a partir de dos enzimas aplicadas a la cáscara del cacao (*Theobroma cacao* L.) con el propósito de evaluar su eficiencia en la obtención de azúcares reductores para las posibles aplicaciones de estos compuestos en procesos fermentativos. Este análisis proporcionará una comprensión a profundidad sobre el papel crítico desempeñado por las enzimas en la valorización de la biomasa considerada desecho, revelándose como un factor influyente en el rendimiento global del proceso. Así que, este abordaje interdisciplinario al combinar campos de la ciencia ofrece una solución amigable con el medio ambiente en el ámbito de los bioprocesos.

## 1.2. Planteamiento del problema

El uso de materias primas residuales para convertir la biomasa en azúcares reductores mediante la hidrólisis enzimática ha adquirido un creciente protagonismo. Esto se debe a que dichos azúcares tienen un considerable potencial de aplicación industrial, especialmente en procesos de fermentación, lo que no solo conlleva beneficios económicos sino también impulsa el avance científico a través de la investigación para fomentar la innovación y la mejora.

En naciones productoras, el cacao emerge como un valioso producto de exportación, con una arraigada historia en la esfera económica que se remonta a la época colonial. Hoy en día, el Ecuador se posiciona como el tercer mayor productor de cacao a nivel global y el primero de América, experimentando el mayor crecimiento porcentual en la última década. Durante este período, ha logrado duplicar su producción de cacao, pasando de 225,000 toneladas métricas en la cosecha 2013/14 a 462,000 toneladas métricas en la cosecha 2022/23 (Abad et al., 2020; Nacer, 2024). Incluso, el cultivo de cacao representa una actividad social y cultural de gran relevancia para el territorio, especialmente en el contexto de la agricultura familiar. La cadena productiva involucra alrededor de 600,000 personas que se benefician o dependen de manera directa de la generación de esta materia prima. Este estrato representa cerca del 4 % de la población económicamente activa a nivel nacional [PEA] y el 12.5 % de la PEA agrícola (Carranza et al., 2020).

El Sistema de Información Pública Agropecuaria, basándose en datos proporcionados por el Instituto Nacional de Estadística y Censos, revela que el cultivo de cacao se posicionó como la actividad agrícola principal en Ecuador durante el año 2022. Según las cifras, en el país existen alrededor de 591,557 hectáreas destinadas a la plantación de cacao, con una superficie cosechada de 509,179 hectáreas y una producción total de 337,149 toneladas. Esto se traduce en un rendimiento promedio de 0.66 toneladas por hectárea (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2023). No obstante, en este escenario agrícola, durante la fase de cosecha del cacao, se originan diversos subproductos. Solo se aprovecha el 10 % del peso del fruto fresco, dejando un 90 % restante en forma de desechos, como la cáscara de cacao y el mucílago. Este último representa el 75 % del peso total de las vainas cosechadas (Vera et al., 2021).

Los frutos del cacao generalmente se abren utilizando herramientas como machetes dentro o en los límites de la plantación, y las cáscaras resultantes se descartan directamente en el suelo. En el mejor escenario, estas cáscaras se aprovechan como abono orgánico para enriquecer el suelo con nutrientes. Sin embargo, al entrar en contacto con herramientas metálicas, la biomasa queda expuesta a microorganismos como levaduras y hongos filamentosos (Vásquez et al., 2019; International Cocoa Organization, 2023). Esta cáscara, que supone entre el 74 % y el 86 % del peso de la mazorca, se considera un material grueso de degradación lenta por la gran cantidad de lignina presente. Este componente antes mencionado contiene enlaces fuertes que no se descomponen fácilmente durante procesos naturales de biodegradación (Herrera et al., 2020; Loayza, 2020). Esta situación ha derivado en problemas ambientales, ya sea fitosanitarios o paisajísticos, debido a la amplia dispersión espacial de la biomasa generada. En la naturaleza, la descomposición de la cáscara del cacao depende de factores físicos, químicos y biológicos. Entre los factores físicos se encuentran la temperatura y la exposición al sol, mientras que la humedad de la biomasa es un factor químico crucial. En términos biológicos, los hongos, en particular, son fundamentales para descomponer las complejas estructuras de la cáscara del cacao como fuente nutricional, pero en ciertas condiciones climáticas la biomasa propicia la proliferación de hongos fitopatógenos (Soares & Oliveira, 2022).

El país produce aproximadamente 2.2 millones de toneladas de desechos agroindustriales anualmente, en su mayoría, son sólidos y orgánicos con elevado contenido de material lignocelulósico. Esto significa que hay abundante fuente de materia prima disponible para la creación de nuevos productos con una orientación sostenible, biotecnológica e innovadora. El manejo inadecuado de estos residuos por parte de las empresas agroalimentarias tiene un impacto directo en el equilibrio medioambiental. Muchos residuos se queman de forma descontrolada o

inapropiada en vertederos al aire libre, provocando una grave contaminación del suelo, el agua y otros entornos naturales, además de tener un impacto visual negativo en el paisaje. Esto afecta sobre todo a la flora y fauna de estas áreas y a la salud y la economía de la sociedad (Aguilar et al., 2022). Aunque se reconoce que la gestión apropiada de los residuos de cacao puede tener efectos favorables para el entorno natural, aún no se ha estudiado con exhaustividad su impacto en diferentes contextos y regiones, ni cómo puede afectar a la salud de los seres vivos. Además, hay poca información sobre la composición química exacta de los residuos del cacao, pues puede variar en función de la variedad de cacao, las condiciones agroclimáticas donde se desarrolla el cultivo y la incidencia de plagas y enfermedades en la plantación (Álvarez et al., 2022).

Por cada tonelada de granos secos de cacao se generan aproximadamente 10 toneladas de desechos, la demanda mundial de chocolate se espera que aumente anualmente en un 1.5 % hasta 2026, impulsada por la preferencia de productos nuevos que diversifiquen el sector secundario de la economía. En este contexto, el uso de desperdicios provenientes de la cosecha del cacao sigue siendo investigado, ya que su viabilidad y potencial a gran escala aún no se han explorado del todo. Por consiguiente, para abordar los desafíos de gestión de residuos en la cadena de producción, se promueven estrategias que impulsen el aprovechamiento y la valorización de los desechos para la recuperación de compuestos bioactivos logrando una bioeconomía circular. Esta iniciativa busca una producción cíclica, es decir, cerrar el ciclo productivo y lograr la reducción de residuos. La disponibilidad y bajos costos de estos desechos como materia prima ofrece la oportunidad de reducir residuos contaminantes y fomentar el desarrollo de productos rentables, son factores propicios para mejorar los aspectos económicos, ambientales y sociales asociados con la producción de cacao (Chico, 2022). El manejo de los residuos agrícolas en las operaciones de

pequeños y medianos productores puede crear empleo y fuentes de ingresos a nivel nacional, a la vez que beneficia al entorno medioambiental (Díaz et al., 2023).

### **1.3. Delimitación del problema**

El proyecto se realizó en los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana ubicada en Cuenca, Ecuador, durante un lapso de tres meses. A lo largo de la investigación, se identificaron algunas limitaciones que podrían haber afectado su desarrollo:

- La disponibilidad de materia prima, la cual está sujeta a períodos de cosecha que ocurren cada 15 días.
- Disponibilidad de equipos en los laboratorios.
- El acceso a los laboratorios de Ciencias de la Vida y la disponibilidad de los equipos.
- Interrupciones en el suministro eléctrico debido a condiciones de estiaje.

### **1.4. Pregunta de investigación**

La transformación de la biomasa en azúcares reductores por hidrólisis enzimática requiere la elección adecuada de la enzima para optimizar tanto la producción como la eficiencia del proceso, aspectos que inciden directamente en la viabilidad del mismo. Por lo tanto, bajo esta perspectiva y de las consideraciones expuestas con anterioridad, surge la siguiente interrogante: ¿Cuál de las dos enzimas, Carezyme 1000L o Cellic CTec2, proporciona una mayor cantidad de azúcares reductores?

### **1.5. Justificación**

Con frecuencia, los productores agrícolas suelen descartar los subproductos generados durante el preprocesamiento del grano de cacao en sus propias tierras de cultivo. Entonces, este escenario es motivo de preocupaciones tanto sociales como ecológicas provocando contaminación terrestre e hídrica, la emisión de olores desagradables, la propagación de plagas y enfermedades,

además de ocasionar un impacto negativo en el paisaje durante la temporada de lluvias (Vásquez et al., 2019; Arodudu et al., 2020). Como la industria del cacao es una fuente de materiales lignocelulósicos, se están dedicando a buscar soluciones biotecnológicas para el tratamiento y el aprovechamiento de estos residuos y así obtener productos de valor agregado (García & Martínez, 2014).

La caracterización de los residuos de cacao revela que las biomoléculas presentes en la cáscara tienen un alto índice de utilidad como materia prima en el campo alimenticio, cosmético y farmacéutico. La valorización de los residuos agroindustriales está condicionada por su tipo y cantidad, y existen dos enfoques principales para su reutilización. La primera generación se centra en la producción de bienes de consumo, como alimento para animales, compost, biogás, bioetanol y otros. Por otro lado, la segunda generación se enfoca en extraer componentes como fenoles, azúcares, almidón, ceras, resinas, entre otros, para fabricar productos químicos básicos y especializados usando distintos procesos. En ambos casos, es esencial incluir etapas previas en el proceso, como la higienización y el pretratamiento, y considerar opciones de procesamiento, como mecánico, térmico, químico y físico-mecánico, para obtener un mayor rendimiento en el producto final (Riera et al., 2018).

Es factible utilizar métodos biológicos como la hidrólisis enzimática, para descomponer la celulosa y la hemicelulosa en azúcares reductores que luego pueden usarse en fermentación para fabricar bioplásticos, biocombustibles y sustancias químicas de interés. Este planteamiento ofrece múltiples ventajas en el ámbito industrial, incluyendo la disminución de la viscosidad, la mejora en la capacidad de filtración, la prevención de la cristalización, la clarificación y la estabilización de líquidos para su preservación, la formación de coágulos que hacen que las macromoléculas sean insolubles, una fermentación más eficaz y una mayor resistencia bacteriológica, etc (Romero et

al., 2015). A pesar de ello, la selección de las enzimas adecuadas en el proceso de hidrólisis es fundamental para incrementar el rendimiento y la eficiencia en la transformación de biomasa en azúcares reducidos. Ahora bien, el análisis instrumental permitirá evaluar y establecer la eficiencia de las dos enzimas utilizadas en la obtención del producto deseado. Estos enfoques permitirán un control preciso del funcionamiento del proceso y la optimización en la conversión del sustrato a producto, contribuyendo así a una mayor eficacia en la síntesis deseada. Para ello, se recurre a métodos analíticos fiables y aplicables, tales como la espectrometría UV visible para determinar la presencia de azúcares y la espectroscopía infrarroja direccionada a la identificación de los grupos funcionales existentes en la muestra.

## **1.6. Objetivos**

En el manejo de los residuos agroindustriales, la biomasa de las cáscaras de cacao, un subproducto común en el sector cacaotero, se ha perfilado como un precursor apreciable destinado a la generación de azúcares. A continuación, se describen los propósitos de este trabajo experimental.

### **1.6.1. Objetivo general**

Comparar la eficiencia de la hidrólisis enzimática aplicada a la cáscara del cacao (*Theobroma cacao* L.) utilizando Carezyme 1000L y Cellic CTec2 de forma experimental obteniendo la mayor cantidad de producto hidrolizado.

### **1.6.2. Objetivos específicos**

- Caracterizar la cáscara de cacao CCN-51 previo a su tratamiento mediante pruebas fisicoquímicas para la identificación de su composición lignocelulósica.
- Separar la celulosa de la biomasa a través de procesos físicos y químicos necesarios para la obtención de materia prima óptima para el proceso de hidrólisis enzimática.



- Aplicar las enzimas Carezyme 1000L y Cellic CTec2 en la biomasa pretratada mediante protocolos establecidos obteniendo material hidrolizado.
- Cuantificar los azúcares reductores generados por la acción de Carezyme 1000L y Cellic CTec2 mediante análisis instrumental estableciendo la eficiencia de la hidrólisis enzimática.

### **1.8. Hipótesis**

Carezyme 1000L va a tener la misma eficiencia que Cellic CTec2 en el proceso de hidrólisis para la obtención de azúcares reductores.

## CAPÍTULO 2

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Estado del arte

En el ámbito de la deslignificación y aprovechamiento de biomasa lignocelulósica, múltiples investigaciones han abordado diversas estrategias y tratamientos para optimizar la producción de bioproductos. Pantoja y colaboradores (2015) destacaron la eficacia del pretratamiento químico en la reducción de lignina, logrando una deslignificación significativa del 32.26 % al 62.72 %, mientras que el pretratamiento enzimático mostró incrementos notables en celulosa [25.57 % al 200.12 %]. Dagnino y colaboradores (2018) llevaron a cabo la deslignificación organosolv en aserrín de algarrobo negro, identificando el aserrín sin taninos como la mejor materia prima para la producción de holocelulosa destinada a la fabricación de bioetanol. Cruz-Cardona y colaboradores (2019) evaluaron la enzima en el procesamiento de la Cascarilla de Cebada Cervecera, resaltando que el complejo Viscozyme L mostró el mejor rendimiento al liberar hasta 16.9 g/L de glucosa. Ayala y colaboradores (2020) exploraron con éxito la conversión de polvillo de arroz en azúcares reductores y bioetanol, utilizando un tratamiento específico con un 18 % de polvillo de arroz y 0.6 g/L de inóculo de *Trichoderma spp.* Castillo y colaboradores (2019) trataron la hidrólisis de la cascarilla de arroz mediante pretratamientos químicos y enzimáticos, logrando una sacarificación del 73.2 %. En contribución a este campo, García y Peralta (2022) convirtieron eficientemente el bagazo de caña en azúcares simples a través de tratamientos físicos y enzimáticos, destacando condiciones óptimas a 121°C durante 60 minutos. Salcedo y colaboradores (2011) introdujeron un "índice global de hidrólisis" para evaluar la eficiencia enzimática en residuos de caña de azúcar, señalando que el preparado enzimático E5 junto con el sustrato S3 exhibió el mayor índice global de hidrólisis. Freixo y

colaboradores (2023) presentaron un estudio sobre la obtención de celulosa a partir del bagazo de caña de azúcar mediante autohidrólisis, logrando pureza y cristalinidad destacadas. Deheco (2019) exploró la aplicación de enzima celulasa fúngica en cáscaras de plátano de seda, identificando una combinación óptima de concentración de enzima y tiempo de hidrólisis para obtener jarabe glucosado. Zelada (2021) se enfocó en la deslignificación del raquis de banano, destacando la posibilidad de obtener pulpa de calidad mediante un rango específico de NaOH y tiempos de deslignificación. Espinosa-Cajas (2013) investigó la obtención de etanol a partir del excedente orgánico del banano, advirtiendo sobre las condiciones extremas en la hidrólisis alcalina que podrían afectar la celulosa y hemicelulosa. Niño y colaboradores (2013) realizaron pretratamientos en hojas y tallos de yuca, destacando la liberación significativa de azúcares reductores en hojas con pretratamiento de NaOH. Reales y colaboradores (2016) evaluaron pretratamientos en la remoción de lignina de tallos de yuca, concluyendo que el pretratamiento alcalino fue más efectivo. Domínguez y Hernández (2016) proponen un enfoque de hidrólisis enzimática de paja lignocelulósica, resaltando la mejora de la eficiencia al dosificar la paja en intervalos de tiempo, especialmente a concentraciones más altas. Hozman-Manrique y colaboradores (2023) demostraron la viabilidad de aislar microfibras de celulosa de la cáscara de cacao mediante pretratamientos específicos, logrando una reducción notable de la lignina y un aumento en la holocelulosa. Hernández-Mendoza y colaboradores (2021) optimizaron exitosamente el pretratamiento alcalino e hidrólisis enzimática para la producción de bioetanol a partir de la cáscara de la vaina de cacao. Álvarez-Barreto y colaboradores (2020) aplicaron diversos tratamientos a la biomasa residual de cáscaras de cacao, evidenciando una reducción significativa de la lignina. Ouattara y colaboradores (2022) llevaron a cabo una optimización detallada del proceso de deslignificación de la cáscara del grano del cacao con KOH en la

autoclave, subrayando la importancia de pretratamientos para maximizar la producción de azúcares reductores. Torres-Cabezas (2019) obtuvo celulosa a partir de la cáscara de cacao variedad Criollo mediante hidrólisis térmica, identificando la temperatura óptima para la extracción eficiente de alfa celulosa. Estos avances colectivos indican una evolución constante en la optimización de procesos, centrada en deslignificación, hidrólisis y obtención de bioproductos, marcando un hito en la búsqueda de alternativas sostenibles para la utilización de biomasa lignocelulósica.

## **2.2. Marco conceptual**

### **2.2.1. Carbohidratos**

También se les conoce como glúcidos, son biomoléculas constituidas por carbono, hidrógeno y oxígeno, cuya fórmula general es  $[\text{CH}_2\text{O}]_n$ . Éstos representan la mayor parte de la materia orgánica del planeta Tierra y se encuentran en una extensa diversidad de alimentos, la mayoría provenientes de tejidos vegetales. En los organismos vivientes cumplen una serie de funciones: actúan como reservas de energía, combustibles, productos intermedios del metabolismo, componentes estructurales, etc. Se clasifican según el grupo funcional, el número de carbonos y las unidades de azúcar que presentan, de acuerdo a este último se distinguen los monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos (Martínez et al., 2018; Leong et al., 2019).

### **2.2.2. Pretratamiento**

La producción de bioetanol a partir de materia lignocelulósica comprende tres fases principales: pretratamiento, hidrólisis y fermentación (Singh et al., 2017). Por la complejidad de los componentes, se requiere un tratamiento previo del material lignocelulósico y se ocupa de la degradación de la lignina [grado de lignificación], la supresión de la hemicelulosa, la estructura

cristalina de la celulosa y la ampliación de la superficie para las enzimas. Sin embargo, un solo proceso de pretratamiento no logra todos estos beneficios. Las principales técnicas incluyen pretratamientos físicos como trituración, hidrotérmólisis, microondas y ultrasonido; fisicoquímicos como explosión de vapor y explosión de fibra de amoníaco; enfoques biológicos como el uso de microorganismos o sus derivados; y químicos que implican ácidos, alcalinos, disolventes y ozono. Al combinar estas técnicas se busca maximizar el efecto sobre la matriz lignocelulósica, mejorando el rendimiento y la productividad de los productos deseados, al mismo tiempo que se evitan problemas operativos como alto consumo de energía, grandes volúmenes de reacción y tiempos prolongados de tratamiento (Solarte-Toro et al., 2019).

### **2.2.3. Pretratamiento alcalino**

Para superar la recalcitrancia y aprovechar eficazmente las materias lignocelulósicas disponibles, se emplea el pretratamiento alcalino, un proceso químico en el que la lignina se disuelve en una solución de álcali, normalmente se hace uso de hidróxidos de sodio, potasio, calcio y amonio. Durante este proceso, se rompe la lignina, se desintegra la hemicelulosa y se reduce la cristalinidad y el grado de polimerización de la celulosa, lo que facilita la interacción de la celulosa con las enzimas. Como consecuencia del pretratamiento también se modifica la estructura lignocelulósica por hinchamiento de la celulosa, aumentando la superficie interna y mejorando el acceso a los hidratos de carbono para la hidrólisis enzimática mediante la eliminación de los grupos acetilo y las sustituciones del ácido urónico en las hemicelulosas (Baruah et al., 2018).

### **2.2.4. Hidrólisis**

Es proceso en el que se rompen enlaces químicos mediante el agua, es decir, se produce una reacción química en la que las moléculas se dividen por la adición de una molécula de agua.

De este modo, una fracción de la molécula inicial recibe un ion hidrógeno [H<sup>+</sup>] y el otro grupo adquiere un grupo hidroxilo [-OH] (Cleaves, 2011; Tebes-Stevens et al., 2017).

Esto permite comprender el proceso de hidrólisis enzimática, en el que las enzimas introducidas influyen en el funcionamiento del proceso y facilitan la reducción de los componentes lignocelulósicos. Sin embargo, la eficacia de la hidrólisis enzimática depende de: [1] el tipo de enzima y [2] el sustrato. Para la selección de la enzima se tienen en cuenta una serie de características: tipo de enzima, fuente y eficacia, mientras que para la elección del sustrato se debe tener en cuenta el tamaño de la materia prima/partículas, la porosidad y el potencial celulósico (Onu & Mbohwa, 2021).

### **2.2.5. Fermentación**

Durante milenios, la humanidad ha empleado el arte de la fermentación, que fue desarrollado tradicionalmente por las sociedades antiguas para preservar los alimentos en estaciones duras, para festividades rituales y para la mejora de las propiedades organolépticas de los alimentos (Dimidi et al., 2019; Rossetti & Forno, 2022). Una forma de biotecnología tradicional en la que intervienen catalizadores enzimáticos derivados de microorganismos como bacterias, levaduras u mohos para la transformación química de moléculas orgánicas complejas de un sustrato en estructuras más simples, bioactivas, funcionales y nutritivas. Así, los productos fermentados son el resultado de un crecimiento microbiano controlado y de actividades metabólicas que conducen a la transformación de los componentes de los alimentos a través de la acción enzimática (Šikić-Pogačar et al., 2022).

El proceso fermentativo ha experimentado avances significativos con el paso del tiempo, pasando de depender de microbios naturales y fermentación espontánea a utilizar cultivos iniciadores de manera más controlada para garantizar la calidad y la seguridad alimentaria. No

obstante, hay varias formas de clasificar los alimentos y bebidas fermentados. Por un lado, se pueden agrupar según el sustrato utilizado, como productos lácteos, cereales, legumbres, verduras, frutas, carne, pescado y hierbas. A su vez, la fermentación puede categorizarse según la vía bioquímica principal: alcohólica, láctica, acética y alcalina. En el primera, los azúcares de la materia prima se convierten en alcohol y dióxido de carbono; ejemplos de ello son la producción de pan, cerveza y vino (Mannaa et al., 2021).

#### **2.2.6. Análisis cualitativo y cuantitativo**

La química analítica aborda los métodos que facilitan la comprensión de la composición química de las sustancias halladas en las muestras. Si bien el método cualitativo revela información sobre la identidad de los elementos o grupos moleculares presentes, con el método cuantitativo se consiguen datos numéricos acerca de la cantidad relativa de estos componentes (Skoog et al., 2008).

Las técnicas que se basan en mediciones objetivas tienden a proporcionar datos más precisos que las técnicas subjetivas. Aunque las técnicas instrumentales tienen esta ventaja, es importante estimar la precisión del método mediante análisis repetidos y citar la variabilidad resultante como coeficiente de variación. La exactitud de las técnicas instrumentales depende de la precisión del estándar, del método y de la validez de la suposición del analito. Además, la especificidad de un método instrumental afecta su precisión, ya que cuanto más específico sea, menos probable será que esté sujeto a interferencias (Gordon & Macrae, 1987).

#### **2.2.7. Espectrofotometría**

La espectrofotometría implica la medición precisa de cómo la luz ultravioleta, visible e infrarroja interactúa con un material, teniendo un impacto significativo en diversos campos científicos y tecnológicos. Las propiedades ópticas fenomenológicas del material, que incluyen

reflexión, transmisión, dispersión y absorción, brindan información cómo se comporta frente a la luz. Además, un material puede emitir luz por diferentes razones, como la absorción y reemisión de luz, la ganancia de energía [electroluminiscencia] o la emisión debido a su temperatura [incandescencia]. Asimismo, las mediciones espectrofotométricas permiten examinar la naturaleza física interna del material, contemplando su índice de refracción y coeficiente de extinción (Germer et al., 2014).

### **2.3. Bases teóricas**

#### **2.3.1. El cacao (*Theobroma cacao* L.)**

Es una especie vegetal presente en zonas tropicales frecuentemente identificada como cacao, forma parte de la familia Malvaceae y está categorizado en el orden Malvales (Baharum et al., 2016; Gopaulchan et al., 2019). Tiene su origen en América Central, que incluye México, así como en América del Sur, desde la Guayana Francesa hasta Bolivia. Se plantea que ciertos grupos genéticos tienen conexión con áreas geográficas específicas; el Criollo y el Nacional, por ejemplo, podrían tener sus raíces en la parte occidental de la región amazónica ecuatoriana (Jean-Marie et al., 2022).

La producción mundial de cacao para el periodo 2022/23 se estima en aproximadamente 4,953 millones de toneladas, mostrando un incremento del 2.6 % en comparación con años anteriores. De este total, América contribuye con 1,052 millones de toneladas, de las cuales 440 corresponden a Ecuador (International Cocoa Organization, 2023).

En el año 2022, la Costa ecuatoriana demostró una capacidad productiva superior en comparación con otras regiones. La provincia de Los Ríos encabezó con una producción de alrededor de 104,270 toneladas en una superficie cosechada de 120,186 hectáreas, representando el 31 % del total. Le siguen Manabí, con 49,973 toneladas provenientes de 103,949 hectáreas



[15%], y Guayas, con 68,960 toneladas cosechadas en 91,001 hectáreas [20 %] (Corporación Financiera Nacional, 2023). Por otra parte, según la información proporcionada por la Asociación Nacional de Exportadores de Cacao, alrededor del 70 % del cultivo de cacao está a cargo de pequeños productores, mientras que un 20 % corresponde a medianos productores y el 10 % restante se encuentra en manos de grandes productores (Sánchez et al., 2020; European Forest Institute, 2021).

