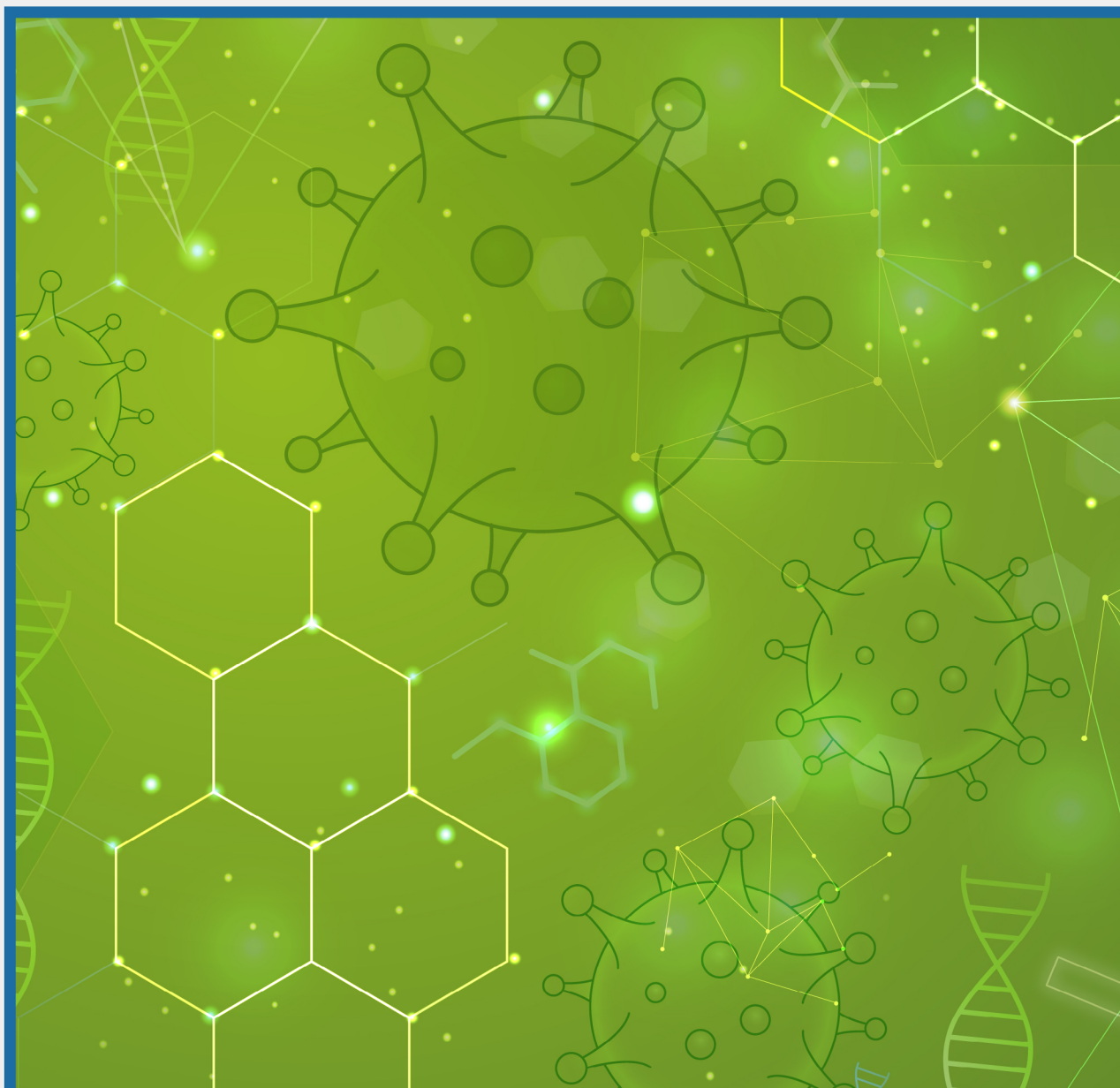


# Bi**o**tecnología

REVISTA CIENTÍFICA

Volumen 1 - número 1, Diciembre 2023



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MACHALA 2023

# Bitecnología

REVISTA CIENTÍFICA

Volumen 1, número 1, Diciembre 2023

Los artículos de la presente edición pueden consultarse en:  
<https://investigacion.utmachala.edu.ec/revistas/index.php/biotecnologia>

## **Revista Científica de Biotecnología**

Revista científica de Biotecnología es una revista de publicación científica con proyección internacional ligada a la Facultad de Ciencias Químicas y de la Salud de la Universidad Técnica de Machala que tiene como propósito principal la difusión y el intercambio de estudios de acceso abierto que publica artículos originales e inéditos de otros autores.