#### **2.3.1.1. Botánica del cacao**

El cultivo de cacao se da en los trópicos húmedos en latitudes de 20° al norte y al sur del Ecuador. En África Occidental, los árboles se propagan a partir de semillas, mientras que en América del Sur y el Sudeste Asiático se utiliza tanto cacao derivado de semillas como injertado. Los árboles comienzan a producir frutos después de dos a tres años, con flores que se forman en el tronco y las ramas. Sin embargo, alrededor del 5 % de estas flores se convierten en frutos, llamados vainas o mazorcas. Estas vainas, que tardan entre cinco y seis meses en madurar después de la polinización, contienen entre 20 y 40 semillas que, tras fermentar y secar, se comercializan en el mercado (Lahive et al., 2018).

El árbol perenne puede alcanzar hasta 5-8 m de altura y 4-6 m de diámetro de copa, llegando incluso a 20 m en bosques. Su sistema radicular consta de una raíz pivotante cuya longitud varía según el suelo, con raíces secundarias nutriendo la planta en los primeros 30 cm del suelo. El tallo es erecto y presenta ramificaciones con corteza lisa en los primeros años, volviéndose áspera y rugosa con el desarrollo de cojines florales. Las hojas tienen forma oblonga y su color varía a medida que envejecen, pasando de verde a violeta según la cantidad de antocianina. Las flores, pequeñas y hermafroditas, varían en color de blanco a rosado. Son polinizadas por insectos y se desarrollan en cojines florales en el tronco o ramas leñosas. El fruto contiene a las semillas o

granos del cacao (Crozier et al., 2011; Colombo et al., 2012; De Souza et al., 2018; Karumamkandathil et al., 2022).

El perfil químico de la materia prima está condicionado por diversos elementos, como la procedencia geográfica, que abarca aspectos ambientales y de desarrollo [el tipo de terreno, la cantidad de agua disponible, la exposición solar y la temperatura] y el genotipo del cacao (Erazo et al., 2023).

### **Figura 1.**

*Planta de cacao.*



**Fuente:** Autoras.

#### **2.3.1.2. Estructura de la mazorca del cacao**

El material de desecho generado durante la postcosecha, una etapa de la producción del cacao incluye cáscara de mazorca de cacao, pulpa y cáscaras de granos de cacao, representa el mayor porcentaje de biomasa residual 70–80 % de los cuales entre el 60 % y el 70 % es cáscara del cacao (Barrios-Rodríguez et al., 2022; Belwal et al., 2022).

El fruto del cacao es una baya protegida en su exterior por la cáscara o pericarpio. Cuando maduran, pasan del tono verde al amarillo, y de rojo a uno anaranjado. Sin embargo, la forma y el color del fruto pueden variar entre los distintos grupos genéticos. En su interior se encuentran los

granos de aspecto ovalado, dispuestos en hileras alrededor de un eje central o placenta, rodeados de mucílago, una pulpa blanca agrídulce y mucilaginososa (Martínez et al., 2015; Perera et al., 2019; Compañía Nacional de Chocolate, 2021).

El pericarpio se compone de tres partes distintas: el epicarpio, que es carnosos y grueso, con una epidermis pigmentada y variable en dureza; un mesocarpio fino y duro, pero poco lignificado; y el endocarpio, que es carnosos y delgado, formado por grandes células tubulares con amplios espacios intercelulares que, al madurar las semillas, se colapsan formando la pulpa. Las semillas de cacao son ricas en diversos compuestos bioactivos como polifenoles y tocoferoles. Los flavanoles aportan al sabor amargo característico del cacao y al gusto del chocolate. Las epicatequinas, que representan el 35 % de los componentes fenólicos presentes. Además, contienen fitoesteroles y ácidos grasos, con un contenido de esteroles vegetales de 2 a 3 mg/g de grasa, principalmente  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol, variando según la variedad y la región de cultivo. La pulpa es rica en agua y nutrientes, contiene entre 10 y 15% de azúcar, tiene un pH de 3.6 a 4.0 y desempeña un papel crucial durante la fermentación de las semillas, contribuyendo al desarrollo del sabor (De Souza et al., 2018; Cerri et al., 2019).

## **Figura 2.**

*Mazorca de cacao.*



**Fuente:** Autoras.

La envoltura del cacao, que forma la mayor parte del fruto, tiene un grosor significativo destinado a proteger los granos que alberga. Se compone de metabolitos primarios como carbohidratos entre el 32 % y 47 %, incluyendo la pectina [6.6 %–12.6 %], cenizas que van desde el 6.4 % hasta el 8.4 %, y metabolitos secundarios como compuestos fenólicos con valores entre el 4.6 % y el 6.9 % (Loayza, 2020; Torres, 2023).

### **2.3.2. Variedades de cacao en el Ecuador**

Según Jean-Marie y colaboradores (2022) en 1882, Morris categorizó el cacao en dos grupos: Criollo y Forastero, con varias variedades de Forastero incluyendo Cundeamor verrugoso, Liso, Amelonado y Calabacillo. Diez años después, en 1892, Hart propuso una nueva clasificación con tres grupos y variedades diferentes: Forastero, Calabacillo y Criollo. En 1901, Preuss introdujo el grupo Trinitario, que surgió de la hibridación natural entre las variedades Criollo [previamente cultivada] y Forastero [importada], en Trinidad. Aunque la clasificación tradicional del cacao se ha basado en características morfológicas destacando la distinción entre Forastero, Criollo y Trinitario, desde 2008 se ha propuesto una nueva clasificación basada en criterios genéticos, que identifica 10 grupos: Marañón, Curaray, Criollo, Iquitos, Nanay, Contamana, Amelonado, Purus, Nacional y Guayana.

En Ecuador se cultiva cacao del tipo Nacional, también llamado "Fino de Aroma" o "Arriba" y del clon CCN-51 (Avadí, 2023). La variedad de cacao Colección Castro Naranjal 51 fue desarrollado mediante clonación por Homero Castro y se ha convertido en la alternativa más elegida por su baja inversión y riesgo de producción para el productor, pues ofrece mayor producción por unidad de superficie [2-2.5 t/ha], resistencia a enfermedades [monilla y escoba de bruja] y fluctuaciones climáticas, árboles manejables y frondosos, mazorcas de gran tamaño, inicio de producción al segundo año de siembra, alto contenido de grasa [54 %] en sus granos, y la

capacidad de desarrollar un sabor y aroma excepcional si se fermenta adecuadamente, alcanzando la misma calidad que el Nacional (GrandSur, 2021).

Se considera un tipo de cacao a granel u ordinario y se utiliza para elaborar chocolates de menor calidad en grandes volúmenes, principalmente en confitería, y productos como el cacao en polvo (Castillo-Orozco et al., 2023; Llerena et al., 2023). Uno de los factores que influye en la calidad del grano es el clon. En este sentido, Ramírez y colaboradores (2013) señalaron que los cruces entre clones de alta calidad garantizan la generación de granos de cacao finos o de calidad superior. Por otra parte, Nazario y colaboradores (2018) sostienen que los clones ICS-95 y TSH-1188 exhiben la mayor actividad antioxidante contra el radical 1-1-difenil-2-picrilhidrazilo [DPPH], mientras que los clones IMC-67 y CCN-51 no demuestran una actividad satisfactoria. Aunque, las características como el peso y las dimensiones del grano son heredadas genéticamente, tanto el clon como la ubicación son factores determinantes en aspectos físicos y químicos, tales como el índice del grano, el índice de la mazorca, la cantidad de cáscara, la grasa, la fibra y la proteína (Sukha et al., 2008).

La variedad Nacional es nativa, resalta por su alta demanda en los fabricantes de chocolate gracias al aroma y los sabores afrutados y florales de sus granos, utilizados habitualmente como cacao de primera calidad en productos gastronómicos (Erazo et al., 2023). La pulpa mucilaginosa que rodea los granos de cacao en el interior de la mazorca es más dulce que en la variedad CCN-51, esta característica favorece el proceso de fermentación y explica la apreciada calidad organoléptica de los granos fermentados (Vargas et al., 2016).

### **2.3.3. Biomasa lignocelulósica**

La biomasa lignocelulósica, conocida como lignocelulosa, emerge como una opción prometedora para reducir gradualmente la dependencia de los recursos fósiles finitos, asociados a

la emisión de gases de efecto invernadero por su gran demanda. La necesidad de cambio dirige la atención a recursos renovables, como la biomasa, que al ser la única fuente terrestre que combina carbono e hidrógeno en su estructura química, puede satisfacer las exigencias de energía, combustibles y productos químicos, acorde a los principios de sostenibilidad (Chávez, 2019). Este tipo de material realiza la fotosíntesis para convertir la energía solar en química, generando azúcares y O<sub>2</sub> como subproducto. Por ello, se le cataloga como una fuente de energía transformable y aprovechable con neutralidad de carbono, versatilidad como materia prima, amplia distribución geográfica y contribución al desarrollo socioeconómico (Vargas et al., 2021).

En particular, se hace referencia al término "carbono neutral" cuando las emisiones totales de carbono son equilibradas mediante la compensación o inmovilización de una cantidad igual de carbono a través de estrategias como los créditos de carbono, resultando en una producción neta de carbono igual a cero (Afanasjeva et al., 2017).

La biomasa suele ser una mezcla heterogénea de sustancias orgánicas derivadas del carbono, el hidrógeno y el oxígeno, junto con una pequeña fracción de compuestos inorgánicos, tal como se detalla en la tabla 1.

**Tabla 1.**

*Elementos químicos que constituyen la estructura básica de la biomasa lignocelulósica.*

<b>Elemento</b>	<b>Porcentaje en peso seco</b>
Carbono	30-60%
Oxígeno	30-40%
Hidrógeno	5-6%
Nitrógeno, Azufre, Cloro	< 1%

**Fuente:** (Kumar y col., 2018).

En general, cada año se generan cerca de 105 mil millones de toneladas de biomasa, de las cuales la mitad es terrestre y la otra mitad marina [por ejemplo, algas] (Fahmy et al., 2018). Por otra parte, unos 200 mil millones de toneladas de biomasa lignocelulósica se producen anualmente, lo que corresponde aproximadamente al 90 % de la producción mundial de material vegetativo. Adicionalmente, se estima que entre 8 mil y 200 mil millones de toneladas de masa lignocelulósica están a disposición para la elaboración de productos de interés biotecnológico. Se consideran residuos agrícolas (como paja de arroz, paja de trigo, rastrojo de maíz, bagazo, etc.), residuos forestales o madereros y residuos celulósicos [como el papel] (Ilić, et al., 2023).

Los elevados volúmenes de este residuo vegetal lo convierten en una materia prima sostenible a escala mundial, porque son ricos en azúcares que pueden ser convertidos en biocombustibles y productos especializados. La transformación viable de la biomasa se enfrenta a retos de eficiencia económica, compatibilidad medioambiental y responsabilidad social. Los retos relacionados con el suministro continuo de biomasa y las vías biológicas para su conversión en azúcares con un alto rendimiento no se han contemplado en los programas de investigación. A pesar de décadas de esfuerzos en la utilización de la biomasa, la producción integrada de biocombustibles y productos químicos sigue requiriendo una optimización de los aspectos técnicos y económicos (Singhvi & Gokhale, 2019).

#### **2.3.4. Composición de la biomasa lignocelulósica**

Desde el punto de vista composicional, la biomasa lignocelulósica se caracteriza por ser una matriz compleja compuesta principalmente de 3 polisacáridos que forman parte de las paredes celulares de las células vegetales, hallándose la celulosa rodeada por una estructura densa de hemicelulosa y lignina, con una pequeña cantidad de sólidos extractivos y cenizas (Wang et al., 2017). Estos componentes representan el 90 % de la materia seca de la biomasa terrestre. Según

su procedencia, la lignocelulosa puede clasificarse en tres categorías principales: madera blanda, madera dura y pasto. En realidad, la cantidad de lignina es mayor en la madera blanda, seguida de la madera dura y menor en los pastos (Korányi et al., 2020).

**Tabla 2.**

*Componentes principales de diversos materiales lignocelulósicos.*

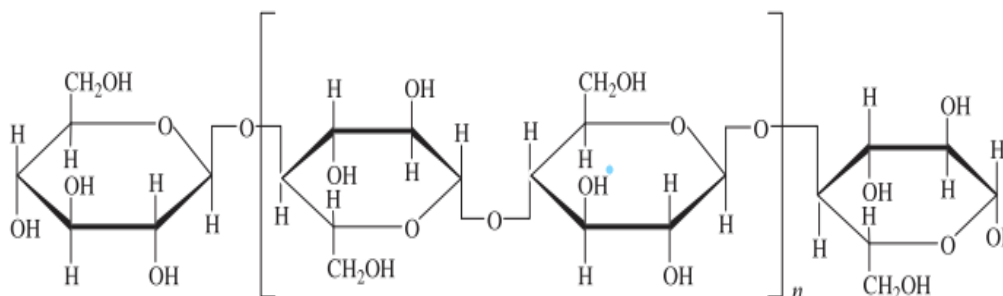
<b>Material</b>	<b>Celulosa (%)</b>	<b>Hemicelulosa (%)</b>	<b>Lignina (%)</b>
Madera blanda	45-50	25-35	25-35
Madera dura	45-53	24-40	18-25
Pastos o hierbas	25-40	25-50	10-30

**Fuente:** (Yousuf y col., 2020).

#### **2.3.4.1. Celulosa**

El homopolímero natural más abundante en la Tierra constituye un polisacárido compuesto por unidades de D-glucosa unidas mediante enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos. Esta sustancia desempeña un papel crucial como componente principal de las paredes celulares de las plantas, aunque su estructura varía dependiendo de la fuente. Aunque asociamos la celulosa principalmente con las plantas, también es sintetizada por algas, tunicados y ciertas bacterias. A nivel molecular, la celulosa se presenta en forma de fibras individuales agrupadas en microfibrillas, que se organizan después en fibras más grandes. Su estructura exhibe regiones cristalinas y amorfas, con diferentes orientaciones moleculares y redes de enlaces de hidrógeno que generan diversos polimorfos, como la celulosa I, II, III y IV. Los polimorfos presentan propiedades únicas, como hidrofiliidad, interacción con interfaces aceite/agua, resistencia mecánica, estabilidad térmica y morfología, lo que determina sus aplicaciones variadas en diferentes campos (Magagula et al., 2022).



**Figura 3.***Estructura química de la celulosa.***Fuente:** Alam y colaboradores (2014).

### 2.3.4.2. Hemicelulosa

Es heteropolímero, su estructura está formada por una mezcla de polisacáridos, las cadenas de sacáridos heterogéneas son cortas y ramificadas. La hemicelulosa está constituida por diferentes unidades monosacáridas, hexosas [ $\beta$ -D-glucosa,  $\beta$ -D-manosa y  $\beta$ -D-galactosa] y pentosas [ $\beta$ -D-xilosa y  $\alpha$ -L-arabinosa] en mayor cantidad, y otras azúcares [fructosa y ramnosa] en menores cantidades. También presenta ácidos urónicos, como ácido 4-O-metil-D-glucurónico, ácido D-glucurónico, ácido D-galacturónico y grupos acetilo (Lobo et al., 2021). Estos monómeros se asocian para formar estructuras de mayor complejidad, como el glucuronoxilano y el xiloglucano (Ramanathan et al., 2022).

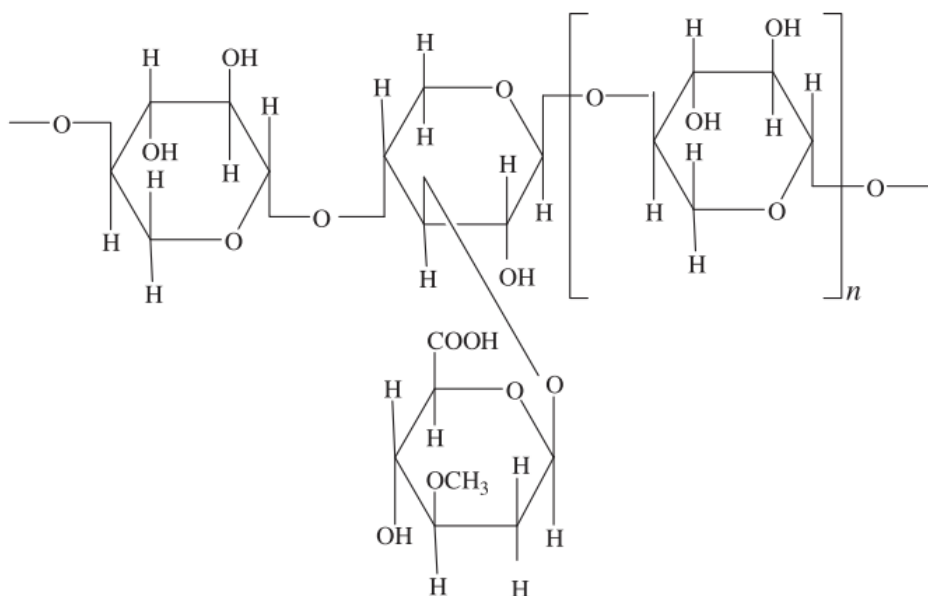
La hemicelulosa se encuentra estrechamente unida a la celulosa mediante enlaces de oxígeno-hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. Asimismo, forma enlaces covalentes con la lignina, creando así una conexión entre la celulosa y la lignina que aumenta la resistencia del material (Shrotri et al., 2017; Huang et al., 2021).

En contraste con la celulosa, presenta un menor grado de polimerización, oscilando entre 50 y 200 monómeros por molécula. Esta diferencia estructural también se refleja en la ausencia de

un estado cristalino altamente ordenado en la hemicelulosa, que exhibe una estructura amorfa. Como consecuencia, son muy solubles en ácidos y bases diluidos, a diferencia de las celulosas cristalinas (Ramanathan et al., 2022; Dutta & Yasmin, 2023).

#### Figura 4.

*Estructura química de la hemicelulosa.*



**Fuente:** Alam y colaboradores (2014).

#### 2.3.4.3. Lignina

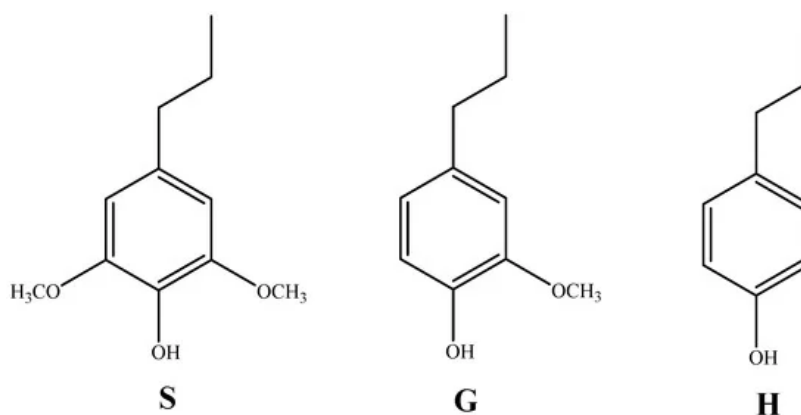
La lignina, una estructura compleja formada por polímeros reticulados, es crucial para la integridad estructural vegetal. La red molecular se compone de fenilpropanoides como los alcoholes p-cumarílicos, coniferílicos y siringílicos, que al polimerizarse originan distintas unidades de lignina: p-hidroxifenilo [H], guaiacilo [G] y siringilo [S], respectivamente. Estas unidades están unidas a través de enlaces éter C-O y C-C [principalmente enlaces  $\beta$ -O-4,  $\beta$ -5,  $\beta$ - $\beta$ , 5-5, 4-O-5,  $\beta$ -1 y  $\alpha$ -O-4], que representan el desafío principal en los procesos de separación de biomasa (Tocco et al., 2021; Mikulski & Kłosowski, 2022; Wu et al., 2023).

Las plantas no pueden descomponer la lignina, por lo que su síntesis está estrictamente controlada. Este proceso ocurre en los plastidios a través de la ruta del ácido shikimico, donde la fenilalanina se convierte en ácido cinámico, luego en ácido p-cumárico y finalmente en p-cumaril CoA. Esta molécula es punto de partida en dos rutas metabólicas: una produce alcohol p-cumarílico [lignina H], y la otra, más compleja, genera los monómeros específicos de la lignina, como ácido ferúlico, ácido sinápico, alcohol catequilo [lignina C], alcohol coniferílico [lignina G] y alcohol sinapílico [lignina S] (Maceda et al., 2022).

Este heteropolímero fenólico actúa como una barrera protectora para la permeabilidad de las plantas, brindando resistencia contra los ataques microbianos al ser insoluble en agua y funcionar como un adhesivo que conecta la celulosa y la hemicelulosa. A menudo considerada un residuo no deseado después del pretratamiento para extraer celulosa, la lignina se elimina mayormente mediante quema anual (Troncoso et al., 2023).

### Figura 5.

*Estructuras monoméricas de lignina.*



**Fuente:** Wu y colaboradores (2023).

La recalcitrancia de la lignocelulosa, una propiedad crucial relacionada con su compleja estructura y composición impide su hidrólisis de forma eficaz. Aunque las propiedades físicas y químicas de la celulosa, la hemicelulosa y la lignina influyen en este fenómeno, el mecanismo subyacente aún no se conoce del todo. Factores como la cristalinidad de la celulosa, la porosidad, el tamaño de las partículas y las características químicas afectan la recalcitrancia. La superficie accesible es esencial para la hidrólisis, siendo influenciada por la porosidad y tamaño de partículas. La hidrólisis enzimática se ve afectada por la cristalinidad y grado de polimerización de la celulosa, siendo más eficiente en regiones amorfas. La presencia de enlaces de hidrógeno y cadenas más largas limita la hidrólisis en las regiones cristalinas. El grado de polimerización reducido de las hemicelulosas no impacta en la hidrólisis, pero la presencia de grupos laterales complejos y las interacciones con la lignina limitan la accesibilidad de los biocatalizadores (Ilić et al., 2023).

### **2.3.5. Deslignificación**

La deslignificación emerge como un tratamiento clave que facilita la conversión de la fibra lignocelulósica en productos de alto valor, centrándose en romper las estructuras de lignina y hemicelulosa, y modificando la estructura cristalina de la celulosa para aumentar su parte amorfa. Esto a su vez mejora la vía de acceso a la biomasa para la hidrólisis enzimática, generándose monosacáridos fermentables. Al extraer hemicelulosas y lignina, los grupos hidroxilo de las cadenas celulósicas quedan expuestos, lo que promueve la formación de enlaces de hidrógeno adicionales entre ellas, incrementando así el porcentaje relativo de celulosa. El proceso considera variables como la química empleada [ácida o alcalina], el grado de deslignificación [concentración de la solución, temperatura y tiempo de duración] y la especie de madera utilizada [dura o blanda] (Jakob & Gindl-Altmutter, 2023).

Los métodos convencionales para degradar la biomasa lignocelulósica a menudo conllevan un elevado consumo de energía y el uso de sustancias potencialmente dañinas, como el cloro y los metales pesados que representan riesgos ambientales y contradicen los principios de la sostenibilidad. Por ello, se han desarrollado varias tecnologías para la eliminación de lignina, entre las que se incluyen el tratamiento alcalino, disolventes orgánicos, líquidos iónicos y tratamiento biológico. El tratamiento con álcali, a menudo combinado con oxidantes o métodos físicos, mejora la eficacia de la eliminación de lignina. Los tratamientos con disolventes orgánicos son reciclables mediante destilación. Aunque el tratamiento con líquidos iónicos muestra resultados prometedores en la eliminación de lignina con pérdida mínima de celulosa, su alto costo limita su adopción industrial. Por otro lado, el tratamiento biológico, sin agentes químicos, suele ser más prolongado que los tratamientos químicos, pero ofrece una alternativa sostenible (Liu et al., 2024).

La hidrólisis ácida diluida, en particular con ácido sulfúrico o ácido clorhídrico, es una manera efectiva y rentable de descomponer la biomasa lignocelulósica, que permite obtener hasta un 90 % de monosacáridos fermentables. Aunque este método es más rápido que la hidrólisis enzimática, bajo condiciones extremas, la lignina y ciertos azúcares se transforman parcialmente en fenoles, furanos o ácidos débiles, capaces de inhibir la fermentación al permanecer en el hidrolizado (Yaya et al., 2023).

### **2.3.6. Hidrólisis enzimática**

Después de un tratamiento previo adecuado, la hidrólisis convierte los polisacáridos en azúcares simples. La hidrólisis enzimática es preferible por su eficiencia, reducida formación de subproductos, menor corrosión y requerimientos energéticos. Se considera más ecológico debido a la biodegradabilidad de las enzimas y a sus condiciones de operación suaves, temperaturas de 45–55 °C y un pH de 4.5–5.5. En este proceso con elevada selectividad, las enzimas o un consorcio

de microorganismos actúan como biocatalizadores que previenen la degradación del azúcar, lo que mejora la eficiencia de conversión a etanol al contrarrestar la inhibición de la fermentación por parte de los inhibidores como el HMF y el furfural. Básicamente implica la ruptura de enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos en la celulosa para producir glucosa usando celulasas. Aunque las hemicelulosas son más susceptibles por su naturaleza amorfa y ramificada, la degradación requiere de xilanasas y enzimas accesorias por la variedad de enlaces en estructura (Haq et al.,2021; Amândio et al., 2023).

Los tratamientos enzimáticos se han demostrado más efectivos en comparación con los pretratamientos químicos. Tradicionalmente, se realizaban a baja consistencia de sustrato, pero investigaciones recientes sugieren que una alta consistencia puede mejorar la adsorción de enzimas, siendo también beneficioso económicamente. El impacto de las enzimas varía según su familia; algunas, como las de la familia GH45, actúan específicamente sobre la celulosa, reduciendo su grado de polimerización y generando un sustrato con alto volumen de microporos. Por otro lado, hidrolasas de las familias GH5 y GH7 actúan tanto en celulosa como en hemicelulosas. Adicionalmente, la presencia de moléculas de unión a carbohidratos [CBM] mejora la actividad enzimática a baja concentración, pero es despreciable o nociva si la concentración del sustrato es alta. (Hiltunen et al., 2024).

Los factores físicos que influyen en la hidrólisis enzimática de la celulosa son cruciales para comprender su descomposición. La cristalinidad, que indica la proporción de regiones cristalinas frente a amorfas en la celulosa, impacta la eficiencia de la hidrólisis; las zonas cristalinas exhiben una menor tasa de hidrólisis enzimática que las amorfas, aunque su influencia varía en función del sustrato. La dimensión de las partículas juega un papel decisivo ya que la reducción del tamaño potencia la afinidad entre la celulosa y las enzimas, haciendo más sencillo el proceso

de hidrólisis. Pero existe un umbral de tamaño específico para cada tipo de material. La superficie accesible es otro factor crítico, estrechamente ligado a la estructura porosa de la biomasa. Al reducir el tamaño de las partículas se facilita una mayor área para la acción enzimática. También, el volumen accesible, concretamente el tamaño de los poros es otro aspecto importante, cuya correlación con la hidrólisis varía con la biomasa y el pretratamiento. En los casos con un bajo contenido de lignina, el aumento del volumen de poros puede tener un efecto insignificante en la digestibilidad enzimática (Zoghlami & Paës, 2019).

### **2.3.7. Enzimas**

Las enzimas son proteínas de gran tamaño producidas por seres vivos, a excepción de la ribozima que es una ARNasa, y tienen la función de acelerar diversas reacciones bioquímicas dentro de los organismos. Son catalizadores altamente específicos, reducen la energía necesaria para iniciar las reacciones y operan eficazmente a presión atmosférica, necesitando condiciones más suaves para su actividad catalítica, lo que las convierte en herramientas muy útiles para diversas industrias (Ramesh et al., 2020).

La biocatálisis ofrece ventajas significativas comparadas con los métodos convencionales en la industria, como una mayor selectividad y especificidad en las reacciones, menores costos operativos y una reducción de toxicidad, lo que minimiza el impacto ambiental. Aunque muchas enzimas comerciales son activas y estables dentro de un rango limitado de condiciones, algunas pueden funcionar en entornos extremos, como altas temperaturas o pH extremos, así como en condiciones de baja actividad del agua, lo que ha transformado los procesos biotecnológicos. Se considera una alternativa más ecológica y sostenible al uso de químicos en la industria, ya que sus reacciones catalizadas son altamente específicas y generan pocos subproductos, que suelen ser de baja toxicidad. Para descomponer eficientemente la lignocelulósica materia vegetal, como la

celulosa y la hemicelulosa, que constituyen la mayoría de esta biomasa, se necesita un tratamiento previo para que las enzimas puedan acceder. Los tratamientos exitosos implican temperaturas superiores a 50 °C, las cuales modifican la estructura de la lignocelulosa y facilitan la penetración enzimática a través de la pared celular de la biomasa. La combinación de celulasa y xilanasa se ha demostrado como la más efectiva en este proceso, ya que ambas enzimas son altamente específicas, la separación de productos es casi completa y no se generan inhibidores de la fermentación (Mesbah, 2022).

#### **2.3.7.1. Complejo enzima-sustrato**

El complejo enzima-sustrato [ES] se forma cuando el sustrato se une a un lugar específico de la enzima. En este lugar, también llamado sitio activo, centro activo o sitio catalítico, la enzima actúa catalítica al interactuar con el sustrato. Aquí, el sustrato se coloca de modo que la región a modificar coincide con la región catalítica. La precisa conformación tridimensional del sitio activo, mantenida por la estructura de la enzima, es esencial para su función. Los aminoácidos presentes en el sitio activo, como aminocisteína, glutamato, lisina, entre otros, determinan la forma y la función de la enzima. Además, los enlaces no covalentes, como los de hidrógeno y las atracciones iónicas, mantienen unidos al sustrato y a la enzima, y durante la reacción se forman enlaces covalentes transitorios adicionales. Una vez que el sustrato se une, experimenta un cambio conformacional que facilita la formación del producto. En reacciones con múltiples sustratos, el sitio activo proporciona un ambiente propicio para cada uno, promoviendo la formación del estado de transición y aumentando la velocidad de la reacción (Blanco & Blanco, 2022).

Se postularon modelos para explicar el mecanismo de acción de las enzimas, como el de la cerradura y la llave, propuesto por Emil Fischer en 1894, que postula que la enzima y el sustrato tienen una configuración específica que encaja perfectamente entre sí. En cambio, el modelo de



ajuste inducido, planteado por Daniel Koshland 64 años más tarde, sugiere que la enzima posee flexibilidad para adaptarse al sustrato, lo que explicaría su elevada especificidad de acción (Juarez-Enriquez et al., 2022).

### 2.3.7.2. Cinética enzimática

La cinética enzimática describe el proceso en el cual una enzima se une a un sustrato para formar un complejo enzima-sustrato. Según Lewis y Piedra (2023) a medida que la concentración de sustrato aumenta, la velocidad de la reacción también aumenta hasta llegar a un máximo cuando todas las enzimas disponibles están saturadas con sustrato. Tras la formación del complejo ES, se produce la reacción química generando productos que se liberan de la enzima, permitiéndole iniciar otro ciclo de catálisis. Este equilibrio entre la formación y disociación del complejo determina la velocidad de la reacción enzimática.

La ecuación de Michaelis-Menten pretende ilustrar la relación entre los parámetros de una reacción enzimática. Se basa en dos premisas: en primer lugar, que el complejo enzima-sustrato [ES] está en equilibrio con la enzima libre y el sustrato en solución  $[E + S \rightleftharpoons ES]$  y, en segundo lugar, que la formación de este complejo es determinante para la obtención del producto  $[ES \rightarrow P + E]$ . Más tarde, Briggs y Haldane introdujeron un tercer postulado en 1925, el cual establece que la concentración del complejo [ES] es constante, es decir, que se mantiene en estado estacionario en donde la formación y la desintegración de ES se equilibran dinámicamente (Blackstock, 1989). A continuación, se expone la expresión matemática y las relaciones que abarca:

#### **Ecuación 1 Michaelis-Menten.**

$$V_0 = \frac{V_{max} \times \text{Concentración del sustrato } [S]}{\text{Concentración del sustrato } [S] + K_m}$$

1. Cuando la cantidad de sustrato es muy alta, es decir, mucho mayor que la constante de Michaelis-Menten [Km], la enzima alcanza su velocidad máxima [Vmax]. Esta velocidad máxima

representa la máxima capacidad de la enzima para convertir el sustrato en producto. Por lo tanto, concentraciones altas de sustrato son ideales para medir la actividad enzimática.

2. Cuando la velocidad de reacción es la mitad de  $V_{m\acute{a}x}$ , el valor de  $K_m$  es igual a la concentración de sustrato en ese punto. Este valor de  $K_m$  proporciona una medida aproximada de la afinidad de la enzima por un sustrato específico.

3. Si la concentración de sustrato es mucho menor que  $K_m$ , la ecuación se simplifica y la velocidad de reacción depende linealmente de la concentración de enzima total  $[Et]$  y de la concentración de sustrato  $[S]$ . La relación  $k_c/K_m$  proporciona una medida de la eficiencia catalítica general de la enzima para un sustrato particular, y se utiliza para comparar diferentes enzimas que actúan sobre el mismo sustrato (Bhagavan & Ha, 2015).

Hay que destacar que mientras la  $V_{m\acute{a}x}$  cambia con la cantidad total de enzima presente,  $K_m$  no depende de la concentración de enzima y es específico del sistema estudiado siendo útil para distinguir una enzima en particular (Palmer et al., 2011). Además, factores como la temperatura, el pH y la disponibilidad de sustrato y cofactores influyen significativamente en la actividad enzimática. El avance de la reacción puede ser monitoreado de manera continua mediante técnicas espectroscópicas o electroquímicas, proporcionando una visión completa del progreso. En definitiva, cuando las concentraciones de sustrato son lo suficientemente altas para saturar la enzima y garantizar su máxima velocidad, la velocidad de la reacción catalizada es proporcional a la concentración de la enzima. Bajo estas condiciones, esta velocidad puede considerarse como una medida de la cantidad de enzima activa presente (Boeckx et al., 2017).

### **2.3.8. Hidrolasas**

La Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular [IUBMB] ha clasificado las enzimas en seis clases dependiendo del tipo de reacción catalizada: oxidorreductasas, transferasas,

hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas. Hoy en día, las enzimas de procedencia microbiana son objeto de intensas investigaciones y aplicaciones científicas en diversos campos, especialmente los industriales (Ramesh et al., 2020).

Estas proteínas facilitan la ruptura hidrolítica de enlaces CO, CN, CC, PN, entre otros. Su función principal es catalizar la hidrólisis de enlaces químicos presentes en biomoléculas, dividiendo moléculas grandes en fragmentos más pequeños mediante la utilización de moléculas de agua como fuente de grupos hidroxilo. En resumen, desempeñan un papel esencial en el proceso de descomposición de moléculas grandes para la síntesis de biopolímeros y la eliminación de toxinas (Shukla et al., 2022).

Las hidrolasas son una clase diversa de enzimas, identificadas por su número de comisión enzimática EC3, que abarcan más de 1,200 variedades, clasificadas en 13 subclases según los enlaces específicos que escinden. Entre estas subclases se encuentran las glicosilasas o glucosidasas [EC3.2], que catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos en los azúcares complejos, es decir, hidrolizan azúcares. Estas enzimas son fundamentales en la hidrólisis de una variedad de sustratos, actuando sobre enlaces químicos con fuerzas y estabilidades variables (Sousa et al., 2015). No obstante, la rápida regeneración del sustrato en las hidrolasas desencadena que su actividad esté limitada por la selectividad y disponibilidad del sustrato, así como por posibles inhibiciones (Morisseau, et al., 2022).

#### **2.3.8.1. Celulasas**

Las celulasas y hemicelulasas están clasificadas dentro de las glucósidohidrolasas [GH], un conjunto diverso de enzimas que descomponen enlaces glicosídicos, con hasta 173 familias identificadas. Muchas de estas familias están particularmente implicadas en descomponer lignocelulosa, siendo las familias GH 5, 6, 7, 8, 12, 45 y 48 las que albergan la mayoría de las

celulasas fúngicas. La familia GH48 juega un papel crucial en la descomposición de la celulosa cristalina, principalmente a través de exocelulasas, que liberan celobiosa. Estas exocelulasas, también conocidas como celobiohidrolasas, colaboran estrechamente con endoglucanasas para mejorar la eficiencia en la degradación de la celulosa, y con  $\beta$ -glucosidasas para evitar la inhibición por retroalimentación (You et al., 2023). Además, estas enzimas de origen fúngico tienen dos componentes principales: un dominio catalítico que realiza la hidrólisis y dominios de unión a carbohidratos, responsables de adherir la enzima al sustrato (Singh et al., 2021).

Las enzimas pertenecientes a la familia GH emplean principalmente un mecanismo ácido-base para catalizar la ruptura de los enlaces glucosídicos en la celulosa. Este proceso implica dos residuos clave [un donante de protones y un nucleófilo] presentes en la región activa de la enzima. La hidrólisis puede ocurrir mediante un mecanismo de retención o inversión, dependiendo de la disposición espacial de estos residuos catalíticos (Raveendran et al., 2018). Se pueden identificar tres tipos principales de actividades enzimáticas en estos sistemas celulósicos:

- Las endoglucanasas [1,4- $\beta$ -D-glucano-4-glucanohidrolasa] actúan en las regiones amorfas de las fibras celulósicas, así como en celulosas sustituidas, carboximetilcelulosa [CMC] y la hidroxietilcelulosa [HEC] permitiendo la obtención de oligosacáridos con longitud variable.
- Las exoglucanasas o celobiohidrolasas [1,4- $\beta$ -D-glucanocelobiohidrolasa] ejercen su acción sobre el extremo no reductor o reductor de la celulosa a fin de que se liberen disacáridos de celobiosa.
- Las  $\beta$ -glucosidasas fragmentan la celobiosa y otros oligosacáridos solubles en monómeros de glucosa.

Estos sistemas enzimáticos cooperan en la degradación de la celulosa en glucosa. Las celulasas se destacan por su capacidad de hidrolizar las uniones  $\beta$ -1,4-glucosídicas. La acción comienza con la endoglucanasa, que ataca la región amorfa de la celulosa, seguida por la celobiohidrolasa que convierte la celulosa en celobiosa. Finalmente, la celobiosa se descompone en glucosa mediante la acción de la  $\beta$ -glucosidasa, que también puede degradar algunos celooligosacáridos en celobiosa y glucosa (Castillo, 2005; Mrudula & Murugammal, 2011).

### **2.3.8.2. Aplicaciones de las celulasas**

La celulasa, una enzima que viene utilizándose en distintos campos comerciales desde hace más de tres décadas, sigue siendo punto de interés tanto de la investigación académica como de la industria, llegando a convertirse en la tercera enzima más apreciada del mercado mundial (Yu et al., 2022).

Entre sus diversas aplicaciones, destaca su papel en la producción de biocombustibles y biorrefinerías, donde propicia la conversión de biomasa lignocelulósica en bioetanol, contribuyendo a políticas de uso de biomasa renovable. En las industrias de papel y pulpa, permite optimizar la fabricación de pulpa bioquímica, ahorrando energía y mejorando propiedades del papel. La industria textil y de detergentes la emplea para el biostoneing de jeans, el tratamiento de telas y el potenciamiento de la eficacia de los detergentes en la ropa. En la alimentación animal, la enzima aumenta la calidad nutricional de los piensos al desintegrar compuestos antinutricionales. De igual modo, la versatilidad de estos biocatalizadores se aprovecha en la industria alimentaria para mejorar la producción y el procesamiento de alimentos, por ejemplo, en la producción de vino, la extracción de aceite de oliva, carotenoides y compuestos fenólicos, así como en la clarificación de zumos de frutas y otros procesos alimentarios (Ejaz et al., 2021).

### 2.3.9. Enzimas comerciales

Los microorganismos, bacterias y hongos, son excelentes candidatos para la bioproducción de enzimas celulolíticas, porque reciclan la celulosa presente en la biosfera. Sin embargo, las especies fúngicas de naturaleza filamentosa dominan este escenario debido a su capacidad de penetración y versatilidad de utilización del sustrato (Srivastava et al., 2018; Lübeck & Lübeck; 2022). De forma natural, producen y secretan estas enzimas extracelulares para degradar materiales celulósicos de la biomasa vegetal e inclusive la estructura de la enzima resultante es más adecuada y posibilita el aumento de la eficiencia en la descomposición enzimática (Naher et al., 2021; Yu et al., 2022). Los géneros *Penicillium*, *Trichoderma* y *Aspergillus* son reconocidos como modelos idóneos para la producción de celulasas desde el laboratorio hasta la escala industrial (De França Passos et al., 2018). En las preparaciones industriales, se comprende de una mezcla de glucósidos hidrolasas [GH] y otras proteínas accesorias necesarias para trabajar sinérgicamente con las celulasas (Li et al., 2020).

Algunas de las principales compañías dedicadas a la fabricación de celulasas a escala comercial incluyen a Novozymes, Genencor-Danisco, DuPont, Dyadic, Quest Intl., y BASF. Aquellas ofrecen productos como Cellulyve 50L, Cellic CTec2 (cóctel enzimático), Viscozyme L, GC220, GC440, GC880, Cellulase 2000L, Cellubrix (Celluclast), Accellerase® 1500, AlternaFuel® CMAX™, Onozuka, Carezyme, FiberCare®, entre otros (Kuhad et al., 2016; Bhardwaj, et al., 2021; Ranjan et al., 2023). El mercado de celulasas tiene un alcance global, con un enfoque destacado en varias regiones como Asia Pacífico, Europa, América Latina y América del Norte. La creciente producción de biocombustibles en América del Norte y América Latina ha posicionado a estas regiones como líderes del mercado (Transparency Market Research, 2021).

### **2.3.9.1. Carezyme 1000L**

El producto Carezyme® 1000L, con la designación EC3.2.1.4, es fabricado por Sigma-Aldrich y distribuido por Espectrocrom en Ecuador. Se trata de una solución acuosa de celulasas procedentes de *Aspergillus* sp. Estas enzimas fragmentan la celulosa por hidrólisis de los enlaces 1,4- $\beta$ -D-glucósidos en sus regiones internas, lo que da lugar a la formación de moléculas más pequeñas llamadas oligosacáridos. Por lo tanto, se reconocen como endo-1,4- $\beta$ -D-glucanasas (Sigma-Aldrich, 2024).

### **2.3.9.2. Cellic CTec2**

Cellic CTec2 es una mezcla enzimática innovadora que combina celulasas,  $\beta$ -glucosidasas y hemicelulasas. Este producto resulta efectivo en una extensa gama de materiales lignocelulósicos pretratados, lo que permite la transformación de las estructuras complejas de carbohidratos en azúcares simples fermentables (Sigma-Aldrich, 2024).

### **2.3.10. Azúcares reductores**

A nivel estructural, los azúcares con un grupo aldehído [-CHO] o cetona [-CO-] sin enlaces formados en los carbonos 1 o 2 se conocen como reductores, ya que les permiten reaccionar con otras moléculas en los ensayos de Fehling y Benedict, arrojando resultados en positivo. A pesar de que la fructosa es originalmente una cetosa, en condiciones de alcalinidad y calor se transforma en una aldosa, como glucosa y manosa. Por ello, todos los monosacáridos son considerados azúcares reductores, mientras que los disacáridos pueden ser clasificados como reductores o no, dependiendo de la presencia o ausencia de estos grupos funcionales libres. Por ejemplo, la sacarosa es un azúcar no reductor y primero debe hidrolizarse a sus monómeros, glucosa y fructosa antes de realizar una prueba cualitativa (Considine & Frankish, 2014; Jain et al., 2021).

### 2.3.11. Grados Brix

La medida de la concentración de sólidos disueltos en una solución se expresa en grados Brix [ $^{\circ}\text{Bx}$ ], nombrados en honor a su creador, el alemán Adolf Ferdinand Wenceslaus Brix. Un grado Brix correspondería a 1 gramo de sacarosa presente en cada 100 gramos de solución. Este parámetro puede variar entre 1 a 100 siendo crucial para determinar el contenido de azúcar de las soluciones azucaradas. Los equipos más comunes para la medición de Brix son los hidrómetros y los refractómetros (Elewa et al., 2022).

Un refractómetro es un instrumento óptico sencillo diseñado para medir el índice de refracción [RI] de sustancias transparentes en forma líquida o sólida. Se utiliza para la evaluación de la pureza de una muestra y la determinación de la concentración de sustancias disueltas en ella (Elewa et al., 2020).

El RI se define como la relación entre la velocidad de la luz en el vacío y la velocidad de la luz en el medio en cuestión, y varía según la longitud de onda de la luz y la temperatura del líquido analizado. Se fundamenta en la reflexión crítica de la luz, mide el grado de refracción de la luz que atraviesa el líquido desde el aire, dando la impresión de "difracción" cuya intensidad se basa en la cantidad de sustancia disuelta en el fluido. Por consiguiente, este índice dependerá de la concentración de la solución, de modo que, al aumentar la concentración de azúcar, aumenta el valor Brix y el índice de refracción y, por ende, el ángulo crítico. Además, la medición del RI en base a ángulos críticos es más conveniente, ya que no se ve afectada por el color de la muestra líquida o los sólidos suspendidos en ella. Para garantizar su precisión, estos dispositivos deben calibrarse previamente usando el tornillo de calibración y agua destilada para regular la temperatura; y algunos modelos llevan incorporado un termómetro de compensación (Dongare et al., 2015; Jaywant, et al., 2022).



### **2.3.12. Determinación de la presencia de azúcares reductores**

#### **2.3.12.1. Prueba de Fehling**

Es un análisis cualitativo específico para la detección de azúcares reductores en una solución dada, distinguiendo los aldehídos de las cetonas (Katoch, 2011). El reactivo Fehling se compone de dos tipos de solución: Fehling A es una solución acuosa azul de sulfato cúprico, mientras que Fehling B es una solución clara compuesta de tartrato acuoso de sodio y potasio [Na-K-tartrato] en álcali fuerte [NaOH] que actúa como agente quelante. Se mezclan volúmenes iguales de las soluciones Fehling A y B para lograr la solución Fehling final antes de la valoración (Guo et al., 2014).

La presencia de azúcares reductores se detecta mediante la formación de precipitados con diferentes tonalidades, que pueden variar entre verde oscuro, amarillo anaranjado o rojo ladrillo, dependiendo de la concentración de azúcares en la muestra. El método se basa en la reacción de un carbonilo de aldehído [-CHO] con el sulfato cúprico [CuSO<sub>4</sub>] del reactivo que desencadena un proceso redox donde grupo aldehído [-CHO] se oxida a ácido carboxílico [-COOH] y el ion cúprico [Cu<sup>2+</sup>] se reduce a ion cuproso [Cu<sup>+</sup>], precipitando como óxido cuproso [Cu<sub>2</sub>O] de color rojo ladrillo. Cuántos más grupos aldehído haya, mayor será la cantidad de depósitos rojo ladrillo que se producirán. Cuántos más grupos aldehído haya, más depósitos de color rojo ladrillo se producirán. En síntesis, se origina un cambio de color en la solución provocado por la disminución del ion cúprico de color azul y su reacción con el aldehído, lo cual forma el precipitado de aspecto característico (Ngamput & Herrani, 2019).

#### **2.3.13. Cuantificación de azúcares reductores por espectrofotometría UV-visible**

La espectrofotometría UV-vis difiere de la espectroscopia IR en las longitudes de onda de excitación y el tipo de transiciones que experimentan las moléculas. En la primera se producen

transiciones electrónicas en la región ultravioleta visible, mientras que en la segunda se producen transiciones vibratorias en la región infrarroja (Wang & Chu, 2013).

Esta técnica analítica sensible y no destructiva evalúa la absorbancia de las muestras a una longitud de onda precisa, para ello utiliza una fuente de luz en el rango de longitud de onda ultravioleta de 200 a 400 nm y en el rango de longitud de onda visible de 400 a 700 nm. La interacción entre dicha fuente de luz y un material óptico puede medirse por absorción, transmisión o reflexión en la región espectral UV-Vis (Munjanja & Sanganyado, 2016; Thambiratnam et al., 2020).

Dentro de ciertos límites, la absorbancia está directamente relacionada con la concentración del analito a determinar y la distancia que recorre la luz a través de la muestra durante la irradiación (Passos & Saraiva, 2019). Esta relación lineal entre la absorbancia y la concentración del absorbente en la espectroscopia UV-vis hace que sea atractiva para mediciones cuantitativas (Mallakpour & Azimi, 2020).

Su fundamento radica en la medición de las transiciones electrónicas del estado elemental al estado excitado de una molécula tras la absorción de ondas electromagnéticas en la región ultravioleta y visible. De esta manera, las moléculas o iones que contienen electrones  $\pi$  y electrones no enlazantes [electrones  $n$ ] pueden absorber energía en forma de ondas UV-Vis para excitar esos electrones a orbitales moleculares superiores antienlazantes. Cuanto más fácil es la excitación de los electrones, mayor será la longitud de onda de la luz que puede ser absorbida (Oluwafemi et al., 2021; Ke & Wan, 2022). Entonces, si una muestra absorbe luz en el rango ultravioleta y visible, sus moléculas experimentan un cambio en su estado electrónico gracias a la excitación de electrones de niveles de energía más bajos a niveles de energía más altos. En las moléculas orgánicas, solo algunos grupos funcionales conocidos como cromóforos [especies absorbentes]

poseen electrones de valencia de baja energía de excitación pueden asimilar la radiación ultravioleta y visible (Pentassuglia et al., 2018; Rakhee et al., 2018).

#### **2.3.13.1. Método DNS**

El ácido 3,5-dinitrosalicílico [DNS] representa un método colorimétrico destinado a estimar o determinar la concentración de azúcares reductores. Su fundamento reside en la detección del grupo carbonilo libre [C=O] de los azúcares reductores, que implica la oxidación del grupo funcional aldehído de la glucosa y del grupo funcional cetona de la fructosa. En condiciones alcalinas, el ácido 3, 5-dinitrosalicílico de aspecto amarillento se reduce a ácido 3, 5-amino-5-nitrosalicílico de color rojo anaranjado durante la reacción (Jain et al., 2020).