La revista Biotecnología utiliza el sistema de revisión externa por expertos facilitando su indexación en algunas de las principales bases de datos nacionales e internacionales garantizando una mayor difusión de los artículos publicados. Basándonos en el constructo teórico y bibliográfico que se lleven a cabo en los aspectos más relevantes en la Ciencias de la Biotecnología.

De esta manera se caracteriza por su apertura epistemológica y metódica en la construcción del saber científico, que se pueden alcanzar y transmitir a partir de la revisión y los trabajos que puedan ser realizados en esta revista. La cual estará dirigida a profesionales interesados en indagar temas de actualidad vinculados a las diferentes disciplinas relacionadas en procesos y productos que se puedan obtener a partir de biotecnología.

## **Sistema de arbitraje**

El proceso de arbitraje se realiza en tres etapas, las cuales se describen a continuación:

**Revisión preliminar:** durante esta fase, el editor evalúa si el manuscrito cumple con los criterios de formalidad del texto y actualidad temática. De ser favorable la valoración, el proceso de arbitraje sigue su curso. En caso contrario, el manuscrito es devuelto al investigador con las observaciones del caso.

**Evaluación por pares externos:** en esta fase el Editor temático revisa la especificidad temática y asigna los árbitros más convenientes. Este proceso se realiza en la modalidad doble ciego. Cada evaluador hace uso de un formulario para expresar su opinión respecto a la factibilidad de publicación del manuscrito. En caso de no haber convergencia en las decisiones de los árbitros, el manuscrito es sometido a una tercera revisión y con base en la congruencia, de al menos dos árbitros, se emite el fallo correspondiente: a) Se recomienda la publicación (aceptado); b) Se recomienda la publicación tras realizar las modificaciones; c) Se recomienda no publicar.

**Certificación de resultados:** la revista emitirá certificado de aprobación del artículo, una vez constatado el cumplimiento de los requerimientos de forma y fondo al que hubiere lugar, en aras de que el autor del manuscrito pueda fundamentar las gestiones administrativas vinculadas con la publicación de sus resultados de investigación.

## **Edición**

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MACHALA

Dirección: Av. Panamericana Km. 5 1/2 vía Machala - Pasaje

Teléfono: 593 7 2983 362

[www.utmachala.edu.ec](http://www.utmachala.edu.ec)

E-mail: [utmachala@utmachala.edu.ec](mailto:utmachala@utmachala.edu.ec)

Periodicidad: Anual

Machala, Ecuador, Diciembre 2023

# Bi**o**tecnología

REVISTA CIENTÍFICA

Volumen 1, número 1, Diciembre 2023

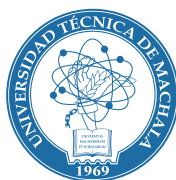
## **Autoridades Universitarias**

Jhonny Pérez Rodríguez, Ph.D.  
**Rector**

Rosemary Samaniego Ocampo, Ph.D.  
**Vicerrectora Académica**

Luis Brito Gaona, Ph.D.  
**Vicerrector de Investigación, Vinculación y Posgrado**

Irene Sánchez González, Ph.D.  
**Vicerrectora Administrativo**



Universidad Técnica de Machala

## **Editor**

**Hugo Romero Bonilla** / FCQS - Universidad Técnica de Machala, Ecuador.

## **Editores temático**

**Alexander Moreno Herrera** / Universidad Técnica de Machala, Ecuador.

**María del Carmen Veiga Barbazán** / Universidad de la Coruña, España

**José Humberto Ayala Armijos** / Universidad Técnica de Machala, Ecuador.

## **Consejo Editorial**

**Irán Rodríguez Delgado**, Universidad Técnica de Machala, Ecuador.

**Javier Enrique Sánchez Velasco**, Empresa Heifer, México.

**Jericó Jabín Bello-Bello**, CONACyT, México.

**Alfredo Campoverde Cisneros**, Universidad de Cuenca, Ecuador.

## **Equipo Técnico de publicación**

**Karina Lozano Zambrano** / UTMACH

Coodinación editorial.

**Edison Mera León** / UTMACH

Diseño y diagramación

## **Correspondencia**

Para las suscripciones, canje, donación y correspondencia, dirigirse al Dr. Hugo Romero Bonilla, Editor de la Revista Científica de Biotecnología de la Universidad Técnica de Machala Machala, Provincia de El Oro, Ecuador

Dirección electrónica: [rbiotecnologia@utmachala.edu.ec](mailto:rbiotecnologia@utmachala.edu.ec)

URL: <https://investigacion.utmachala.edu.ec/revistas/index.php/biotecnologia/about>

# Contenido

Explorando el potencial biotecnológico de las combinaciones de lixiviados de rellenos sanitarios en la ciudad de Machala.....	9
Aguilar, G.; Encalada, J.; Quiñonez, A.; Paredes, H.	
Aislamiento de Pseudomonas del estero El Macho para la remoción de arsénico en agua sintética.....	19
Choez, C.; Tapia, E.	
Evaluación sensorial de una bebida láctea fermentada a base de piña ( Ananas Comosus L.).....	27
Sánchez, E.; Cedeño, K.; Sánchez, F.; Cevallos, R.	
Técnicas de machine learning aplicadas a la producción de bioetanol a partir de la caracterización de biomasa lignocelulósico (Theobroma cacao L.).....	41
Basuri, G.; Velarde, M.; García, Y.	
Obtención de un edulcorante funcional (celobiosa) a partir de Gossypium hirsutum, para uso de personas con hiperglicemia.....	61
Machuca, G.; Ayala, H.; Siguenza, J.; Beltran, C.; Armijos, G.	

---

# Presentación

Hugo Romero Bonilla Ph.D.  
Editor de la Revista Científica de Biotecnología

La Revista Científica de Biotecnología es una publicación con periodicidad anual, arbitrada, perteneciente a la Universidad Técnica de Machala, Ecuador. Entre sus principales objetivos se encuentran, el impulsar la difusión de los avances científicos y tecnológicos relacionados con la bioingeniería, biomedicina, biocatálisis, ingeniería bioquímica, biomateriales, bioprocesos, biotecnología industrial, biología molecular, nanobiotecnología, biotecnología vegetal, fermentaciones, bioenergía, biocombustibles, biohidrógeno, biofertilizantes, bioeconomía, biotecnología ambiental, química verde entre otros.

En el presente documento se publican artículos de divulgación, ensayos, apuntes técnicos, noticias y actividades en estas áreas del conocimiento. Todos los manuscritos se evalúan sobre la base del rigor metodológico, científico y los estándares éticos, por al menos dos revisores.

Dada la biodiversidad, la biomasa, los bioresiduos, la contaminación ambiental, el potencial agropecuario y bioenergético con que cuenta Ecuador y la Provincia de El Oro, así como, la aparición de nuevos virus con sus variantes, enfermedades catastróficas, las necesidades de mitigación del cambio climático y el calentamiento global, la sostenibilidad ambiental, industrial y socioeconómica del planeta, este documento se convierte en una referencia obligada en nuestro país, latinoamérica y el mundo actual en las líneas de investigación propuestas.

Esperamos cumplir con las expectativas de nuestros autores y lectores, así como también, esperamos que los artículos publicados cuenten con un mayor aporte a los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la Organización de las Naciones Unidas que permita dar un giro al futuro incierto de la humanidad.