Sus mayores problemas están asociados a las interferencias químicas y al hecho de que varios factores pueden influir en la formación del ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, como la presencia de diversos azúcares y productos de degradación de los azúcares, aldehídos, aminoácidos, entre otros. A pesar de haber sido adaptado para medir mezclas de azúcares reductores, como pentosas, hexosas y oligosacáridos, especialmente aquellos derivados de la hidrólisis de biomasa lignocelulósica, sigue presentando limitaciones en su capacidad para ofrecer una cuantificación con precisión de un solo azúcar en las mezclas, debido a las variaciones en la intensidad del color generadas por los distintos azúcares reductores. Durante el pretratamiento de biomasa lignocelulósica, se producen subproductos como furfural y 5-hidroximetilfurfural [-HMF] que pueden interactuar con el reactivo DNS porque tienen un grupo carbonilo libre, resultando en una estimación inexacta de la concentración de azúcares reductores (Deshavath et al., 2020)

El método DNS puede sobrevalorar la concentración de azúcares, sales como cloruro de calcio, sulfato de manganeso y cobalto en el tampón pueden aumentar la absorción del método. El volumen de reacción, el tiempo de incubación y la medición de longitudes de onda también pueden

influir en los resultados (Božinović et al., 2023). Con frecuencia, la concentración de azúcares reductores se expresa como una representación del total de monosacáridos presentes, utilizando estándares de glucosa como referencia. Por este motivo, el método DNS sólo puede brindar una lectura "relativa" de la cantidad de azúcares reductores producidos en la hidrólisis (Marsden et al., 1982).

## **CAPÍTULO 3**

### **METODOLOGÍA**

#### **3.1. Nivel de investigación**

La metodología del presente trabajo es de nivel explicativa, debido a que no existen investigaciones en donde se comparen dos tipos de enzimas comerciales Carezyme 1000L y Cellic CTec2 en procesos de hidrólisis. El estudio se fundamenta en el método cuantitativo científico, que implica recolectar y analizar los datos obtenidos en el estudio. Esto ayudará a concluir la pregunta de investigación planteada al determinar la enzima comercial más efectiva para obtener azúcares reductores en la cáscara de cacao.

#### **3.2. Diseño de investigación**

Este proyecto se realiza experimentalmente, basándose en una investigación bibliográfica obtenida de distintas fuentes como revistas, artículos científicos y proyectos de titulación, de las cuales se reunieron las condiciones necesarias para varias etapas del proceso. Además, es de naturaleza experimental pura, ya que se van a controlar todas las variables que pueden alterar el proceso.

#### **3.3. Variables**

##### **3.3.1. Independientes**

Enzimas [Carezyme 1000L y Cellic CTec2]

##### **3.3.2. Dependientes**

Azúcares reductores

##### **3.3.3. Intervinientes**

- Tamaño de la partícula [ayuda a la actividad de la enzima]
- Temperatura del laboratorio

- pH
- Contenido de lignocelulosa en la cáscara de cacao
- Agitación
- Tiempo de reacción

#### **3.3.4. Extrañas**

- Daño del equipo U-Visible
- Pérdida de la materia prima [sustrato]
- Condiciones climáticas
- Estado de salud del investigador

#### **3.4. Diseño del experimento**

Para este proyecto se utiliza un Diseño Completamente al Azar [DCA] y se basa en el modelo estadístico de Análisis de Varianza de un Factor o una Vía. Este modelo es de tipo comparativo; el mismo que consta de un solo factor o variable independiente, la cual se define como el tipo de enzima [Fi] y dos variables dependientes o variables de respuesta que es la cantidad de azúcares reductores obtenidos en ppm y grados Brix [°Bx]. El factor independiente está compuesto a su vez de dos niveles en los cuales varia la enzima a utilizar [Carezyme 1000L o Cellic CTec2], se realizarán 5 réplicas dando como resultado 10 unidades experimentales.

#### **3.5. Unidad experimental**

Para el desarrollo del proyecto, se lleva a cabo con 10 unidades experimentales. Cada unidad experimental está compuesta por un matraz de 50 mL, con 2.5 g de biomasa pretratada, 25 mL de tampón acetato 50 Mm. Se realiza a pH 8.5 con 3 mL de Carezyme 1000L y a pH 5 con 1.7 mL de Cellic CTec2 a una temperatura de 50 °C con una agitación de 150 rpm durante 72 horas.

#### **3.6. Técnicas empleadas**

### **3.6.1. Técnicas e instrumentos de recolección de datos**

Las técnicas que se utilizan en este estudio son de tipo documental, ya que se fundamenta en textos almacenados en bases de datos digitales como Repositorios Universitarios, Elsevier y Scielo. La parte práctica del proyecto se evidencia mediante la técnica de observación no estructurada al emplear equipos como Espectroscopía UV-visible. La información se recopila en el software del equipo que posteriormente se almacena en una memoria USB.

### **3.6.2. Técnicas de análisis y procesamiento de datos**

Para el procesamiento de datos, se emplean gráficos y tablas con el fin de facilitar la interpretación de los resultados, utilizando los programas Statgraphics y Microsoft Excel. El análisis estadístico incluye la aplicación de la prueba de normalidad para evaluar la distribución de los datos. Dependiendo de los resultados de esta prueba, se determina si los datos siguen una distribución normal, lo que permite llevar a cabo el análisis de varianza ANOVA. Si los datos no siguen una distribución normal, se recurre a pruebas no paramétricas como Krustal-Wallis.

## **3.7. Materiales, equipos y reactivos**

### **3.7.1. Sustrato**

Las mazorcas provenientes de la variedad de cacao CCN-51 fueron recolectadas de una plantación de cacao ubicada en la parroquia San Carlos, perteneciente al cantón Naranjal de la provincia del Guayas, con coordenadas  $-2.5206170756320567$ ,  $-79.46262696171244$  [FGHP+QW5 Jesús María]. Durante la fase de recolección, se considera la evaluación del estado de madurez del material para garantizar la homogeneidad de la cosecha. Además, la porción superior como inferior de la mazorca no fueron consideradas para esta investigación.

**Figura 6.***Recolección de las mazorcas de cacao.***Fuente:** Autoras.**Tabla 3.***Materiales, equipos y reactivos utilizados durante la fase experimental.*

<b>Materiales</b>	<b>Equipos</b>	<b>Reactivos</b>
Vidrio de reloj	Estufa	Alcohol 96%
Tamiz # 8, 18, 20, 25, 35 y 40	Molino CORONA Molino mecánico	Agua destilada Ácido Sulfúrico
Crisoles	Tamizador vibratorio	Ácido acético glacial
Desecador	Analizador de humedad	Clorito de sodio
Vasos de precipitación (100mL, 250mL, 600mL, 1000mL)	HB43-3 halogen Mufla Soxhlet	Hidróxido de sodio Hidróxido de potasio Acetato de sodio
Matraz (50mL, 100mL, 500mL)	Baño maría Placa calefactora	DNS Fehling A y B
Kitasato (1000 ml)	Bomba para filtrar al vacío	



---

Pipetas volumétricas (1 ml, 5 ml, 10 ml)	Agitador orbital
Micropipeta de 1000 ul	Refractómetro
Tubos de ensayo	Medidor de pH
Tubos volumétricos	
Papel filtro	
Espátula	

---

**Fuente:** Autoras.

### **3.8. Protocolo a implementar**

Este proyecto se desarrolla empleando métodos teóricos de consultas bibliográficas, para posteriormente aplicarlos mediante métodos empíricos en la fase experimental.

#### **3.8.1. Acondicionamiento de la muestra**

Para que el sustrato sea apto para el proceso de hidrólisis enzimática, debe someterse a los siguientes tratamientos que se describen a continuación.

##### **3.8.1.1. Lavado de Cáscaras**

Después de su recolección, las cáscaras se lavan con agua para eliminar residuos que se generan al momento de la cosecha, como granos pequeños de cacao, insectos, hojas, entre otros. Posteriormente, las cáscaras se extienden sobre una bandeja y se exponen al ambiente durante 40 horas, volteándolas cada 6 horas para asegurar un proceso óptimo.

**Figura 7.**

*Lavado de las cáscaras de cacao.*



**Fuente:** Autoras.

### 3.8.1.2. Secado

Las cáscaras se cortan en trozos pequeños de 5 cm de lado para asegurar un proceso de secado más uniforme. Posteriormente, se colocan en una estufa marca BIOBASE a 85°C durante 60 horas, distribuyendo el material de manera uniforme en las bandejas para garantizar un secado homogéneo.

**Figura 8.**

*Secado de las cáscaras de cacao en la estufa.*



**Fuente:** Autoras.

### 3.8.1.3. Molienda

La disminución del tamaño de las cáscaras se logra mediante la intervención de dos equipos: primero se pasan las cáscaras secas por un molino manual de la marca CORONA en el cual las partículas alcanzan un tamaño de 3 mm, posteriormente, se procesa en un molino de corte mecánico con malla de 0.5 mm.

#### *Figura 9.*

*Molienda manual y mecánica de las cáscaras de cacao.*



**Fuente:** Autoras.

### 3.8.1.4. Tamizado

Para este proceso, se utilizó un tamizador vibratorio con tamices de diferentes tamaños [#8, 18, 20, 25, 35 y 40] durante 10 minutos, con el objetivo de obtener específicamente el diámetro correspondiente del tamiz #40 de la marca USA ADVANTAJE STANDARD TESTING SHIEVE de 425  $\mu\text{m}$ . Una vez tamizado, el material se almacena y etiqueta en bolsas plásticas con cierre hermético para su conservación hasta su posterior uso.

**Figura 10.**

*Tamizaje del material triturado en el molino manual y mecánico.*



**Fuente:** Autoras.

### **3.8.2. Caracterización de la materia prima**

La caracterización de la composición química de la biomasa lignocelulósica se lleva a cabo en el laboratorio de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana. Para asegurar la fiabilidad de los resultados, este proceso se realiza por triplicado permitiendo así obtener datos consistentes y representativos que respaldan el estudio de las propiedades y componentes de la materia prima en cuestión.

#### **3.8.2.1. Contenido de humedad**

El análisis de humedad se realiza utilizando el analizador de humedad HB43-S halogen de Mettler Toledo, un equipo que permite determinar con precisión los niveles de humedad en diversas muestras.



$PM_f$  Peso crisol con muestra calcinada [g]

**Figura 12.**

*Determinación del contenido de cenizas en el material.*



**3.8.2.3. Eliminación de extraíbles**

Este método determina la cantidad de material no volátil soluble en solventes polares, utilizando agua y etanol. Se realiza según la norma NREL/TP; 510-42619. El procedimiento consiste en pesar 12 g de muestra seca y colocarla en un cartucho hecho de papel filtro, el cual se introduce en el equipo Soxhlet. A continuación, se miden 300 mL de agua destilada y se vierten en un matraz de extracción. Luego, se conecta el matraz al aparato de extracción y se ajusta la temperatura para mantener el líquido en ebullición durante 4 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se repite el proceso utilizando 300 mL de etanol al 96 % como solvente. Culminadas las extracciones, se retira el cartucho, se lava con agua destilada para eliminar restos de solvente y se coloca en una cápsula de porcelana previamente secada. Finalmente, se lleva a una estufa a  $105 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta conseguir un peso constante.

El contenido de extraíbles se realiza mediante la siguiente ecuación:

**Ecuación 3** *Contenido de extraíbles.*

$$\%Extraíbles = \frac{PM_i - PM_f}{PM_i} \times 100$$

En donde:

$PM_f$     Peso de la muestra seca sin extraíbles                    [g]

$PM_i$     Peso inicial de la muestra    [g]

**Figura 13.**

*Eliminación de los compuestos extraíbles usando el Soxhlet.*



**Fuente:** Autoras.

**3.8.2.4.    Contenido de lignina**

Este método se basa en la norma TAPPI T-222 OM-02. En este procedimiento, se comienza pesando 1 g de muestra libre de extraíbles y se coloca en un vaso de precipitación. A continuación, se agrega gradualmente 15 mL de  $H_2SO_4$  al 72 %, manteniendo el vaso en un baño frío a  $2 \pm 1$  °C durante la dispersión. Luego, se cubre el vaso con una luna de reloj y se coloca en un baño María a 20 °C, agitando la muestra con frecuencia durante 2 horas. Después de este tiempo, el material se transfiere a un vaso de 600 mL, se diluye y se enjuaga con agua destilada hasta alcanzar un volumen final de 370 mL, con el objetivo de obtener una concentración de  $H_2SO_4$  al 3 %. A continuación, la solución se hierve durante 4 horas, manteniendo el volumen constante mediante la adición frecuente de agua caliente. Luego, la lignina se deja sedimentar en una posición

inclinada y, sin agitar el precipitado, se procede a filtrar y lavar el residuo sólido con agua destilada caliente. Finalmente, el filtro con la lignina se traslada a una cápsula de porcelana previamente secada y se coloca en una estufa a  $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta alcanzar un peso constante.

El contenido de lignina se realiza mediante la siguiente ecuación:

**Ecuación 4** *Contenido de lignina.*

$$\%Lignina = \frac{PM_f}{PM_i} \times 100$$

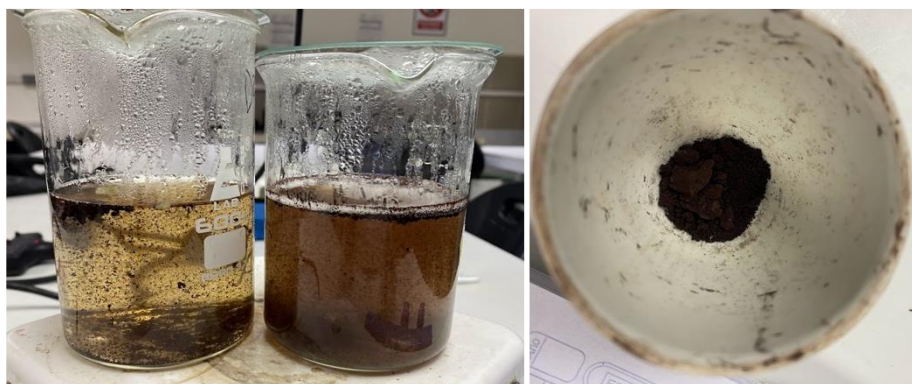
En donde:

$PM_f$     Peso de la muestra seca            [g]

$PM_i$     Peso inicial de la muestra, sin    [g]  
extraíbles

**Figura 14.**

*Determinación del contenido de lignina en el material.*



**Fuente:** Autoras.

### 3.8.2.5. Contenido de holocelulosa

Este método adoptado se sustenta en la directriz proporcionada por la normativa ASTM 1104-56. Antes de iniciar el análisis, los crisoles vacíos se lavan y se secan hasta que alcancen constancia en el peso. Entonces, se añade 4 g de muestra a un vaso de precipitación de 600 mL y se trata con 300 mL de agua destilada, 0.4 mL de ácido acético glacial y 2 g de clorito de sodio. En



seguida, el vaso de precipitación se coloca a 75°C en un equipo de baño María durante 1 hora, repitiendo esta operación tres veces más hasta que se obtenga una muestra de color blanquecino. Una vez que se logra el blanqueamiento de la muestra, se le coloca en un baño de hielo a 10°C, seguido de una centrifugación a 3500 rpm a lo largo de 15 minutos. El líquido sobrenadante se desecha y se efectúa un lavado del sólido con agua destilada mediante un sistema de filtrado al vacío. Para obtener el peso final de la muestra tratada, se coloca en un crisol y se deja a una temperatura de 105°C en una estufa por 4 horas. Más tarde, se coloca en un desecador para enfriarla y evitar la absorción de humedad del ambiente, registrando seguidamente su peso. Este paso se repite hasta alcanzar un peso constante.

Por último, el contenido de holocelulosa se determina aplicando la siguiente ecuación:

**Ecuación 5** *Contenido de holocelulosa.*

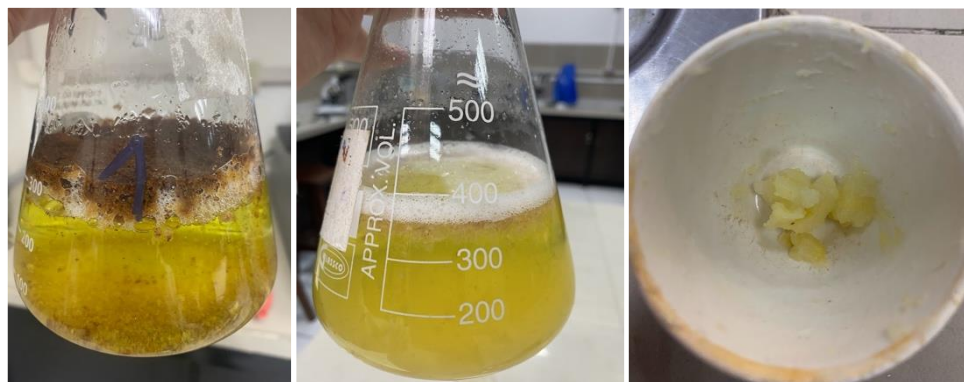
$$\%Holocelulosa = \frac{PM_f}{PM_i} \times 100$$

En donde:

$PM_f$	Peso de la muestra seca finalizado el tratamiento	[g]
$PM_i$	Peso de la muestra original previo al tratamiento	[g]

**Figura 15.**

*Determinación del contenido de holocelulosa en el material.*



**Fuente:** Autoras.

**3.8.2.6. Contenido de  $\alpha$ -celulosa**

La ejecución de este método se respalda en la norma TAPPI T-203 M-58. El procedimiento inicia al depositar 2 g de la muestra recolectada de holocelulosa en un vaso de precipitación de 50 mL que contiene 10 mL de NaOH al 17.5 %, permitiéndole reposar durante un lapso de 5 minutos. Tras este periodo, se adicionan 5 mL de NaOH al 17.5 %, con un tiempo de reposo de 30 minutos. Posteriormente, se introduce 30 mL de agua destilada en la mezcla y se deja en reposo durante 1 hora. Luego, se lava con agua destilada y NaOH al 17.5 % en proporción de [30:25], usando un sistema de filtrado al vacío. Después, se incorpora 5 mL de ácido acético al 10 % y se procede con un lavado adicional de 50 mL de agua destilada bajo filtración al vacío. La muestra se somete a un período de 12 horas en una estufa a 105°C, se deseca y se pesa hasta alcanzar un peso constante. El peso final de la muestra se determina mediante la diferencia entre el peso del crisol con la muestra tratada y el peso de los crisoles secos y vacíos. A continuación, se proporciona la ecuación correspondiente.

**Ecuación 6** *Contenido de celulosa.*

$$\%Celulosa = \frac{PM_f}{PM_i} \times 100$$

En donde:

$PM_f$  Peso de la muestra seca [g]  
después del tratamiento

$PM_i$  Peso inicial de la muestra [g]  
antes del tratamiento

**Figura 16.**

*Determinación del contenido de celulosa en el material.*



**Fuente:** Autoras.

**3.8.2.7. Contenido de hemicelulosa**

La hemicelulosa se cuantifica sustrayendo el porcentaje de celulosa del porcentaje de holocelulosa obtenidos experimentalmente. Se calcula mediante la siguiente ecuación:

**Ecuación 7** *Contenido de hemicelulosa.*

$$\%Hemicelulosa = \%Holocelulosa - \%Celulosa$$

### 3.8.3. Deslignificación

El proceso descrito se basa en la metodología propuesta por Ouattara y colaboradores (2022) el cual consiste en colocar 9.20 g de muestra en un vaso de precipitación de 500 mL con 100 mL de KOH al 1 %, durante 4 horas a una temperatura de 30°C. Posteriormente, el vaso ingresa en la estufa a una temperatura de 160°C durante 30 minutos. Una vez completado el proceso el sustrato se separa del hidrolizado mediante filtración y se lava con agua destilada hasta que su pH sea neutro. Finalmente, el sustrato se deja secar en una estufa a 105°C durante 6 horas y se almacena para su posterior uso.

El grado de deslignificación será calculado mediante la siguiente fórmula:

**Ecuación 8** *Porcentaje de Deslignificación.*

$$\%Deslignificación = \left[ \frac{1 - L \times m_D}{L_0 \times m_I} \right] \times 100$$

En donde:

$L$	contenido de lignina en masa pretratada	[%]
$L_0$	contenido de lignina en masa cruda	[%]
$m_D$	masa de biomasa seca después del tratamiento	[g]
$m_I$	masa seca de biomasa cruda	[g]

**Figura 17.**

*Proceso de deslignificación del material.*



**Fuente:** Autoras.

**3.8.4. Hidrólisis enzimática con Cellic CTec2 / Carezyme 1000L**

El método descrito se basa en la técnica propuesta por Hernández-Mendoza et al. (2021). Para Cellic CTec2, en un matraz de 50 mL, se mezclan 2.5 g de biomasa tratada previamente con 1.7 mL de enzima y 25 mL de una solución con acetato de sodio a una concentración de 50 mM y pH 5. Para Carezyme 1000L, en un matraz de 50 mL, se mezclan 2.5 g de biomasa tratada con 3 mL de enzima y 25 mL de una solución con acetato de sodio a una concentración de 50 mM y pH 8.5. La reacción se lleva a cabo a una temperatura constante de 50°C durante 72 horas, con agitación continua a 150 rpm en un agitador orbital. Durante el proceso, se controla la cantidad de azúcares en la solución utilizando un refractómetro para estimar su concentración. Al finalizar las 72 horas, se inactiva la enzima en baño maría a 95°C por 10 minutos. Una vez filtrado el hidrolizado, se almacena a 4°C para evaluar la cantidad de azúcares reductores presentes.

**Figura 18.**

*Proceso de hidrólisis con Cellic CTec2 y Carezyme 1000L.*



**Fuente:** Autoras.

**3.8.5. Determinación de azúcares reductores****3.8.5.1. Prueba Fehling**

Se añade 1 mL de la solución obtenida tras la hidrólisis de cada tratamiento en un tubo de ensayo, la cual debe estar diluida previamente en una proporción 1:1 con agua destilada. Posteriormente, se adiciona 1 mL de reactivo Fehling A y 1 mL de reactivo Fehling B, se mezcla homogéneamente y se colocan los tubos en un baño de agua hirviendo durante 1 minuto. Se deben observar y registrar los cambios de color que se producen durante el proceso.

**Figura 19.**

*Prueba de Fehling en las muestras del hidrolizado de Cellic CTec2 y de Carezyme 1000L.*



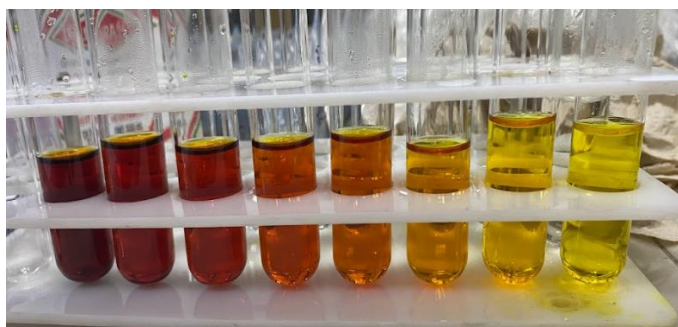
**Fuente:** Autoras.

**3.8.6. Cuantificación de azúcares reductores**

Los azúcares reductores se analizan mediante el método DNS utilizando el espectrofotómetro UV-Vis de Thermo Fisher Scientific. Primero, se prepara una solución mezclando 0.8 g de NaOH en agua, 15 g de tartrato sódico potásico tetrahidratado y 0.5 g de DNS [ácido 3,5-dinitrosalicílico]. Esta mezcla se afora a 50 mL con agua y se almacena en un frasco ámbar a 4°C. A continuación, se crea una curva de calibración utilizando glucosa como referencia. Una vez establecida la curva, se aplica el método DNS a cada muestra. Para ello, se mezcla 0.5 mL de muestra con 0.5 mL de reactivo DNS que se calienta durante 5 minutos en un baño de agua para después detener la reacción rápidamente en un baño de agua helada. Acto seguido, las muestras se diluyen con 5 mL y se dejan reposar durante 15 minutos para, finalmente, medir la absorbancia a 540 nm (Miller, 1959).

**Figura 20.**

*Método DNS empleado para determinar la concentración de azúcares reductores.*



**Fuente:** Autoras.



## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Caracterización de la Materia Prima

En la siguiente tabla, se presentan los datos recopilados durante la caracterización fisicoquímica de la cáscara de cacao. Estos datos proporcionan información clave sobre los constituyentes relevantes que influyen en su uso y procesamiento.

**Tabla 4.**

*Composición de las cáscaras del cacao.*

Componente	% Masa
Humedad	$5.01 \pm 0.11$
Cenizas	$8.67 \pm 0.14$
Extraíbles	$37.57 \pm 3.18$
Lignina	$33.35 \pm 0.04$
Holocelulosa	$40.56 \pm 0.17$
Celulosa	$25.33 \pm 0.08$
Hemicelulosa	$15.23 \pm 0.26$

**Fuente:** Autoras

Como se muestra en los datos de la tabla 4, el porcentaje de humedad es vital para inhibir la propagación de hongos en el sustrato por lo que el valor de  $5.01 \pm 0.11$ , es el idóneo para continuar con los procesos de caracterización, deslignificación e hidrólisis enzimática. En el estudio de Villamizar y colaboradores (2017) encontraron que las cáscaras inicialmente poseen niveles elevados de humedad, pero, tras su proceso, lograron un 6.67 % como humedad final en el secado natural, mientras que en el secado por charolas se obtuvo un 10.77 % de humedad. Por otro

lado, Murillo-Baca y colaboradores (2020) determinaron que las cáscaras del fruto de cacao CCN 51 tenían un contenido de humedad del 5.74 %. Jacobo y García (2022) manifiestan que el contenido de humedad varía según la calidad y variedad de la materia prima utilizada, el grosor de la cáscara y el método de deshidratación al que se expusieron las cáscaras.