# Explorando el potencial biotecnológico de las combinaciones de lixiviados de rellenos sanitarios en la ciudad de Machala

Biotechnological potential of mixtures of leachate from Sanitary landfills of the city of Machala

**Geovanny Joel Aguilar Tibanta**

Universidad Técnica de Machala

joeltibanta14@gmail.com

ORCID: 0009-0001-4545-5565

**Jenner Stalin Encalada Bravo**

Universidad Técnica de Machala

jenerencalada23@gmail.com

ORCID: 0009-0001-3187-980X

**Héctor Daniel Paredes Armijos**

Universidad Técnica de Machala

hectorarm23@gmail.com

ORCID: 0009-0007-4559-8121

Revista Científica de Biotecnología Vol.1 N°1

Versión electrónica

<https://investigacion.utmachala.edu.ec/revistas/index.php/biotecnologia>

## RESUMEN

La inadecuada administración de los residuos sólidos urbanos es un peligro social. Analizando la combinación de lixiviados de vertederos y residuos orgánicos logramos las condiciones óptimas para producir metano como fuente de energía sostenible. Nos enfocamos en determinar la distribución óptima de lixiviado y materia orgánica en cada biorreactor para maximizar la generación de metano gracias a las reacciones de descomposición anaeróbicas en la metanogénesis. Logrando resultados eficientes con cada Biorreactor, un claro ejemplo es el biorreactor Numero 1 donde obtuvimos la mayor eficiencia. Estos avances tendrán un impacto positivo en la gestión de residuos sólidos aportando una reducción de la contaminación al poder conocer las condiciones óptimas de generación del biogás en un entorno controlado, lo cual impulsará la energía amigable en los sectores con exceso de desechos contaminantes.

**Palabras clave:** Residuos Sólidos Urbanos (RSU), metanogénesis, contaminación ambiental.

## ABSTRACT

Inadequate management of urban solid waste poses a social hazard. Through the analysis of the combination of landfill leachate and organic waste, we have achieved optimal conditions for methane production as a sustainable energy source. Our focus was on determining the optimal distribution of leachate and organic matter in each bioreactor to maximize methane generation through anaerobic decomposition reactions in methanogenesis. We achieved efficient results with each bioreactor, with a prime example being bioreactor Number 1, where we obtained the highest efficiency. These advancements will have a positive impact on solid waste management by contributing to a reduction in environmental pollution. By understanding the optimal conditions for biogas generation in a controlled environment, this research will drive the adoption of eco-friendly energy solutions in areas burdened by excessive pollutant waste.

**Keywords:** Urban Solid Waste (USW), methanogenesis, environmental pollution.

## INTRODUCCIÓN

“La administración de residuos sólidos domiciliarios representa un gran problema creciente tanto ambiental como social en la actualidad, no solo afectando a nuestra ciudad, provincia o país, siendo este un fenómeno mundial. En la Estrategia Ambiental Nacional (Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente [CITMA], s/f)”, desarrollada por el CITMA, “se identifican los principales problemas que afectan el medio ambiente en Cuba, entre los que resalta la gestión ineficiente de los RSU, siendo esta una de las problemáticas que aparecen, también, en la Estrategia Ambiental de Ciudad de La Habana (Ministerio De Ciencia & Ambiente, 2004)”.

“La creación de rellenos sanitarios municipales aparece como respuesta a la sobreproducción de residuos sólidos que contaminan los alrededores, mayoritariamente las áreas urbanas, lo que produce impactos negativos en el entorno y la calidad de vida dentro de las comunidades (Rodríguez et al., 2005)”.

“El tratamiento inadecuado que estos residuos reciben en los vertederos sanitarios da como resultado la formación de lixiviados, estos son líquidos altamente contaminantes que en su mayor parte contienen una mezcla de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos, produciendo problemas a la hora de su recolección disposición y generando riesgos ambientales (Benton, 2013)”.

La desmesurada acumulación de basura sin un control eficaz contribuye a la propagación de enfermedades transmitidas por vectores, generaciones de gases de efecto invernadero y un deterioro del paisaje a nivel global. (Polhland & Harper, 1985).