Con relación al contenido de cenizas, se obtuvo un valor de  $8.67 \pm 0.14$  %, similar al reportado por Castillo y colaboradores (2019) con un valor de  $8.59 \pm 0.07$  %, y al valor de  $8.45 \pm 0.84$  % obtenido por Benalcázar (2018). Este valor es inferior al calculado por Titiloye y colaboradores (2013), que fue de 10.81 %. Los valores de cenizas en diferentes estudios pueden estar influenciados por factores climáticos y de la composición mineral del suelo.

La cantidad de sustancias extraíbles de la cáscara de cacao es de  $37.57 \pm 3.18$  %, lo cual sugiere que tras el proceso aplicado se logró eliminar una gran cantidad de elementos como material inorgánico, azúcares no estructurales y polifenoles, entre otras sustancias. Acevedo y Once (2023) en su investigación obtuvieron un porcentaje de extraíbles menor de  $23,66 \pm 1,77$  % empleado el mismo solvente, lo que puede atribuirse a la nutrición de la planta y al lugar de la siembra.

En cuanto a la cantidad de biopolímeros, se registró un valor de  $33.35 \pm 0.04$  % para la lignina, seguido de la celulosa con  $25.33 \pm 0.08$  y finalmente en una menor proporción la hemicelulosa con un valor de  $15.23 \pm 0.26$  %. En contraste, el análisis de Loayza (2020) refleja que cáscara de cacao tiene un contenido del 33.90 % de lignina, 29.07 % de celulosa y 2.97 % de hemicelulosa. Según Díaz-Oviedo y colaboradores (2022) la lignina constituye la mayor parte de la composición química de la cáscara con un 43.6 %; le sigue un 34.4 % asociado a la celulosa, y en un nivel mucho menor se encuentra la hemicelulosa con el 11.75 %. La abundante presencia de lignina en el residuo resalta las características mecánicas de la estructura de las plantas CCN-51,

contribuyendo a la rigidez de la corteza de cacao. No obstante, en el trabajo de Ruiz (2018) se expone que la proporción de estos elementos varía según factores ambientales, el origen geográfico de la muestra e incluso la edad de la especie.

#### 4.2. Deslignificación

**Tabla 5.**

*Resultado del proceso de deslignificación.*

<b>Reactivo</b>	<b>Grado de Deslignificación</b>	<b>Grados Brix (°Bx)</b>
KOH 1%	90.97 ± 0.71	6 °Bx

**Fuente:** Autoras

Para mejorar el proceso de deslignificación, se optó por llevar a cabo una hidrólisis alcalina con KOH en lugar de una ácida debido a que esta última resulta demasiado agresiva, lo que conlleva a la destrucción de los azúcares hemicelulósicos. Estos azúcares pueden convertirse en compuestos perjudiciales como el ácido acético, furfural y 5-[hidroximetil] furfural [HMF], los cuales tienen la capacidad de inhibir el crecimiento microbiano si el hidrolizado se emplea como sustrato de fermentación (McMillan, 1994).

Como se puede apreciar en los resultados de la tabla 5, se logró un grado de deslignificación del 90.97 ± 0.71 % al llevar a cabo el proceso con 9.20 g de biomasa, utilizando 1 % de KOH durante cuatro horas a 30°C y en una estufa a 160°C por 30 minutos. En contraste, Ouattara y colaboradores (2022) obtuvieron un valor cercano al 90.15 % al emplear 10 % de biomasa, 1 % de KOH durante siete horas a 30°C y en baño maría a 30°C por 60 minutos. Además, se observó un valor superior al informado por Sarmiento y colaboradores (2021), alcanzando un grado de deslignificación del 65.1 %. Estas variaciones pueden atribuirse a las diferencias en la concentración del reactivo, temperatura de reacción y del equipo utilizado en cada estudio.

Los resultados muestran que el aumento de la temperatura incrementa la deslignificación y reduce la recuperación de sólidos, respaldando la eficacia de la deslignificación alcalina a altas temperaturas en la solubilización de la lignina. Los tratamientos con bases fuertes como KOH y NaOH a altas temperaturas provocan cambios químicos en la celulosa y promueven la saponificación, facilitando la ruptura de los enlaces de éster en la matriz lignocelulósica. Esto modifica la estructura de la lignina y aumenta la porosidad de la biomasa, mejorando su accesibilidad para la hidrólisis subsiguiente. La variabilidad entre estudios destaca la importancia de considerar las condiciones experimentales específicas para estandarizar los procedimientos y garantizar resultados reproducibles con respecto a la deslignificación de biomasa lignocelulósica. (Woiciechowski et al., 2020).

Los grados Brix representan un gramo de sacarosa por cada 100 gramos de disolución. Después del proceso de deslignificación, se logró un contenido de azúcar disuelto del 6 % en 100g de disolución previamente filtrada. En un estudio anterior, Benalcázar (2018) obtuvo un valor de azúcar disuelto del 4.5 % al emplear NaOH al 2 % en un proceso de reflujo durante 4 horas. Asimismo, observó un menor porcentaje de azúcar disuelto, alcanzando un valor de 4.25 % al utilizar una concentración del 2 % de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### 4.3. Caracterización posterior a la deslignificación

**Tabla 6.**

*Composición de las cáscaras de cacao posterior a la deslignificación.*

Componente	% Peso
Lignina	50.87 ± 0.11
Holocelulosa	58.46 ± 0.09
Celulosa	40.75 ± 0.38

Hemicelulosa	17.71 ± 0.18
--------------	--------------

---

**Fuente:** Autoras

En la tabla 6 se pueden apreciar las variaciones en la concentración de los componentes estructurales, mostrando un contenido de  $50.87 \pm 0.11$  % de lignina,  $58.46 \pm 0.09$  % de holocelulosa y  $40.75 \pm 0.38$  % de celulosa. Estos resultados indican que el KOH tiene un impacto significativo en la descomposición de la estructura de la lignina. Además, se evidenció un incremento en la fracción celulósica, lo cual podría ser atribuido al aumento de la temperatura y a la presencia de un medio alcalino, factores que favorecen la mayor disolución de la lignina, las hemicelulosas y los compuestos extraíbles.

#### **4.4. Determinación de la ecuación experimental representativa de la etapa de hidrólisis enzimática.**

Para el cálculo de la ecuación cinética, nos basamos en la metodología propuesta por Espinosa-Cajas (2013). En este contexto, se procede a desarrollar una ecuación característica para la enzima Cellic CTec2 y otra para Carezyme 1000L. Para la formulación de dichas ecuaciones, se toman en cuenta los datos relevantes hasta alcanzar el punto máximo de conversión de azúcares. Se parte de la siguiente ecuación:

**Ecuación 9** *Cinética de la reacción.*

$$-\frac{dS}{dt} = k \cdot S^\alpha$$

Para la cual se deben calcular la constante de la velocidad de reacción específica y el orden de reacción a partir de la siguiente ecuación.

**Ecuación 10** *Ecuación logarítmica.*

$$\ln\left(-\frac{dS}{dt}\right) = \ln(k) + \alpha \ln(S)$$

#### 4.4.1. Ecuación para la enzima Cellic CTec2

**Tabla 7.**

*Grados Brix en función del tiempo durante hidrólisis enzimática con enzima Cellic CTec2.*

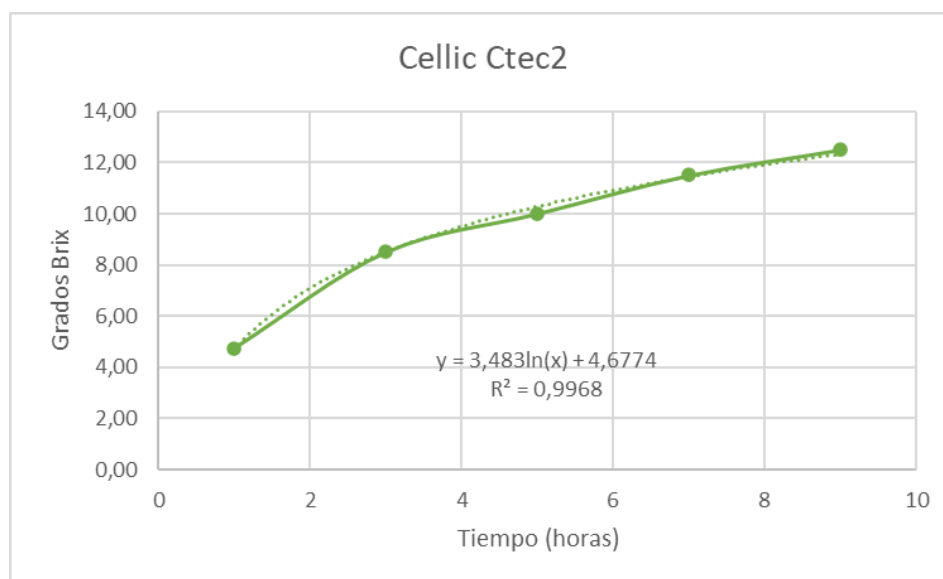
Tiempo (horas)	Grados Brix
1	4.75
3	8.50
5	10.00
7	11.50
9	12.50

**Fuente:** Autoras

Para calcular la velocidad de reacción, se grafican los datos de la Tabla 7.

**Gráfica 1.**

*Grados Brix con relación al tiempo para hidrólisis enzimática con Cellic CTec2.*



**Fuente:** Autoras

Se lleva a cabo la transformación de la ecuación para que pueda ser representada de manera lineal.

**Tabla 8.**

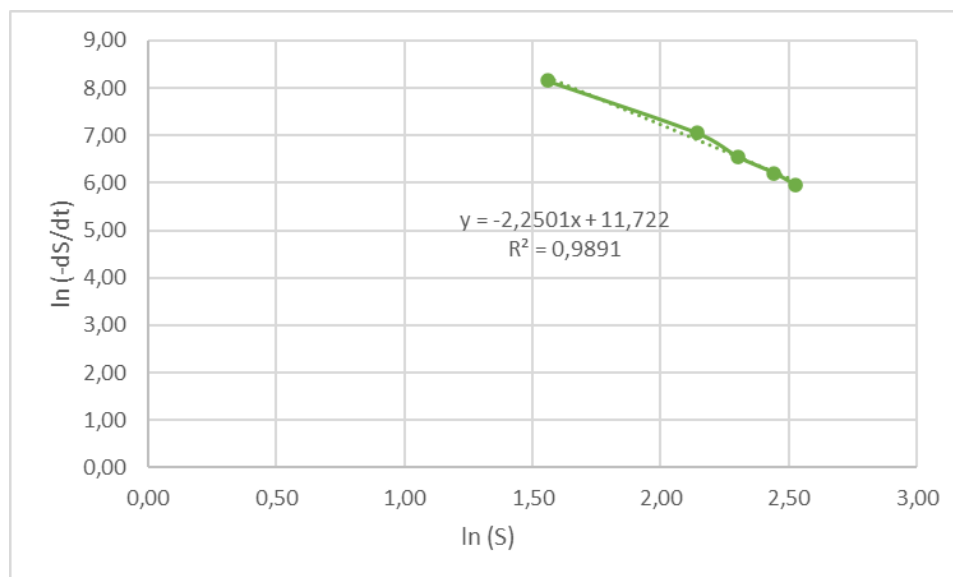
*Linealización de la ecuación para calcular la velocidad de reacción de Cellic CTec2.*

t	°Bx	ln(S)	(-dS/dt)	ln(-dS/dt)
1	4.75	1.56	3483.00	8.16
3	8.50	2.14	1161.00	7.06
5	10.0	2.30	696.60	6.55
7	11.5	2.44	497.57	6.21
9	12.5	2.53	387.00	5.96

**Fuente:** Autoras

**Gráfica 2.**

*Gráfica de linealización para obtener parámetros cinéticos de la reacción de Cellic CTec2*



**Fuente:** Autoras

A partir de este gráfico se obtiene la siguiente ecuación:

**Ecuación 11** *Ecuación logarítmica para Cellic CTec2.*

$$\ln\left(-\frac{dS}{dt}\right) = -2.2501 \ln(S) + 11.722$$

Con base en la ecuación calculada, se determina el valor de la constante de velocidad de reacción específica [k] y el orden de reacción [ $\alpha$ ], obteniendo un valor de 123253.7 para k y un valor de -2.2501 para  $\alpha$ . Se reemplaza en la Ecuación - y se obtiene:

**Ecuación 12** *Ecuación cinética experimental para Cellic CTec2.*

$$-\frac{dS}{dt} = 123253.7 * S^{-2.2501}$$

La interpretación de la ecuación revela que al tener un valor de k de 123253.7, la velocidad máxima predicha es significativamente alta, lo que sugiere que en el experimento se realiza optimizando al máximo las capacidades de la enzima mediante las mejores condiciones de pH, temperatura y concentraciones cercanas a la saturación enzimática. Asimismo, esto indica que la enzima posee una eficiencia catalítica destacada, con una alta conversión del sustrato por unidad de tiempo, lo que es crucial para la producción de azúcares reductores para su aplicación en la fermentación.

**4.4.2. Ecuación para la enzima Carezyme 1000L**

**Tabla 9.**

*Grados Brix en función del tiempo durante hidrólisis enzimática con enzima Carezyme 1000L.*

<b>Tiempo (horas)</b>	<b>Grados Brix</b>
1	3.00
3	4.50
5	6.00



6	6.50
7	7.50
9	9.00

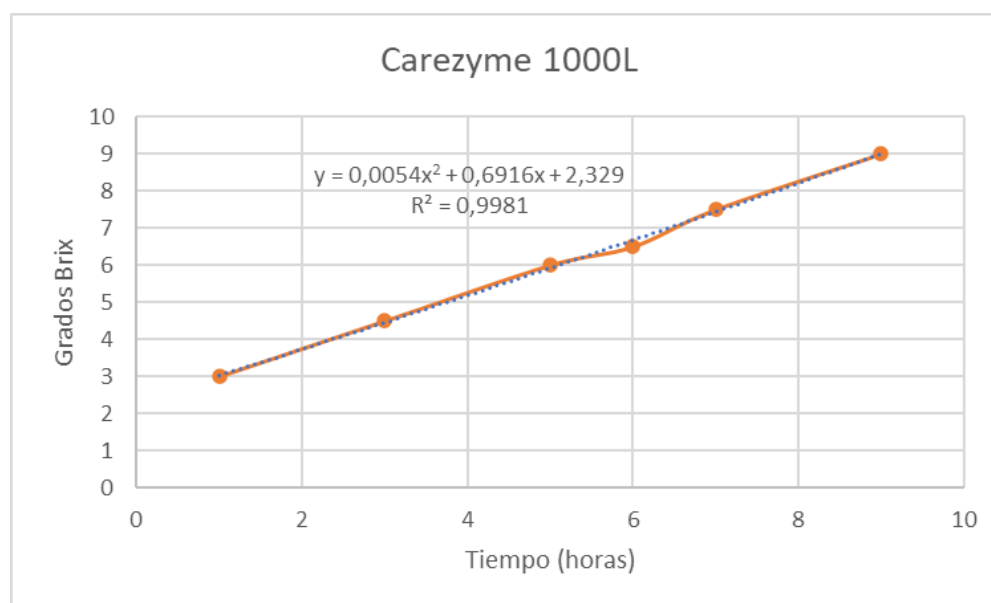
---

**Fuente:** Autoras

Para calcular la velocidad de reacción, se grafican los datos de la Tabla 6.

### Gráfica 3.

*Grados Brix con relación al tiempo para hidrólisis enzimática con Carezyme 1000L.*



Se realiza la transformación de la ecuación de modo que pueda representarse de forma lineal.

### Tabla 10.

*Linealización de la ecuación para calcular la velocidad de reacción de Carezyme 1000L.*

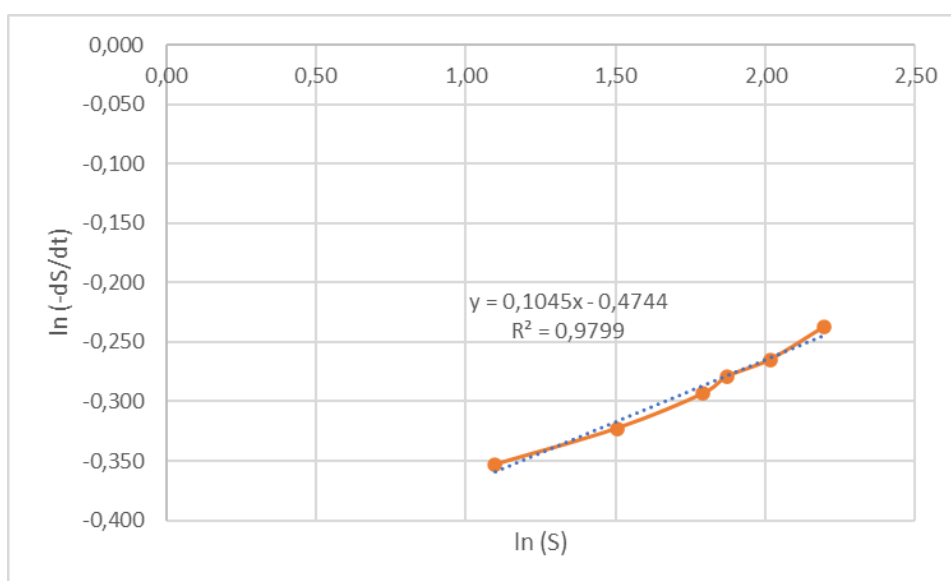
<b>t</b>	<b>°Bx</b>	<b>ln(S)</b>	<b>(-dS/dt)</b>	<b>ln(-dS/dt)</b>
1	3.00	1.10	0.702	-0.353

3	4.50	1.50	0.724	-0.323
5	6.00	1.79	0.746	-0.294
6	6.50	1.87	0.756	-0.279
7	7.50	2.01	0.767	-0.265
9	9.00	2.20	0.789	-0.237

**Fuente:** Autoras

#### Gráfica 4.

Gráfica de linealización para obtener parámetros cinéticos de la reacción de Carezyme 1000L.



**Fuente:** Autoras

A partir de este gráfico se obtiene la siguiente ecuación:

**Ecuación 13** Ecuación logarítmica para Carezyme 1000L.

$$\ln\left(-\frac{dS}{dt}\right) = 0.1045 \ln(S) - 0.4744$$

Con base en la ecuación calculada, se determina el valor de la constante de velocidad de reacción específica [k] y el orden de reacción [ $\alpha$ ], obteniendo un valor de 0.622 para k y un valor de 0.1045 para  $\alpha$ . Se reemplaza en la Ecuación - y se obtiene:

**Ecuación 14** *Ecuación cinética experimental para Carezyme 1000L*

$$-\frac{dS}{dt} = 0.622 * S^{0.1045}$$

La interpretación de la ecuación nos señala que al tener un valor de la constante de velocidad máxima  $k$  de 0.0622, se clasifica para la enzima analizada como un biocatalizador que opera a un ritmo relativamente lento y con una eficiencia limitada en la conversión del sustrato en glucosa. Esto sugiere que la enzima podría requerir más tiempo para procesar la materia prima disponible o que los parámetros como temperatura, pH y concentración empleados en el experimento no permitieron que la enzima mostrara su máximo potencial catalítico.

**4.5. Presencia de los azúcares reductores**

Después de realizar las pruebas de Fehling utilizando el hidrolizado resultante de Cellic CTec2 y Carezyme 1000L, cada muestra es sometida a un minuto de calor para luego observar un cambio en el color de la solución, el cual está directamente relacionado con la cantidad de azúcar reductor presente en la muestra analizada.

Cuando se analiza el hidrolizado de Cellic CTec2, se evidenció claramente un resultado positivo. La solución experimenta un cambio completo de un tono azul a un rojo ladrillo, lo que demuestra la presencia significativa de azúcares reductores en la muestra. Por el contrario, en la muestra procedente de Carezyme 1000L, se apreció una leve tonalidad rojo ladrillo en la parte inferior del tubo de ensayo, mientras el resto del líquido mantenía una coloración azul marcada, lo que indica la presencia mínima de azúcares reductores en el hidrolizado, en comparación con el resultado conseguido con Cellic CTec2.

**Figura 21.**

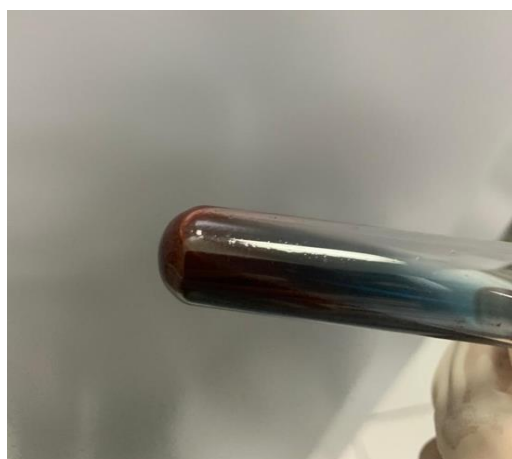
*Muestra de Cellic CTec2 con la prueba de Fehling.*



**Fuente:** Autoras.

**Figura 22.**

*Muestra de Carezyme 1000L con la prueba de Fehling.*



**Fuente:** Autoras.

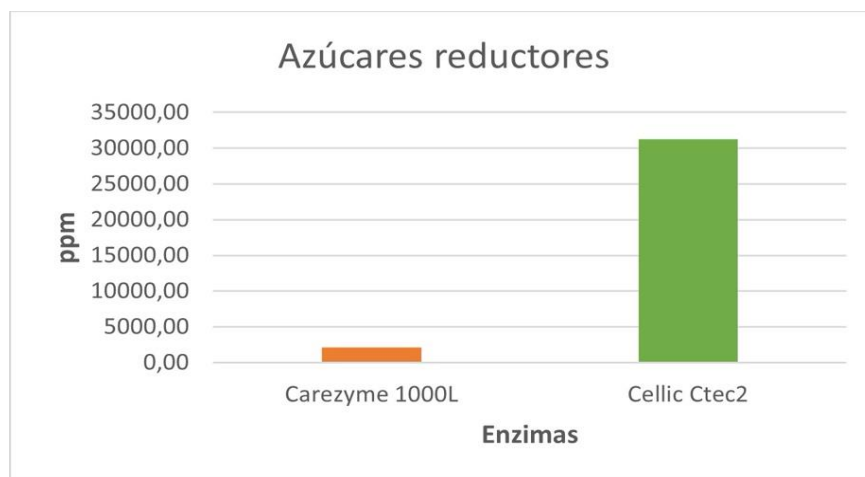
En el estudio de Zhang y Chen (2020) se manifiesta que los investigadores han demostrado un gran interés en la determinación precisa y rápida del azúcar reductor. Los azúcares reductores como la glucosa, fructosa, maltosa y lactosa contienen un grupo funcional que les permite actuar como agentes reductores, ya sea un aldehído, una cetona o un hidroxilo hemiacetal. La prueba de Fehling se destaca por su economía, rapidez y facilidad técnica, convirtiéndola en una opción

ampliamente empleada para diferenciar entre aldehídos y cetonas solubles en agua, así como para detectar monosacáridos en una solución.

#### 4.6. Cuantificación de Azúcares Reductores

##### Gráfica 5.

*Producción de azúcares reductores expresada en ppm mediante enzimas.*



**Fuente:** Autoras.

La información presentada en el gráfico anterior reveló una marcada disparidad en la producción de azúcares reductores entre las dos enzimas comparadas. Cellic CTec2 destaca al generar un mayor rendimiento de azúcares reductores, alcanzando un valor de 31,075.1 ppm, en comparación con los 2,709.3 ppm obtenidos por Carezyme 1000L. Esta diferencia equivale a 28,365.8 ppm, lo que refleja que se produce aproximadamente 1,047.0 % más de azúcares reductores, por ende, es 11.5 veces mayor. Estos resultados sugieren que Cellic CTec2 exhibe una mayor eficiencia o actividad en la conversión de sustratos en azúcares reductores en contraste con Carezyme 1000L, evidenciando su superioridad en este proceso.

Según Worthington y colaboradores (2019), la velocidad de las reacciones enzimáticas se ve influenciada por diversos factores, como la concentración de la enzima y del sustrato, la

presencia de inhibidores o activadores, así como la temperatura y el pH del medio. Además, Robinson (2015) sostiene que la mayoría de las enzimas tienen una temperatura y un pH óptimos característicos en los que la velocidad de la reacción catalizada es máxima, y la velocidad disminuye tanto por encima como por debajo de estos valores. Las enzimas son muy sensibles a los cambios, y pequeñas variaciones pueden provocar su desnaturalización. Jackson y colaboradores (2010) considera que la especificidad del sustrato es una propiedad enzimática crucial, aunque no todas las enzimas actúan exclusivamente sobre un único sustrato, mostrando una variabilidad significativa. La evolución de las enzimas tiende a favorecer la catálisis de una reacción o clase específica, determinando así el nivel de especificidad. Para Kuo y colaboradores (2016) la preferencia enzimática se manifiesta a través de diferentes tasas o afinidades por los sustratos, donde la especificidad se refiere a la preferencia por un sustrato específico y la selectividad por un sustrato sobre otro.

En esta situación, las condiciones experimentales de reacción podrían haber sido especialmente propicias para potenciar la actividad de Cellic CTec2, lo que posiblemente haya contribuido a un rendimiento sobresaliente. Además, es posible que la enzima haya demostrado una mayor afinidad por el tipo de sustrato empleado en el experimento, sugiriendo una interacción altamente efectiva que favoreció la producción de azúcares reductores.

#### **4.7. Análisis estadístico de los datos**

##### **4.7.1. Evaluación según grados Brix [°Bx]**

Los resultados en grados Brix para ambas enzimas, obtenidos después de completar las 72 horas del proceso, se encuentran en la siguiente tabla.

**Tabla 11.**

*Grados Brix obtenidos por cada réplica completadas las 72 horas.*

<b>Enzima</b>	<b>Réplica</b>	<b>°Bx</b>	<b>Promedio</b>
<b>Carezyme 1000L</b>	1	6.25	6.15 ± 0.42
	2	6.5	
	3	6	
	4	6.5	
	5	5.5	
<b>Cellic CTec2</b>	1	8	8.4 ± 0.42
	2	8.5	
	3	8.5	
	4	8	
	5	9	

**Fuente:** Autoras

Los datos de la tabla 11 muestran que el contenido de azúcar disuelto promedio obtenido fue del  $6.15 \pm 0.42$  % para Carezyme 1000L y del  $8.4 \pm 0.42$  % para Cellic CTec2. Estas diferencias se explican por las funciones específicas de cada enzima. Carezyme 1000L se encarga de la endohidrólisis de enlaces (1→4)-β- D -glucosídicos en celulosa, liquenina y β- D -glucanos de cereales, mientras que Cellic CTec2 es una enzima celulásica que actúa sobre los enlaces de celulosa y hemicelulosa, con una alta concentración de β-glucosidasas. Además, Cellic CTec2 es resistente a compuestos inhibidores y posee una gran estabilidad en su actividad.

Para evaluar la normalidad de los datos, se emplea una prueba de Shapiro-Wilks, la cual nos ayuda a verificar si los datos obtenidos en esta investigación siguen una distribución normal.

Se analizan los grados Brix obtenidos a través de la hidrólisis enzimática realizada con Cellic CTec2 y Carezyme 1000L. Para este análisis, se plantean dos hipótesis:

**H0:** La variable [Cellic CTec2 o Carezyme 1000] presenta una distribución normal.

**H1:** La variable [Cellic CTec2 o Carezyme 1000L] presenta una distribución no normal.

**Tabla 12.**

*Resultado de la prueba estadística de Shapiro-Wilk utilizada para contrastar los grados Brix resultantes de la hidrólisis enzimática.*

<b>Prueba de Shapiro Wilks</b>	
<b>Comparación de las muestras evaluadas</b>	<b>p-Value (0.05)</b>
°Bx del hidrolizado de Cellic CTec2	0.314
°Bx del hidrolizado de Carezyme 1000L	0.314

**Fuente:** Autoras.

En la tabla 12 se puede evidenciar que el valor de p de 0.314 es superior a 0.05 para ambas variables, lo que sugiere que no se rechaza la hipótesis nula. Por lo tanto, se infiere que tanto Carezyme 1000L como Cellic CTec2 siguen una distribución normal y son aptas para la realización de pruebas paramétricas como ANOVA.

Una vez realizada la prueba de normalidad para verificar la distribución de los datos, se lleva a cabo un análisis de varianza [ANOVA] para determinar si existen disparidades estadísticamente significativas entre los grupos analizados. Entonces, se formularon la hipótesis nula y la hipótesis alternativa para abordar este aspecto de la investigación.

**H0:** No existe diferencia significativa entre la eficiencia de Cellic CTec2 y Carezyme 1000L.

**H1:** Existe diferencia significativa entre la eficiencia de Cellic CTec2 y Carezyme 1000L.



**Tabla 13.**

*Resultado de la prueba estadística ANOVA.*

<b>Fuente</b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr (&gt;F)</b>
<b>Factor</b>	1	12.66	12.656	72.32	2.81e-05
<b>Error</b>	8	1.40	0.175		
<b>Total</b>	9	14.06			

**Fuente:** Autoras.

En la tabla 13 se muestra el análisis de varianza [ANOVA] que reveló diferencias altamente significativas entre los valores medios de los grados Brix producidos por las dos enzimas en estudio. El valor F calculado de 72.32, que relaciona la variabilidad entre enzimas y la variabilidad intra-enzima, supera ampliamente el valor F crítico necesario para establecer la significación estadística entre las medias. Estos resultados indican que una de las enzimas es más efectiva catalizando la degradación del sustrato, lo que aumenta la liberación de azúcares reductores detectados en grados Brix. El elevado valor F sugiere que la actividad enzimática difiere notablemente entre las enzimas. Por lo tanto, una de ellas podría ser más adecuada si se busca maximizar la producción de azúcares fermentables a partir de la biomasa, esenciales en la producción de biocombustibles, bebidas alcohólicas o la priorización de una actividad enzimática reducida para fines más específicos.

El valor de p de 0.0000281 es menor que el nivel de significancia establecido de 0.05, lo que lleva al rechazo de la hipótesis nula y a la conclusión de que existen diferencias significativas en la eficiencia entre Cellic CTec2 y Carezyme 1000L.

**Tabla 14.**

*Resultados de la prueba estadística de Tukey para la comparación de °Bx producidos por las enzimas*

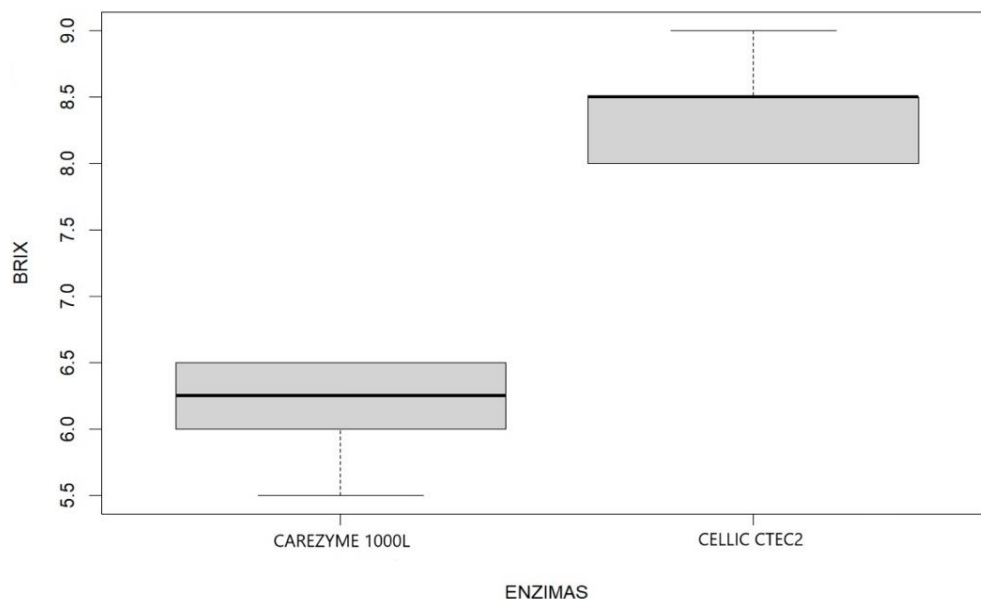
<b>Fuente</b>	<b>Diff</b>	<b>Lwr</b>	<b>Upr</b>	<b>P adj</b>	<b>Conf. level</b>
°Bx					
Carezyme 1000L – °Bx Cellic CTec2	2.25	1.6398	2.8601	0.0000281	95%

**Fuente:** Autoras.

Los análisis estadísticos realizados mediante la prueba de Tukey con un intervalo de confianza del 95 % evidenció la existencia de diferencias altamente significativas debido a que el valor de p es menor a 0.05 en los grados Brix generados por la actividad catalítica de las enzimas Cellic CTec2 y Carezyme 1000L. La diferencia de medias observada fue de 2.25 °Bx, lo que significa que la enzima Cellic CTec2 tiene una mayor capacidad para degradar el sustrato, debido a una mayor concentración de celulasas y adaptabilidad con el medio. Esto se traduce en una mayor producción de azúcares reductores que incrementan los grados Brix.

### Gráfica 6.

Diagrama de cajas según °Bx obtenidos de Carezyme 1000L y Cellic CTec2.



**Fuente:** Autoras

Como se observa en la gráfica 6, el diagrama de cajas nos indica que la variabilidad y los rangos de los datos son diferentes entre cada enzima. Al no traslaparse las cajas, se sugiere que las medianas de los grupos son considerablemente distintas, lo que indica la presencia de diferencias estadísticamente significativas entre las dos enzimas.

#### 4.7.2. Evaluación según concentración en partes por millón [ppm]

Los resultados de la cuantificación de azúcares reductores en partes por millón [ppm] para ambas enzimas, obtenidos después de completar las 72 horas del proceso, se encuentran detallados en la siguiente tabla. Es importante destacar que esta cuantificación se llevó a cabo utilizando un estándar de glucosa.

**Tabla 15.**

*Azúcares reductores obtenidos en ppm posterior a las 72 horas.*

<b>Enzima</b>	<b>Réplica</b>	<b>ppm</b>	<b>Promedio</b>
Carezyme 1000L	1	2019.2	2107.1
	2	2709.3	
	3	1946.2	
	4	2153.5	
	5	1707.1	
Cellic CTec2	1	30986.2	31244.5
	2	31075.1	
	3	31099.3	
	4	31032.5	
	5	32029.5	

**Fuente:** Autoras.

Los datos de la tabla 15 muestran que el contenido de azúcares reductores promedio obtenido fue del 2107.1 para Carezyme 1000L y del 31244.5 para Cellic CTec2. Estos datos indican que la enzima Cellic CTec2 produjo consistentemente niveles más altos de azúcares reductores en comparación con la enzima Carezyme 1000L, como se refleja en los promedios de producción de ambas enzimas. Estas diferencias se explican por las funciones específicas de cada enzima mencionadas anteriormente.

Para verificar la normalidad de los datos en este estudio, se utiliza la prueba de Shapiro-Wilks, que permite determinar si los datos siguen una distribución normal. Se examinan los niveles

de azúcares reductores en ppm obtenidos mediante la hidrólisis enzimática llevada a cabo con Cellic CTec2 y Carezyme 1000L. Se plantean las siguientes hipótesis:

**H0:** La variable [Cellic CTec2 o Carezyme 1000L] presenta una distribución normal.

**H1:** La variable [Cellic CTec2 o Carezyme 1000L] presenta una distribución no normal.

**Tabla 16.**

*Resultado de la prueba estadística de Shapiro-Wilk utilizada para contrastar los azúcares reductores en ppm resultantes de la hidrólisis enzimática.*

<b>Prueba de Shapiro Wilks</b>	
<b>Comparación de las muestras evaluadas</b>	<b>p-Value (0.05)</b>
ppm del hidrolizado de Cellic CTec2	0.0025
ppm del hidrolizado de Carezyme 1000L	0.5197

**Fuente:** Autoras.

En la tabla 16 se puede observar que, para la variable Cellic CTec2, el valor de p de 0.0025 es menor que 0.05, lo que lleva al rechazo de la hipótesis nula, indicando que los datos de esta variable no siguen una distribución normal. En contraste, para la variable Carezyme 1000L, el valor de p de 0.5197 es mayor que 0.05, lo que implica que no se rechaza la hipótesis nula y se infiere que los datos siguen una distribución normal. Dado que al menos una variable no sigue una distribución normal, se opta por realizar pruebas no paramétricas como la prueba de Wilcoxon o Kruskal-Wallis para el análisis estadístico correspondiente.

Dado que los datos no siguen una distribución normal, se opta por utilizar pruebas no paramétricas como la prueba de Kruskal-Wallis para analizar si hay diferencias significativas entre las medianas de los azúcares reductores producidos por las dos enzimas. En este contexto, se plantean las siguientes hipótesis para investigar y comparar de manera precisa los efectos de las enzimas en estudio:

**H0:** No existe diferencia significativa entre la eficiencia de Cellic CTec2 y Carezyme 1000L.

**H1:** Existe diferencia significativa entre la eficiencia de Cellic CTec2 y Carezyme 1000L.

**Tabla 17.**

*Resultado de la prueba estadística de Krustal-Wallis utilizada para contrastar los azúcares reductores en ppm resultantes de la hidrólisis enzimática.*

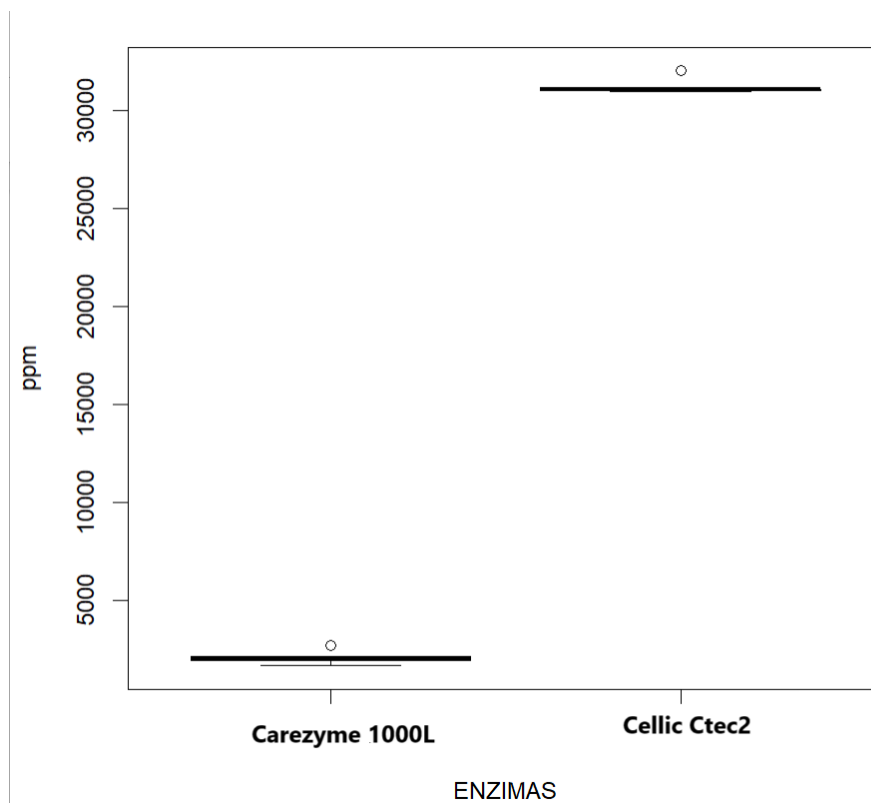
<b>Datos</b>	<b>Chi-squared</b>	<b>df</b>	<b>p-value</b>
ppm Carezyme 1000L –	6.8182	1	0.009023
ppm Cellic CTec2			

Fuente: Autoras.

Como se muestra en la tabla, la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis arroja un valor de p de 0.009023, inferior a 0.05, indicando así la diferencia significativa entre las medianas de los azúcares reductores generados, expresados en partes por millón (ppm), por las enzimas evaluadas. Además, el valor de chi-cuadrado obtenido es de 6.8182, lo que proporciona información adicional sobre la significancia de las diferencias observadas en el estudio.

**Gráfica 7.**

*Diagrama de cajas de azúcares reductores obtenidos en ppm de Carezyme 1000L y Cellic CTec2.*



**Fuente:** Autoras.

Como se observa en la gráfica 7, el diagrama de cajas nos indica que la variabilidad y los rangos de los datos son diferentes entre cada enzima. La enzima Cellic CTec2 muestra valores más altos en comparación a la enzima Carezyme 1000L. Al no traslaparse las cajas, se sugiere que las medianas de los grupos son considerablemente distintas, lo que indica la presencia de una diferencia estadísticamente significativa en la concentración de azúcares reductores expresados en partes por millón [ppm].

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. Conclusiones

La investigación sobre la biomasa no utilizada representa un paso importante en la búsqueda de alternativas sostenibles para el aprovechamiento de materia prima, contribuyendo con la reducción en la dependencia de recursos no renovables y la mitigación el impacto ambiental. Este enfoque responde a las demandas crecientes de una sociedad preocupada por el medio ambiente y la reducción de emisiones de carbono. Los avances en el manejo de la materia lignocelulósica abren nuevas posibilidades para la creación de productos y servicios a partir de fuentes renovables ampliamente disponibles, con perspectivas de viabilidad a largo plazo. La investigación continua y la mejora constante son fundamentales en el camino hacia una economía sostenible.

La hidrólisis enzimática de la cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.) utilizando las enzimas Cellic CTec2 y Carezyme 1000L mostró una marcada diferencia en su eficiencia para la obtención de azúcares reductores. El tratamiento con Cellic CTec2 resultó en un rendimiento significativamente mayor, alcanzando una concentración de 31,075.1 ppm de azúcares reductores después de 72 horas de hidrólisis. En contraste, el uso de Carezyme 1000L bajo las mismas condiciones experimentales produjo una cantidad considerablemente menor de azúcares reductores, con una concentración máxima de 2,709.3 ppm. Por lo tanto, Cellic CTec2 demostró ser más efectiva para la hidrólisis de la cáscara de cacao y la obtención de azúcares reductores en mayores cantidades en comparación con Carezyme 1000L.

La caracterización fisicoquímica de la cáscara de cacao de la variedad CCN-51 revela su compleja composición, donde sobresalen la holocelulosa, los compuestos extraíbles y la lignina,



que representan aproximadamente el  $40,56 \pm 0,17$  %, el  $37,57 \pm 3,18$  % y el  $33,35 \pm 0,04$  % de su estructura, respectivamente. Además, se reportan datos sobre el contenido de celulosa [ $25,33 \pm 0,08$  %], hemicelulosa [ $15,23 \pm 0,26$  %], humedad [ $5,01 \pm 0,11$  %] y cenizas [ $8,67 \pm 0,14$  %]. Hay que considerar que la cantidad de cada constituyente químico está sujeta a diversos factores, como las condiciones climáticas, la variedad de cacao y la distribución geográfica.

Al realizar el pretratamiento con KOH al 1 %, se logra una significativa desintegración de la lignina, alcanzando un grado de deslignificación del  $90,97 \pm 0,71$  %, lo cual se muestra como una prometedora técnica en la preparación de la biomasa. Al eliminar la lignina, se aumenta la disponibilidad de sustratos celulósicos y hemicelulósicos, lo que facilita la acción enzimática y resulta en una mayor liberación de azúcares fermentables. Este aumento en la eficiencia de la hidrólisis enzimática puede tener repercusiones significativas en la industria, ya que podría conducir a una optimización en la producción de bienes o servicios derivados del aprovechamiento de materiales lignocelulósicos.

En base a los parámetros cinéticos de las ecuaciones diferenciales que describen la variación de concentración del sustrato en función del tiempo, se concluye que la enzima Cellic CTec2 presenta una eficiencia catalítica muy superior en la conversión del sustrato en comparación con la enzima Carezyme 1000L.

La constante cinética de Cellic CTec2 es aproximadamente 200 mil veces mayor, lo que indica que predice una velocidad máxima 200000 veces más rápida bajo las mismas condiciones experimentales. Esto se atribuye a que el ensayo realizado con Cellic CTec2 tuvo una concentración óptima, pH óptimo y temperatura ideal.

El hidrolizado de Cellic CTec2 mostró un cambio notable en la prueba de Fehling, con una coloración rojo ladrillo, a diferencia del producido por Carezyme 1000L, lo cual apunta a una

existencia apreciable de azúcares reductores. Además, en términos de cuantificación, se observó una concentración mayor de azúcares en el hidrolizado tratado con Cellic CTec2, alcanzando un valor de 31,075.1 ppm, en contraste con los 2,709.3 ppm obtenidos con Carezyme 1000L.

El análisis estadístico realizado a través de Shapiro-Wilks, ANOVA y Tukey se llevó a cabo para comprobar la distribución normal de los datos y detectar posibles diferencias significativas entre los grupos comparados en el experimento. Los resultados revelaron una marcada disparidad en el rendimiento de producción de azúcares reductores entre las dos enzimas evaluadas. Este hallazgo resalta la viabilidad de Cellic CTec2 como una opción preferente para la obtención de azúcares fermentables, en línea con los principios de sostenibilidad. La superioridad demostrada por Cellic CTec2 no solo subraya su eficacia en el proceso de hidrólisis, sino que también sugiere su potencial para contribuir a prácticas industriales más eco amigables y eficientes en términos de recursos.

## **5.2. Recomendaciones**

Al recolectar la materia prima, evitar el uso de sacos o fundas negras, pues esto favorece el desarrollo de hongos antes de llegar al lugar donde se lleva a cabo el estudio. Además, es preferible transportarla el mismo día de la recolección porque si se deja guardada en un saco durante varias horas y bajo ciertas condiciones ambientales, también se puede propiciar este problema.

Las partículas de la materia prima deben tener un tamaño uniforme, esto asegura la obtención de una muestra homogénea. Este proceso implica la eliminación de las partículas más pequeñas o fondo para garantizar la viabilidad del proceso enzimático.

Para mejorar la eficacia en el proceso de hidrólisis de la biomasa del cacao y asegurar rendimientos óptimos en la producción de azúcares reductores, es crucial reducir o eliminar los

compuestos extraíbles presentes en la biomasa de cacao. Aquellos pueden interferir negativamente en el proceso al ejercer efectos inhibidores que afectan la acción de las enzimas.

En el proceso de deslignificación, es preferible hacer uso de vasos de precipitación, ya que proporcionan un espacio más amplio para que se lleve a cabo la reacción del material con el KOH, a diferencia de los matraces que son más estrechos en la parte superior.

Ajustar parámetros como temperatura, pH y tiempo de reacción para maximizar la eficiencia de la hidrólisis enzimática. Esto se puede conseguir mediante ensayos que evalúen diferentes combinaciones de variables para alcanzar el mayor rendimiento de azúcares reductores. No obstante, la temperatura y el pH óptimos pueden variar según el tipo de enzima utilizada y las características de la biomasa de cacao.

Distribuir la cantidad de enzimas en varios tubos estériles para evitar la contaminación del contenido del frasco original al abrirlo y cerrarlo repetidamente durante la realización de réplicas. De esta manera, se reduce el riesgo de contaminación cruzada y se garantiza la integridad del proceso experimental. Además, para mantener su viabilidad, es importante proteger las enzimas de la luz envolviendo cada tubo con papel de aluminio.

Tomar en cuenta los datos obtenidos sobre Cellic CTec2 para la fermentación posterior de los azúcares reductores.

Se sugiere evaluar diferentes parámetros cinéticos específicos para cada enzima con el fin de maximizar la eficiencia en la producción de azúcares reductores. También, deben contemplarse diferentes estándares de azúcares reductores para la cuantificación.

Se recomienda considerar en futuras investigaciones el hidrolizado procedente del proceso de deslignificación debido a que se cuantificaron 11,264.0 ppm de glucosa que pueden ser utilizados para fermentación, sin el empleo de enzimas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad, A., Acuña, C., & Naranjo, E. (2020). El cacao en la Costa ecuatoriana: estudio de su dimensión cultural y económica. *Revista Internacional de la Administración: Estudios de la Gestión*, 7, 59-83. <https://doi.org/10.32719/25506641.2020.7.3>
- Acevedo Lazo, V., & Once Bueno, P. (2023). Estudio de la influencia del tiempo en la reacción de hidrólisis ácida para la obtención de glucosa a partir de la cáscara de cacao [Universidad de Cuenca]. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/40709/1/Trabajo-de-Titulaci%C3%B3n.pdf>
- Afanasjeva, N., Castillo, L. C., & Sinisterra, J. C. (2017). Lignocellulosic biomass. Part I: Biomass transformation. *Journal Of Science With Technological Applications*, 3, 27-43. <https://doi.org/10.34294/j.jsta.17.3.22>
- Aguiar, S., Estrella, M. Á. E., & Uvidia, H. (2022). Residuos agroindustriales: su impacto, manejo y aprovechamiento. *Axioma*, 1(27), 5-11. <https://doi.org/10.26621/ra.v1i27.803>
- Alam, M. M., Maniruzzaman, M., & Morshed, M. (2014). Application and Advances in Microprocessing of Natural Fiber (Jute)–Based Composites. En *Elsevier eBooks* (pp. 243-260). <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-096532-1.00714-7>
- Álvarez, C.O., Liconte, N. D., Pérez, E.E., Lares, M., & Perozo, J.G. (2022). Revisión sobre los atributos físicos, químicos y sensoriales como indicadores de la calidad comercial del cacao. *Petroglifos revista crítica transdisciplinar*, 5(1), 12-25. <https://doi.org/10.5281/zenodo.6548316>
- Álvarez-Barreto, J., Larrea, F., Pinos, M., Benalcázar, J., Oña, D., Andino, C., Viteri, D., Leon, M., & Almeida-Streitwieser, D. (2020). Chemical Pretreatments on Residual Cocoa Pod

- Shell Biomass for Bioethanol Production. *Bionatura*, 6(1), 1490–1500.  
<https://revistabionatura.com/files/2021.06.01.9.pdf>
- Amândio, M. S. T., Rocha, J. M. S., & Xavier, A. M. R. B. (2023). Enzymatic Hydrolysis Strategies for Cellulosic Sugars Production to Obtain Bioethanol from Eucalyptus globulus Bark. *Fermentation*, 9(3), 1-19. <https://doi.org/10.3390/fermentation9030241>
- Arodudu, O., Holmatov, B., & Voinov, A. (2020). Ecological Impacts and Limits of Biomass Use: A Critical review. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 22(8), 1591-1611.  
<https://doi.org/10.1007/s10098-020-01911-1>
- Avadí, Á. (2023). Environmental assessment of the Ecuadorian cocoa value chain with statistics-based LCA. *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 28(11), 1495-1515.  
<https://doi.org/10.1007/s11367-023-02142-4>
- Ayala, J., Machuca, G., Benítez, P., & Alvarado, J. (2020). Hidrólisis enzimática de polvillo de arroz para la producción de etanol de segunda generación. *Revista Ciencia Unemi*, 13(32), 41-50. <https://www.redalyc.org/journal/5826/582661898004/582661898004.pdf>
- Baharum, Z., Akim, A. M., Hin, T. Y., Hamid, R. A., & Kasran, R. (2016). Theobroma cacao: Review of the Extraction, Isolation, and Bioassay of Its Potential Anti-cancer Compounds. *Tropical life sciences research*, 27(1), 21–42.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4807961/>
- Barrios-Rodríguez, Y. F., Salas-Calderón, K. T., Orozco-Blanco, D. A., Gentile, P., & Girón-Hernández, J. (2022). Cocoa Pod Husk: a High-Pectin source with applications in the food and biomedical fields. *ChemBioEng Reviews*, 9(5), 462-474.  
<https://doi.org/10.1002/cben.202100061>

- Baruah, J., Nath, B., Sharma, R., Kumar, S., Deka, R. C., Baruah, D., & Kalita, E. (2018). Recent trends in the pretreatment of lignocellulosic biomass for Value-Added products. *Frontiers in Energy Research*, 6. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2018.00141>
- Bhagavan, N., & Ha, C. (2015). Enzymes and Enzyme Regulation. En *Elsevier eBooks* (pp. 63-84). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-416687-5.00006-3>
- Bhardwaj, N. K., Kumar, B., Agrawal, K., & Verma, P. (2021). Current Perspective on Production and Applications of Microbial cellulases: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, 8(95), 1-34. <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00447-6>
- Bhati, N., Shreya, & Sharma, A. K. (2020). Cost-effective cellulase production, improvement strategies, and future challenges. *Journal of Food Process Engineering*, 44(2). <https://doi.org/10.1111/jfpe.13623>
- Blackstock, J. C. (1989). Enzyme kinetics. En *Elsevier eBooks* (pp. 65-77). <https://doi.org/10.1016/b978-0-7236-1151-6.50012-1>
- Blanco, A., & Blanco, G. (2022). Enzymes. En *Elsevier eBooks* (pp. 165-190). <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-91599-1.00029-8>
- Belwal, T., Cravotto, C., Ramola, S., Thakur, M., Chemat, F., & Cravotto, G. (2022). Bioactive Compounds from Cocoa Husk: Extraction, Analysis and Applications in Food Production Chain. *Foods (Basel, Switzerland)*, 11(6), 798. <https://doi.org/10.3390/foods11060798>
- Benalcazar, J. (2018). *Evaluación de diferentes pretratamientos químicos a la biomasa de la cáscara de cacao para procesos de fermentación alcohólica*. Universidad San Francisco de Quito.

- Boeckx, J., Hertog, M., Geeraerd, A., & Nicolai, B. (2017). Kinetic modelling: an integrated approach to analyze enzyme activity assays. *Plant Methods*, 13(69), 1-12.  
<https://doi.org/10.1186/s13007-017-0218-y>
- Božinović, M., Sokač, T., Šalić, A., Dukarić, A., Tišma, M., Planinić, M., & Zelić, B. (2023). Standardization of 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay for measuring xylanase activity. *Croatian journal of food science and technology*, 15(2), 151-162.  
<https://doi.org/10.17508/cjfst.2023.15.2.03>
- Carranza, W.D, Angulo, M.B., Cedeño, G.S., y Prado, Y.K. (2020). Evaluación socioeconómica del cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la zona norte de la Provincia de los Ríos. *Revista de estudios empresariales y empresariales*, 4(2), 96- 106.  
<https://journalbusinesses.com/index.php/revista/article/view/79/197>
- Castillo, F. (2005). *Biotechnología ambiental*. España: Editorial Tébar Flores.  
[https://www.google.com.ec/books/edition/Biotechnolog%C3%ADa\\_ambiental/19ffPAm3E3kC?hl=es-419&gbpv=0](https://www.google.com.ec/books/edition/Biotechnolog%C3%ADa_ambiental/19ffPAm3E3kC?hl=es-419&gbpv=0)
- Castillo, Y., Juscamaita, J., Montalvo, J., & Visitación, L. (2019). PRETRATAMIENTO E HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA CASCARILLA DE ARROZ. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 85(4), 476-488.  
<http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v85n4/2309-8740-rsqp-85-04-476.pdf>
- Castillo-Orozco, E., Garavitto, O. A., Saavedra, O., & Mantilla, D. (2023). The Drying Kinetics and CFD Multidomain Model of Cocoa Bean Variety CCN51. *Foods*, 12(5), 1082.  
<https://doi.org/10.3390/foods12051082>

- Chávez, M. (2019). La biomasa: fuente alternativa de combustibles y compuestos químicos. *Anales de Química*, *115*(5), 399-407.  
<https://analesdequimica.es/index.php/AnalesQuimica/article/view/1171/1870>
- Cerri, M., Reale, L., & Zadra, C. (2019). Metabolite storage in theobroma cacao L. seed: Cytological and Phytochemical analyses. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1-11.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01599>
- Cleaves, H. J. (2011). Hydrolysis. En *Springer eBooks* (p. 785). [https://doi.org/10.1007/978-3-642-11274-4\\_756](https://doi.org/10.1007/978-3-642-11274-4_756)
- Chico, M. F. (2022). Valorization of Cocoa by Products: Applications and Perspectives in the Food Industry. *Alimentos Ciencia e Ingeniería*, *29*(2), 57–101.  
<https://revistas.uta.edu.ec/erevista/index.php/aci/article/view/1857/2272>
- Colombo, M. L., Pinorini-Godly, M. T., & Conti, A. (2012). Botany and pharmacognosy of the Cacao tree. En *Springer eBooks* (pp. 41-62). [https://doi.org/10.1007/978-88-470-2038-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-88-470-2038-2_4)
- Compañía Nacional de Chocolates. (2021). *MODELO PRODUCTIVO PARA EL CULTIVO DE CACAO (Theobroma cacao L.) ORIGEN, BOTÁNICA Y GENERALIDADES*.  
<https://chocolates.com.co/wp-content/uploads/2021/12/AF-FOLLETO-ORIGEN-BOTANICA-Y-GENERALIDADES-1.pdf>
- Considine, J. A., & Frankish, E. J. (2014). Quality assurance, teaching and research. En *Elsevier eBooks* (pp. 155-187). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-408081-2.00011-1>
- Corporación Financiera Nacional. (2023). *Ficha Sectorial: cacao*. CFN.  
<https://www.cfn.fin.ec/wpcontent/uploads/downloads/biblioteca/2023/fichassectoriales-2-trimestre/Ficha-Sectorial-Cacao.pdf>



- Crozier, S. J., Preston, A. G., Hurst, J. W., Payne, M. J., Mann, J., Hainly, L., & Miller, D. L. (2011). Cacao seeds are a "Super Fruit": A comparative analysis of various fruit powders and products. *Chemistry Central journal*, 5, 5. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-5-5>
- Cruz-Cardona, Y., Cadena-Chamorro, E., & Arango-Tobón, J. C. (2019). Procesamiento de la Cascarrilla de Cebada Cervecera por Vía Enzimática para la Obtención de Azúcares Fermentables. *Información tecnológica*, 30(4), 41-50. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642019000400041>
- Dagnino, E. P., Ruiz, C., & Chamorro, E. (2018). ENSAYOS PRELIMINARES DE DESLIGNIFICACIÓN DE ASERRÍN DE ALGARROBO NEGRO, EN VISTAS A LA PRODUCCIÓN EFICIENTE DE AZÚCARES FERMENTABLES. *Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente*, 22(6), 61-66. [https://www.researchgate.net/profile/EsterChamorro/publication/331324082\\_ENSAYOS\\_PRELIMINARES\\_DE\\_DESLIGNIFICACION\\_DE\\_ASERRIN\\_DE\\_ALGARROBO\\_NEGRO\\_EN\\_VISTAS\\_A\\_LA\\_PRODUCCION\\_EFICIENTE\\_DE\\_AZUCARES\\_FERMENTABLES/links/5c73e03fa6fdcc47159a7cd1/ENSAYOSPRELIMINARESDEDESLIGNIFICACIONDEASERRINDEALGARROBO\\_NEGRO-EN-VISTAS-A-LA-PRODUCCION-EFICIENTE-DE-AZUCARES\\_FERMENTABLES.pdf](https://www.researchgate.net/profile/EsterChamorro/publication/331324082_ENSAYOS_PRELIMINARES_DE_DESLIGNIFICACION_DE_ASERRIN_DE_ALGARROBO_NEGRO_EN_VISTAS_A_LA_PRODUCCION_EFICIENTE_DE_AZUCARES_FERMENTABLES/links/5c73e03fa6fdcc47159a7cd1/ENSAYOSPRELIMINARESDEDESLIGNIFICACIONDEASERRINDEALGARROBO_NEGRO-EN-VISTAS-A-LA-PRODUCCION-EFICIENTE-DE-AZUCARES_FERMENTABLES.pdf)
- De França Passos, D., Pereira, N., & De Castro, A. M. (2018). A comparative review of recent advances in cellulases production by *Aspergillus*, *penicillium* and *trichoderma* strains and their use for lignocellulose deconstruction. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 14, 60-66. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.06.003>

- De Souza, P. A., Moreira, L. F., Sarmiento, D. H., & Da Costa, F. B. (2018). Cacao— theobroma cacao. En *Elsevier eBooks* (pp. 69-76). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803138-4.00010-1>
- Deheco, A. (2019). Obtención de jarabes glucosados a partir de cáscaras de plátano (*Musa paradisiaca* L.) mediante hidrólisis enzimática de celulasas. *Revista de investigaciones de la Universidad Le Cordon Bleu*, 6(1), 65-75. <https://doi.org/10.36955/riulcb.2019v6n1.005>
- Deshavath, N. N., Mukherjee, G., Goud, V. V., Veeranki, V. D., & Sastri, C. V. (2020). Pitfalls in the 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay for the reducing sugars: interference of furfural and 5-hydroxymethylfurfural. *International Journal of Biological Macromolecules*, 156, 180-185. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.045>
- Dimidi, E., Cox, S. R., Rossi, M., & Whelan, K. (2019). Fermented Foods: Definitions and Characteristics, Impact on the Gut Microbiota and Effects on Gastrointestinal Health and Disease. *Nutrients*, 11(8), 1806. <https://doi.org/10.3390/nu11081806>
- Domínguez, D., & Hernández, H. (2016). INTENSIFICACIÓN DE UN PROCESO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL. *Jóvenes en la Ciencia*, 2(1), 271-275. <https://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/download/1046/681>.
- Díaz, M. A., Cervantes, X. P., & Chesme, C. L. (2023). Sostenibilidad en el cultivo de cacao (*Theobroma Cacao* L.) por las oportunidades de economía circular para la Provincia Los Ríos. *Ciencia latina internacional*, 7(4), 5182-5197. [https://doi.org/10.37811/cl\\_rcm.v7i4.7342](https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v7i4.7342)

- Díaz-Oviedo, A. F., Ramón-Valencia, B. A., & Moreno-Contreras, G. G. (2022). Caracterización físico-química de la cáscara de mazorca de cacao como posible uso en la elaboración de tableros aglomerados. *Revista de Investigación, Desarrollo e Innovación*, 12 (1), 97-106. [https://revistas.uptc.edu.co/index.php/investigacion\\_duitama/article/view/14211/11645](https://revistas.uptc.edu.co/index.php/investigacion_duitama/article/view/14211/11645)
- Dongare, M. L., Buchade, P., & Shaligram, A. D. (2015). Refractive index based optical BRIX measurement technique with equilateral angle prism for sugar and allied industries. *Optik*, 126(20), 2383-2385. <https://doi.org/10.1016/j.ijleo.2015.05.137>
- Dutta, T., & Yasmin, A. (2023). A chemical approach towards the sustainability of biofuels: Environmental and economic aspects. En *Elsevier eBooks* (pp. 349-362). <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-91159-7.00004-7>
- Ejaz, U., Sohail, M., & Ghanemi, A. (2021). Cellulases: From Bioactivity to a Variety of Industrial Applications. *Biomimetics (Basel, Switzerland)*, 6(3), 44. <https://doi.org/10.3390/biomimetics6030044>
- Elewa, M. K., El-Saady, G., Ibrahim, K., Tawfek, M., & Elhossieny, H. (2020). A novel method for brix measuring in raw sugar solution. *Egyptian Sugar Journal*, 15(0), 69-86. <https://doi.org/10.21608/esugj.2020.209517>
- Elewa, M. K., El-Saady, G., Ibrahim, K., Tawfek, M., & Elhossieny, H. (2022). Evaluation of digital Brixmeter performance for Brix measurement in raw sugar solution. *JES. Journal of engineering sciences*, 5(3), 1-10. <https://doi.org/10.21608/jesaun.2022.115375.1108>
- Erazo Solorzano, C. Y., Tuárez García, D. A., Edison Zambrano, C., Moreno-Rojas, J. M., & Rodríguez Solana, R. (2023). Monitoring Changes in the Volatile Profile of Ecuadorian Cocoa during Different Steps in Traditional On-Farm Processing. *Plants (Basel, Switzerland)*, 12(22), 3904. <https://doi.org/10.3390/plants12223904>

- Espinosa-Cajas, F. (2013). *OBTENCIÓN DE ETANOL MEDIANTE HIDRÓLISIS ALCALINA, ENZIMÁTICA Y FERMENTACIÓN A PARTIR DEL EXCEDENTE ORGÁNICO DEL BANANO VARIEDAD MUSA PARADISIACA* [Tesis de Grado]. Universidad Central del Ecuador. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/1821/1/T-UCE-0017-44.pdf>
- European Forest Institute. (2021). *Diagnóstico de la cadena de valor del cacao, y mapeo de los indicadores y sistemas de información existentes Resultado del diagnóstico participativo en Ecuador*. EUREDD Facility. [https://euredd.efi.int/wp-content/uploads/2022/09/Informe-1\\_Diagnostico-cadena-Cacao\\_Ecuador.pdf](https://euredd.efi.int/wp-content/uploads/2022/09/Informe-1_Diagnostico-cadena-Cacao_Ecuador.pdf)
- Fahmy, T. Y., Fahmy, Y., Mobarak, F., El- Sakhawy, M., & Abou-Zeid, R. E. (2018). Biomass pyrolysis: past, present, and future. *Environment, Development and Sustainability*, 22(1), 17-32. <https://doi.org/10.1007/s10668-018-0200-5>
- Freixo, R., Casanova, F., Ribeiro, A. B., Pereira, C. F., Costa, E. M., Pintado, M. E., & Ramos, O. L. (2023). Extraction methods and characterization of cellulose fractions from a sugarcane by-product for potential industry applications. *Industrial Crops and Products*, 197, 116615. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116615>
- García, E., & Peralta, D. (2022). Hidrólisis enzimática de bagazo de caña (*Saccharum sp* híbrido) para la producción de azúcares simples. *Agroindustria, Sociedad y Ambiente*, 1(18), 119-131. <https://doi.org/10.5281/zenodo.6481849>
- García, J. L., & Martínez, M. J. (2014). Biomasa y Biotecnología. *SEM@aforo*, 58, 45-47. <https://digital.csic.es/handle/10261/137345>
- Germer, T. A., Zwinkels, J. C., & Tsai, B. K. (2014). Spectrophotometry. En *Experimental Methods in The Physical Sciences* (pp. 1-66). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-386022-4.00001-7>

- Gopaulchan, D., Motilal, L. A., Bekele, F. L., Clause, S., Ariko, J. O., Ejang, H. P., & Umaharan, P. (2019). Morphological and genetic diversity of cacao (*Theobroma cacao* L.) in Uganda. *Physiology and molecular biology of plants: an international journal of functional plant biology*, 25(2), 361–375. <https://doi.org/10.1007/s12298-018-0632-2>
- Gordon, M. H., & Macrae, R. (1987). *Instrumental Analysis in the Biological Sciences*. (1.<sup>a</sup> ed.). Springer Science. <https://doi.org/10.1007/978-1-4684-1521-6>
- GrandSur. (2021). *Cacao variedad CCN-51*. GrandSur. <https://grandsur.com/cacao-variedad-ccn-51/>
- Guo, Q., Cui, S. W., & Kang, J. (2014). Classical Methods for Food Carbohydrate Analysis. *Food oligosaccharides: production, analysis and bioactivity.*, 284-299. <https://doi.org/10.1002/9781118817360.ch16>
- Haq, I. U., Qaisar, K., Nawaz, A., Akram, F., Mukhtar, H., Zohu, X., Xu, Y., Mumtaz, M., Rashid, U., Ghani, W. A. W. A. K., & Choong, T. S. Y. (2021). Advances in Valorization of Lignocellulosic Biomass towards Energy Generation. *Catalysts*, 11(3), 309. <https://doi.org/10.3390/catal11030309>
- Herrera, J. D., Villa, L., Olaya, A. C., & García, L. S. (2020). Extracción de almidón de cáscara de cacao *Theobroma cacao* L. como alternativa de bioprospección. *Revista ION*, 33(2), 25-34. <https://doi.org/10.18273/revion.v33n2-2020002>
- Hernández-Mendoza, A. G., Saldaña-Trinidad, S., Martínez-Hernández, S., Pérez Sariñana, B. Y., & Láinez, M. (2021). Optimization of alkaline pretreatment and enzymatic hydrolysis of cocoa pod husk (*Theobroma cacao* L.) for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*, 154, 106268. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106268>

- Hiltunen, S., Sapkota, J., Ioannou, E., Momeni, M. H., Master, E. R., & Ristolainen, M. (2024). Comparative assessment of chemical and biochemical approaches for the activation of lignocellulosic materials and emerging opportunities for expansin-related proteins. *Cellulose*, *41*, 147-168. <https://doi.org/10.1007/s10570-023-05637-3>
- Hozman-Manrique, A. S., Garcia-Brand, A. J., Hernández-Carrión, M., & Porras, A. (2023). Isolation and Characterization of Cellulose Microfibers from Colombian Cocoa Pod Husk via Chemical Treatment with Pressure Effects. *Polymers*, *15*(3). <https://doi.org/10.3390/polym15030664>
- Huang, L. Z., Ma, M. G., Ji, X. X., Choi, S. E., & Si, C. (2021). Recent Developments and Applications of Hemicellulose From Wheat Straw: A Review. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, *9*, 690773. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.690773>
- Ilić, N., Milić, M., Beluhan, S., & Dimitrijević-Branković, S. (2023). Cellulases: From lignocellulosic biomass to improved production. *Energies*, *16*(8), 3598. <https://doi.org/10.3390/en16083598>
- International Cocoa Organization. (2023). *Harvest and post-harvest processing*. ICCO. <https://www.icco.org/harvesting-post-harvest-new/>
- International Cocoa Organization. (2023, 29 diciembre). *Statistics - International Cocoa Organization*. ICCO. <https://www.icco.org/statistics/#tab-id-6>
- Jain, A., Jain, R., & Jain, S. (2020). Basic techniques in biochemistry, microbiology and molecular biology. En *Springer protocols*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9861-6>
- Jain, B. P., Goswami, S., & Pandey, S. (2021). Carbohydrate. En *Elsevier eBooks* (pp. 5-22). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-822007-8.00007-6>

- Jackson, C., Gillam, E. M. J., & Ollis, D. L. (2010). Directed Evolution of Enzymes. En *Elsevier eBooks* (pp. 654-673). <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102690-8.00675-8>
- Jacobo, J. R., & García, A. V. (2022). *Obtención y caracterización fisicoquímica de un SLV sustrato nutritivo hecho a partir de los desechos del cacao para la producción de plántulas de hortalizas*. (1.<sup>a</sup> ed.). La Libertad, El Salvador: Escuela Especializada en Ingeniería ITCA-FEPADE. <https://www.itca.edu.sv/wp-content/uploads/2022/12/03-Informe-Final-Qu%C3%ADmica-2021-E-Book.pdf>
- Jakob, M., & Gindl-Altmutter, W. (2023). The effect of partial delignification on the stress–strain relationship in transverse compression. *Journal of Materials Science*, 58(3), 1071-1085. <https://doi.org/10.1007/s10853-022-08074-y>
- Jaywant, S. A., Singh, H., & Arif, K. M. (2022). Sensors and Instruments for Brix Measurement: A Review. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 22(6), 2290. <https://doi.org/10.3390/s22062290>
- Jean-Marie, É., Jiang, W., Béreau, D., & Robinson, J. (2022). Theobroma cacao and Theobroma grandiflorum: botany, composition and pharmacological activities of pods and seeds. *Foods*, 11(24), 3966. <https://doi.org/10.3390/foods11243966>
- Juarez-Enriquez, E., Levario-Gómez, A., Ochoa-Reyes, E., Tirado-Gallegos, J. M., Baeza-Jiménez, R., & Buenrostro-Figueroa, J. (2022). Significance of enzyme kinetics in food processing and production. En *Elsevier eBooks* (pp. 467-482). <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-89929-1.00025-1>
- Karumamkandathil, R., Uthup, T. K., & Jacob, J. (2022). Application of OMics technologies in rubber, cocoa, and betel nut. En *Elsevier eBooks* (pp. 501-526). <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-89905-5.00028-8>

- Katoch, R. (2011). Carbohydrate estimations. En *Springer eBooks* (pp. 67-76).  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9785-2\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9785-2_5)
- Ke, F., & Wan, S. (2022). Applications of metal-organic frameworks for lithium-sulfur batteries. En *Elsevier eBooks* (pp. 49-119). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819676-2.00007-4>
- Korányi, T. I., Fridrich, B., Pineda, A., & Barta, K. (2020). Development of ‘Lignin-First’ approaches for the valorization of lignocellulosic biomass. *Molecules*, 25(12), 2815.  
<https://doi.org/10.3390/molecules25122815>
- Kuhad, R. C., Deswal, D., Sharma, S., Bhattacharya, A., Jain, K. K., Kaur, A., Pletschke, B. I., Singh, A., & Karp, M. (2016). Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 55, 249-272. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.10.132>
- Kumar, M. D., Oyedun, A. O., & Kumar, A. (2018). A review on the current status of various hydrothermal technologies on biomass feedstock. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 81, 1742-1770. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.270>
- Kuo, Y. M., Henry, R. A., & Andrews, A. J. (2016). Measuring specificity in multi-substrate/product systems as a tool to investigate selectivity in vivo. *Biochimica et biophysica acta*, 1864(1), 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2015.08.011>
- Lahive, F., Hadley, P., & Daymond, A. (2018). The physiological responses of cacao to the environment and the implications for climate change resilience. a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 39(5), 1-22. <https://doi.org/10.1007/s13593-018-0552-0>
- Leong, S. Y., Duque, V. M., Muhammad, S. B., & Oey, I. (2019). Carbohydrates. En *Elsevier eBooks* (pp. 171-206). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814174-8.00006-8>



- Lewis, T., & Piedra, W. (2023, 24 abril). *Biochemistry, proteins enzymes*. StatPearls - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554481/>
- Li, J., Zhang, F., Jiang, D., Li, J., Wang, F., Zhang, Z., Wang, W., & Zhao, X. (2020). Diversity of Cellulase-Producing filamentous fungi from Tibet and transcriptomic analysis of a superior cellulase producer *Trichoderma harzianum* LZ117. *Frontiers in Microbiology, 11*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01617>
- Liu, N., Ding, Y., Li, Y., Wang, X., Yu, S., & Chen, C. (2024). A comprehensive review of recent advances in delignification technology. *The Journal of The Textile Institute, 1-16*. <https://doi.org/10.1080/00405000.2023.2296691>
- Llerena, W., Samaniego, I., Vallejo, C., Arreaga, A., Zhunio, B., Coronel, Z., Quiroz, J., Angós, I., & Carrillo, W. (2023). Profile of bioactive components of cocoa (*Theobroma cacao* L.) By-Products from Ecuador and evaluation of their antioxidant activity. *Foods, 12*(13), 2583. <https://doi.org/10.3390/foods12132583>
- Loayza, K. N. (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* [Trabajo de titulación]. Universidad Politécnica Salesiana. <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/18673>
- Lobo, F. C. M., Franco, A. R., Fernandes, E. M., & Reis, R. L. (2021). An Overview of the Antimicrobial Properties of Lignocellulosic Materials. *Molecules, 26*(6), 1-20 <https://doi.org/10.3390/molecules26061749>

- Lübeck, M., & Lübeck, P. S. (2022). Fungal cell factories for efficient and sustainable production of proteins and peptides. *Microorganisms*, *10*(4), 753. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040753>
- Maceda, A., Soto-Hernández, R. M., Peña-Valdivia, C. B., Trejo, C., & Terrazas, T. (2022). Lignina: composición, síntesis y evolución. *Madera y Bosques*, *27*(2), e2722137. <https://doi.org/10.21829/myb.2021.2722137>
- Magagula, L. P., Masemola, C. M., Ballim, M. A., Tetana, Z. N., Moloto, N., & Liganiso, E. C. (2022). Lignocellulosic Biomass Waste-Derived Cellulose Nanocrystals and Carbon Nanomaterials: A Review. *International Journal Of Molecular Sciences*, *23*(8), 1-22. <https://doi.org/10.3390/ijms23084310>
- Mallakpour, S., & Azimi, F. (2020). Spectroscopic characterization techniques for layered double hydroxide polymer nanocomposites. En *Elsevier eBooks* (pp. 231-280). <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-101903-0.00006-4>
- Mannaa, M., Han, G., Seo, Y. S., & Park, I. (2021). Evolution of Food Fermentation Processes and the Use of Multi-Omics in Deciphering the Roles of the Microbiota. *Foods (Basel, Switzerland)*, *10*(11), 2861. <https://doi.org/10.3390/foods10112861>
- Marsden, W. L., Gray, P. P., Nippard, G. J., & Quinlan, M. (1982). Evaluation of the DNS method for analysing lignocellulosic hydrolysates. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *32*(7-12), 1016-1022. <https://doi.org/10.1002/jctb.5030320744>
- Martínez, F., Pardo, J. P., Riveros, H. (2018). *Bioquímica de Laguna y Piña*. México: Editorial El Manual Moderno. [https://www.google.com.ec/books/edition/Bioqu%C3%ADmica\\_de\\_Laguna\\_y\\_Pi%C3%B1a/6OFmDwAAQBAJ?hl=es-419&gbpv=1](https://www.google.com.ec/books/edition/Bioqu%C3%ADmica_de_Laguna_y_Pi%C3%B1a/6OFmDwAAQBAJ?hl=es-419&gbpv=1)

- Martínez, I. B., De La Cruz, M. V., Nelson, M. R., & Bertin, P. (2015). Morphological characterization of traditional cacao (*Theobroma cacao* L.) plants in Cuba. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *64*(1), 73-99. <https://doi.org/10.1007/s10722-015-0333-4>
- McMillan, J. D. (1994). Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. 292–324. <https://doi.org/10.1021/BK-1994-0566.CH015>
- Mesbah, N. M. (2022). Industrial biotechnology based on enzymes from extreme environments. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *10*, 1-16. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.870083>
- Mikulski, D., & Kłosowski, G. (2022). Delignification efficiency of various types of biomass using microwave-assisted hydrotropic pretreatment. *Scientific Reports*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08717-9>
- Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal.Chem.* *31*: 426-428.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2023). *Cifras Agropecuarias: Información Productiva Territorial*. SIPA. <http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/cifras-agroproductivas>
- Morisseau, C. (2022). The role of hydrolases in biology and xenobiotics metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(9), 4870. <https://doi.org/10.3390/ijms23094870>
- Mrudula, S., & Murugammal, R. (2011). Production of cellulose by *Aspergillus niger* under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, *42*(3), 1119–1127. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220110003000033>
- Munjanja, B. M., & Sanganyado, E. (2016). *UV-Visible Absorption, Fluorescence, and Chemiluminescence Spectroscopy*. <https://www.researchgate.net/profile/Edmond->

Sanganyado/publication/271205275\_UVVisible\_Absorption\_Fluorescence\_and\_Chemiluminescence\_Spectroscopy/links/5848c3fc08ae95e1d1666138/UV-Visible-Absorption-Fluorescence-and-Chemiluminescence-Spectroscopy.pdf

- Murillo-Baca, S. M., Ponce-Rosas, F., & Huamán-Murillo, M. (2020). Características fisicoquímicas, compuestos bioactivos y contenido de minerales en la harina de cáscara del fruto de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Manglar*, 17(1), 67-73. <https://doi.org/10.17268/manglar.2020.011>
- Nacer, A. (2024). Análisis y perspectivas del sector cacaotero para el 2024. *ANECACAO Tradición E Innovación*, 24, 17-19. <https://anecacao.com/wp-content/uploads/2024/01/REVISTA-ANECACAO-enero-2024.pdf>
- Naher, L., Fatin, S. N., Sheikh, M. A. H., Azeez, L. A., Siddiquee, S., Zain, N. M., & Karim, S. M. R. (2021). Cellulase Enzyme Production from Filamentous Fungi *Trichoderma reesei* and *Aspergillus awamori* in Submerged Fermentation with Rice Straw. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 7(10), 868. <https://doi.org/10.3390/jof7100868>
- Nazario, O., Ordóñez, E., Mandujano, Y., Arévalo, J. (2018). Polifenoles totales, antocianinas, capacidad antioxidante de granos secos y análisis sensorial del licor de cacao (*Theobroma cacao* L.) criollo y siete clones. *Revista Investigando Asombroso*, 3(1), 51-59. <https://revistas.unas.edu.pe/index.php/revia/article/viewFile/85/69>
- Niño, L., Acosta, A., & Gelves, R. (2013). Evaluación de pretratamientos químicos para la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, (69), 317-326. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43029812024>

- Ngamput, H. M. A., & Herrani, R. (2019). The Effect of Differentiation of Hydrolysis Time towards Ethanol Levels Produced Through *Ulva Lactuca* Fermentation. En *The International Seminar on Bioscience and Biological Education* (Vol. 1241, pp. 1-8). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1241/1/012010>
- Novozymes. (2010). Novozymes Cellic CTec2 and HTec2 - Enzymes for hydrolysis of ... <https://www.yumpu.com/en/document/read/35286682/novozymes-cellicar-ctec2-and-htec2-enzymes-for-hydrolysis-of->
- Oluwafemi, O. S., Sakho, E. H. M., Parani, S., & Lebepe, T. C. (2021). Characterization techniques for Ternary I–III–VI Quantum dots. En *Elsevier eBooks* (pp. 117-135). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818303-8.00007-1>
- Onu, P., & Mbohwa, C. (2021). Methodological approaches in agrowaste preparation and processes. En *Elsevier eBooks* (pp. 37-54). <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-85402-3.00009-7>
- Ouattara, L. Y., Soro, D., Fanou, G. D., Kouassi, E. K. A., Bamba, M., Yao, K. B., Adouby, K., Drogui, A. P., & Tyagi, D. R. (2022). Optimization of the autoclave-assisted alkaline delignification of cocoa (*Theobroma cacao*) pod husks using KOH to maximize reducing sugars. *BioResources*, 17(1), 826–848. <https://doi.org/10.15376/biores.17.1.826-848>
- Palmer, T., & Bonner, P. (2011). Kinetics of Single-Substrate Enzyme-Catalysed Reactions. En *Elsevier eBooks* (pp. 105-125). <https://doi.org/10.1533/9780857099921.2.105>
- Pantoja, Á. J., Cuatin, M.F., & Muñoz, D. (2015). EFECTO DEL PRETRATAMIENTO QUÍMICO Y ENZIMÁTICO EN LA DESLIGNIFICACIÓN DE BIOMASA AGROINDUSTRIAL TÍPICA DEL CAUCA. *Bioteología en el Sector Agropecuario y*

*Agroindustrial*, 13(1), 45-53.

<https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/371/555>

Passos, M. L., & Saraiva, M. L. M. (2019). Detection in UV-visible Spectrophotometry: detectors, detection systems, and detection strategies. *Measurement*, 135, 896-904.

<https://doi.org/10.1016/j.measurement.2018.12.045>

Pentassuglia, S., Agostino, V., & Tommasi, T. (2018). EAB—Electroactive Biofilm: a biotechnological resource. En *Elsevier eBooks* (pp. 110-123).

<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409547-2.13461-4>

Perera, C. O., & Perera, A. D. (2019). Technology of processing of horticultural crops. En *Elsevier eBooks* (pp. 299-351). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814803-7.00013-0>

Rakhee, Mishra, J., Sharma, R. K., & Misra, K. (2018). Characterization techniques for herbal products. En *Elsevier eBooks* (pp. 171-202). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813999-8.00009-4>

Ranjan, R., Rai, R., Bhatt, S., & Dhar, P. (2023). Technological Road Map of Cellulase: A Comprehensive outlook to structural, computational, and industrial applications. *Biochemical Engineering Journal*, 198, 109020. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2023.109020>

Ramanathan, A., Begum, K. M. S., Pereira, A. O., & Cohen, C. (2022). Pyrolysis of waste biomass: toward sustainable development. En *Elsevier eBooks* (pp. 1-34). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-824357-2.00005-x>

Ramesh, A., Devi, P. S., Chattopadhyay, S., & Kavitha, M. (2020). Commercial Applications of Microbial Enzymes. En *Microorganisms for sustainability* (pp. 137-184). [https://doi.org/10.1007/978-981-15-1710-5\\_6](https://doi.org/10.1007/978-981-15-1710-5_6)

- Ramírez, M.B., Cely, V. H., & Ramírez, S. I. (2013). Actividad antioxidante de clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) finos y aromáticos cultivados en el estado de Chiapas-México. *Perspectivas en Nutrición Humana*, 15(1), 27-40. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0124-41082013000100002](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0124-41082013000100002)
- Raveendran, S., Parameswaran, B., Ummalyma, S. B., Abraham, A., Mathew, A. K., Madhavan, A., Rebello, S., & Pandey, A. (2018). Applications of Microbial Enzymes in Food Industry. *Food technology and biotechnology*, 56(1), 16–30. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.01.18.5491>
- Reales, J. G., Castaño, H.I., & Zapata, J. E. (2016). Evaluación de Tres Métodos de Pretratamiento Químico sobre la Deslignificación de Tallos de Yuca. *Información tecnológica*, 27(3), 11-22. [https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-07642016000300003](https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642016000300003)
- Riera, M. A., Maldonado, S., & Palma, R. R. (2018). RESIDUOS AGROINDUSTRIALES GENERADOS EN ECUADOR PARA LA ELABORACIÓN DE BIOPLÁSTICOS. *Revista ingeniería industrial*, 17(3), 227-246. <https://doi.org/10.22320/s07179103/2018.13>
- Robinson P. K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in biochemistry*, 59, 1–41. <https://doi.org/10.1042/bse0590001>
- Romero, H., Tinoco, O., & Dávila, K. (2015). Hidrólisis enzimática de residuos agroindustriales del banano para la obtención de jarabe glucosado aplicando tres pretratamientos. *Datos Industriales*, 18(1), 101-107. <https://www.redalyc.org/pdf/816/81642256012.pdf>
- Rossetti, M. F., & Forno, A. G. (2022). *Introducción a la Biotecnología, sus aplicaciones y alcances*. Argentina: Ediciones UNL. [https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/bitstream/handle/11185/6742/introduccionBiotecnologia\\_AA.pdf?sequence=2](https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/bitstream/handle/11185/6742/introduccionBiotecnologia_AA.pdf?sequence=2)

- Ruiz, K. (2018). “*OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO ETANOSOLV PARA LA OBTENCIÓN DE CELULOSA BIOMÁSICA Y VALORACIÓN DE DIFERENTES RUTAS DE ACETILACIÓN DEL MATERIAL*” [Tesis de Doctorado]. CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN MATERIALES AVANZADOS, S.C. <https://cimav.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1004/2243/1/Tesis%20Karla%20Ruiz%20Culty.pdf>
- Salcedo, J. G., Galán, E. L., & Pardo, M. F. (2011). EVALUACIÓN DE ENZIMAS PARA LA HIDRÓLISIS DE RESIDUOS (HOJAS Y COGOLLOS) DE LA COSECHA CAÑA DE AZÚCAR. *Dyna*, 78(169), 182-190. <http://www.redalyc.org/pdf/496/49622390021.pdf>
- Sánchez, A. M., Vayas, T., Mayorga, F., & Freire, C. (2020). *SECTOR CACAOTERO ECUATORIANO*. OBEST. <https://obest.uta.edu.ec/publicaciones/dipticos/>
- Sarmiento-Vásquez, Z., Vandenberghe, L., Rodrigues, C., Tanobe, V. O. A., Marín, O., de Melo Pereira, G. V., Ghislain Rogez, H. L., Góes-Neto, A., & Soccol, C. R. (2021). Cocoa pod husk valorization: alkaline-enzymatic pre-treatment for propionic acid production. *Cellulose*, 28(7), 4009–4024. <https://doi.org/10.1007/S10570-021-03770-5/FIGURES/7>
- Sigma Aldrich. (2024). *Enzymes for alternative energy research*. Merck Chemicals. <https://www.sigmaaldrich.com/EC/es/technical-documents/technical-article/protein-biology/enzyme-activity-assays/enzymes-for-aer>
- Sigma Aldrich. (2024). *Cellulase, Enzyme blend Cellic CTEC2*. Merck Chemicals. <https://www.sigmaaldrich.com/EC/es/product/sigma/sae0020>
- Šikić-Pogačar, M., Turk, D. M., & Fijan, S. (2022). Knowledge of fermentation and health benefits among general population in North-eastern Slovenia. *BMC public health*, 22(1), 1695. <https://doi.org/10.1186/s12889-022-14094-9>



- Singh, A., Bajar, S., & Bishnoi, N. R. (2017). Physico-chemical pretreatment and enzymatic hydrolysis of cotton stalk for ethanol production by *saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, *244*, 71-77. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.123>
- Singh, A., Bajar, S., Devi, A., & Pant, D. (2021). An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications. *Bioresource Technology Reports*, *14*, 100652. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100652>
- Singhvi, M., & Gokhale, D. V. (2019). Lignocellulosic biomass: hurdles and challenges in its valorization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103*(23-24), 9305-9320. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10212-7>
- Shrotri, A., Kobayashi, H., & Fukuoka, A. (2017). Catalytic Conversion of Structural Carbohydrates and Lignin to Chemicals. En *Advances in Catalysis* (pp. 59-123). <https://doi.org/10.1016/bs.acat.2017.09.002>
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2008). *Principios de Análisis Instrumental* (6.<sup>ta</sup> ed.). Cengage Learning. [https://www.academia.edu/43268766/Principios\\_de\\_an%C3%A1lisis\\_instrumental\\_Skoog\\_Douglas\\_A\\_Holler\\_F\\_James\\_Crouch\\_Stanley\\_R\\_Sexta\\_Edici%C3%B3n\\_Cengage\\_Learning\\_Editores\\_2008\\_M%C3%A9xico](https://www.academia.edu/43268766/Principios_de_an%C3%A1lisis_instrumental_Skoog_Douglas_A_Holler_F_James_Crouch_Stanley_R_Sexta_Edici%C3%B3n_Cengage_Learning_Editores_2008_M%C3%A9xico)
- Srivastava, N., Srivastava, M., Mishra, P., Gupta, V. K., Molina, G., Rodríguez-Couto, S., Manikanta, A., & Ramteke, P. W. (2018). Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. *Bioresource Technology Reports*, *82*, 2379-2386. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.08.074>

- Soares, T., & Oliveira, M. B. P. (2022). Cocoa By-Products: Characterization of bioactive compounds and beneficial health effects. *Molecules*, 27(5), 1625. <https://doi.org/10.3390/molecules27051625>
- Solarte-Toro, J. C., Romero-García, J. M., Martínez-Patiño, J. C., Ruiz, E., Castro, E., & Álzate, C. A. C. (2019). Acid pretreatment of lignocellulosic biomass for energy vectors production: A review focused on operational conditions and techno-economic assessment for bioethanol production. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 107, 587-601. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.02.024>
- Sousa, S. F., Ramos, M. J., Lim, C., & Fernandes, P. A. (2015). Relationship between Enzyme/Substrate properties and enzyme efficiency in hydrolases. *ACS Catalysis*, 5(10), 5877-5887. <https://doi.org/10.1021/acscatal.5b00923>
- Sukha, D. A., Butler, D., Umaharan, P., & Boulton, E. (2008). The use of an optimised organoleptic assessment protocol to describe and quantify different flavour attributes of cocoa liquors made from Ghana and Trinitario beans. *European Food Research and Technology*, 226(3), 405-413. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0551-2>
- Shukla, E., Bendre, A. D., & Gaikwad, S. M. (2022). Hydrolases: The Most Diverse Class of Enzymes. En *Biochemistry*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.102350>
- Tebes-Stevens, C., Patel, J. M., Jones, W. J., & Weber, E. J. (2017). Prediction of Hydrolysis Products of Organic Chemicals under Environmental pH Conditions. *Environmental science & technology*, 51(9), 5008–5016. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05412>
- Titiloye, J. O., Bakar, M. S. A., & Odetoeye, T. E. (2013). Thermochemical characterisation of agricultural wastes from West Africa. *Industrial Crops and Products*, 47, 199–203. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.03.011>

- Tocco, D., Carucci, C., Monduzzi, M., Salis, A., & Sanjust, E. (2021). Recent Developments in the Delignification and Exploitation of Grass Lignocellulosic Biomass. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 9(6), 2412-2432. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c07266>
- Torres, J. P. (2023). *Caracterización de los residuos de cacao generados con potencial valor, para su uso en la industria alimentaria, en el cantón Santo Domingo, provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas* [Trabajo de titulación]. Universidad Técnica de Ambato. <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/37884/1/AL%20869.pdf>
- Torres-Cabezas, M. A. (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* [Trabajo de titulación]. Universidad Central del Ecuador. <https://www.dspace.uce.edu.ec/server/api/core/bitstreams/8284e57c-9883-446c-b79c-a7735d808abe/content>
- Thambiratnam, K., Reduan, S. A., Tiu, Z. C., & Ahmad, H. (2020). Application of two-dimensional materials in fiber laser systems. En *Elsevier eBooks* (pp. 227-264). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818392-2.00009-3>
- Transparency Market Research. (2021) Mercado global de celulasa: análisis, tamaño, participación, crecimiento, tendencias y pronóstico de la industria global para 2018-2026 ID del representante: TMRGL60753. <https://www.transparencymarketresearch.com/cellulase-market.html>
- Troncoso, O. P., Corman-Hijar, J. I., & Torres, F. G. (2023). Lignocellulosic Biomass for the Fabrication of Triboelectric Nano-Generators (TENGs)—A Review. *International Journal Of Molecular Sciences*, 24(21), 15784. <https://doi.org/10.3390/ijms242115784>

- Vargas, P., Ciobotă, V., Salinas, W., Kampe, B., Aponte, P. M., Rösch, P., Popp, J., & Ramos, L. A. (2016). Distinction of Ecuadorian varieties of fermented cocoa beans using Raman spectroscopy. *Food Chemistry*, *211*, 274-280. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.017>
- Vargas, Y., Pazmiño, J., & Dávila, J. (2021). Potencial de Biomasa en América del Sur para la Producción de Bioplásticos. Una Revisión. *Revista Politécnica*, *48(2)*, 7-20. <https://doi.org/10.33333/rp.vol48n2.01>
- Vásquez, Z. S., De Carvalho Neto, D. P., Pereira, G. V. M., Vandenberghe, L. P. S., De Oliveira, P. Z., Tiburcio, P. B., Soccol, C. R. (2019). Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review. *Waste Management*, *90*, 72-83. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.04.030>
- Vera, J. H., Jiménez, W. J., Naula, M. C., Villa, U. J., Zaruma, F. A., Montecé, G. Y., Cabrera, W. J., Zambrano, F.N., y Astudillo, C. M. (2021). Residuos de la producción de cacao (*Theobroma cacao* L.) como alternativa alimenticia para rumiantes. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, *13(2)*, 1-6. <https://doi.org/10.24188/recia.v13.n2.2021.839>
- Villamizar, Y. L., Rodríguez, J. S., & León, L. C. (2017). Caracterización fisicoquímica, microbiológica y funcional de harina de cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.) variedad CCN-51. *Cuaderno Activa*, *9*, 65-75. <http://ojs.tdea.edu.co/index.php/cuadernoactiva/article/view/421/493>
- Wang, H., & Chu, P. K. (2013). Surface characterization of biomaterials. En *Elsevier eBooks* (pp. 105-174). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-415800-9.00004-8>

- Wang, S., Dai, G., Yang, H., & Luo, Z. (2017). Lignocellulosic Biomass Pyrolysis Mechanism: A State-of-the-art review. *Progress in Energy and Combustion Science*, 62, 33-86. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2017.05.004>
- Woiciechowski, A. L., Neto, C. J. D., Vandenberghe, L. P. d. S., Neto, D. P. d. C., Sydney, A. C. N., Letti, L. A. J., Karp S. G., Torres, L. A. Z., and Soccol, C. R. (2020). "Lignocellulosic biomass: Acid and alkaline pretreatments and their effects on biomass recalcitrance – conventional processing and recent advances," *Bioresource Technology* 304, 1-9. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.122848
- Worthington, C. C., Worthington, V., & Worthington, A. (2019). *INTRODUCTION TO ENZYMES*. Worthington Biochemical Corporation. <https://www.worthington-biochem.com/sites/default/files/2022-03/Enzymes.pdf>
- Wu, W., Li, P., Huang, L., Wei, Y., Li, J., Zhang, L., & Jin, Y. (2023). The Role of Lignin Structure on Cellulase Adsorption and Enzymatic Hydrolysis. *Biomass*, 3(1), 96-107. <https://doi.org/10.3390/biomass3010007>
- Yaya, O. L., Appiah, K. E. K., Soro, D., Yao, B., Didier, F. G., Drogui, A. P., & Tyagi, D. R. (2023). Optimization of thermochemical hydrolysis of potassium hydroxide-delignified cocoa (*Theobroma cacao* L) pod husks under Low combined severity Factors (CSF) conditions. *Scientific African*, 22, 01908. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2023.e01908>
- You, C., Liu, Y., Cui, Q., & Feng, Y. (2023). Glycoside Hydrolase Family 48 Cellulase: A Key Player in Cellulolytic Bacteria for Lignocellulose Biorefinery. *Fermentation*, 9(3), 204. <https://doi.org/10.3390/fermentation9030204>

- Yousuf, A., Pirozzi, D., & Sannino, F. (2020). Fundamentals of lignocellulosic biomass. En *Elsevier eBooks* (pp. 1-15). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815936-1.00001-0>
- Yu, N., Ketya, W., Choi, E. H., & Park, G. (2022). Plasma promotes fungal cellulase production by regulating the levels of intracellular NO and CA<sup>2+</sup>. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12), 6668. <https://doi.org/10.3390/ijms23126668>
- Zelada, L. E. (2021). *Evaluación de deslignificación de raquis de banano para la elaboración de pasta celulósica* [Trabajo de grado]. Universidad del Valle de Guatemala. <https://repositorio.uvg.edu.gt/handle/123456789/4306>
- Zhang, Y., & Chen, Q. (2020). Improving measurement of reducing sugar content in carbonated beverages using Fehling's reagent. *Journal Of Emerging Investigators*, 2, 1-6. <https://doi.org/10.59720/20-009>
- Zoghalmi, A., & Paës, G. (2019). Lignocellulosic Biomass: Understanding Recalcitrance and Predicting Hydrolysis. *Frontiers in chemistry*, 7, 874. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00874>

## ANEXOS

**Figura 23.***Hoja de especificación para Carezyme 1000L*

<b>SIGMA-ALDRICH®</b>		<small>sigma-aldrich.com</small>
		<small>3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA Website: <a href="http://www.sigmaaldrich.com">www.sigmaaldrich.com</a> Email USA: <a href="mailto:techserv@sial.com">techserv@sial.com</a> Outside USA: <a href="mailto:eurtechserv@sial.com">eurtechserv@sial.com</a></small>
<b>Product Specification</b>		
Product Name: Cellulase from Aspergillus sp. - aqueous solution		
<b>Product Number:</b>	<b>C2605</b>	
CAS Number:	9012-54-8	
MDL:	MFCD00081510	
Storage Temperature: 2 - 8 °C		
<b>TEST</b>	<b>Specification</b>	
<hr/>		
Note	-----	
Carezyme is a registered trademark of Novozymes Corp.		
Activity	≥ 1000	
Enzymatic activity units/g; Cellulase Units		
Specification: PRD.1.ZQ5.10000011243		

**Fuente:** Sigma Aldrich (2024).**Figura 24.***Hoja de especificación para Cellic CTec2*

<b>SIGMA-ALDRICH®</b>		<small>sigma-aldrich.com</small>
		<small>3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA Website: <a href="http://www.sigmaaldrich.com">www.sigmaaldrich.com</a> Email USA: <a href="mailto:techserv@sial.com">techserv@sial.com</a> Outside USA: <a href="mailto:eurtechserv@sial.com">eurtechserv@sial.com</a></small>
<b>Product Specification</b>		
Product Name: Cellulase, enzyme blend		
<b>Product Number:</b>	<b>SAE020</b>	
Storage Temperature: 2 - 8 °C		
<b>TEST</b>	<b>Specification</b>	
<hr/>		
Hydrolysis	≥ 1000	
Units/gram		
Density	1.0 - 1.3 g/ml	
Specification: PRD.0.ZQ5.10000077797		

**Fuente:** Sigma Aldrich (2024).

**Figura 25.**

*Degradación del sustrato por parte de Cellic CTec2 y Carezyme 1000L*



**Fuente:** Autoras.