Como solución al problema en la administración y gestión de lixiviados en vertederos, se han explorado diversas estrategias para obtener beneficios gracias al potencial biotecnológico que puede producirse a partir del biogás generado por los mismos lixiviados. El biogás, es conocido como una fuente renovable y sostenible de energía amigable, se obtiene mediante la digestión anaeróbica de la materia orgánica presente en los residuos, con el metano como principal producto, obteniendo también otros subproductos beneficiosos (Themelis & Ulloa, 2007; Gómez & Filigrana, 2008).

El poder utilizar los lixiviados de vertederos como sustrato para la producción de metano, es esta una forma de aprovechar dichos desperdicios y mejorar la eficiencia en la generación del biogás. Para conseguirlo, es primordial entender las condiciones operativas específicas, como lo son la composición de la mezcla, temperatura y pH, estos desempeñan un papel fundamental en la producción de metano (Themelis & Ulloa, 2007).

El proceso de producción de biogás se desarrolla en etapas anaeróbicas, que incluyen la hidrólisis, la acidogénesis, la acetogénesis y la metanogénesis, donde se forma el metano. Mantener condiciones anaeróbicas en todo el proceso es fundamental para el funcionamiento eficiente de las bacterias y arqueas involucradas. El control de la temperatura y el pH también es esencial para garantizar un rendimiento óptimo (Camargo & Vélez, 2009).

El biogás resultante está compuesto principalmente por metano (CH<sub>4</sub>), que representa entre el 50% y el 75% en volumen, junto con dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) en un rango del 25% al 45%. También contiene pequeñas cantidades de otros gases, como hidrógeno (H<sub>2</sub>), nitrógeno (N<sub>2</sub>), oxígeno (O<sub>2</sub>), vapor de agua y ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S) (Tobares, 2013).

En este contexto, la fermentación metanogénica puede emplear diversas materias primas orgánicas, incluyendo residuos vegetales, animales, agroindustriales, forestales y domésticos. Estos residuos abarcan desde estiércol y residuos de mataderos hasta residuos de pescado. Además del carbono y el nitrógeno, el proceso requiere un equilibrio de sales minerales, que suelen estar presentes en proporciones adecuadas en estiércoles y lodos cloacales (Cortés Rangel, 2021).

El enfoque en la utilización de materia orgánica, en particular las heces de vaca, busca optimizar la producción de metano como biogás. Esta investigación analiza los factores que influyen en la producción de metano, los métodos de análisis de la composición de las heces y las estrategias para mejorar el proceso, con el objetivo de aprovechar al máximo este recurso valioso y abordar eficazmente la gestión de residuos sólidos en la actualidad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En este estudio, evaluamos el potencial biotecnológico de mezclar lixiviados de relleno sanitario con heces de vaca mediante un proceso de fermentación anaerobia. Este proceso implica varias etapas en las cuales diversos grupos microbianos desempeñan un papel crucial. Cada grupo microbiano utiliza los productos generados por el metabolismo de los microorganismos responsables como sustrato. Cada uno de estos grupos tiene condiciones óptimas específicas para su crecimiento y desarrollo adecuado. Es importante destacar que el control cuidadoso de las condiciones globales de operación es esencial para permitir que todos los grupos microbianos estén activos simultáneamente.

El equilibrio entre la velocidad de generación de productos por un grupo microbiano y la velocidad de consumo de esos productos por el siguiente grupo en el proceso es clave para maximizar la producción de metano y, en última instancia, determinar el potencial biotecnológico de estas mezclas en la generación de gases.

Para llevar a cabo este estudio, utilizamos biorreactores de tipo batch estático y un dispositivo de cromatografía de gases FID (Detector Ionizador de Flama) F19790II. Se emplearon frascos de 500 ml como biorreactores individuales, cada uno llenado con una mezcla específica de heces de vaca y lixiviados de rellenos sanitarios de la ciudad de Machala hasta alcanzar un volumen de 300 ml.

#### **Selección de la Tecnología y Tipo de Biorreactor:**

Con el objetivo de simular de manera fiel los procesos observados en los rellenos sanitarios y garantizar condiciones adecuadas en el laboratorio, se optó por utilizar el siguiente sistema:

**Sistema de Biorreactores de Tipo Batch Estático:** Se eligió este sistema debido a su simplicidad y economía. En este enfoque, los biorreactores se llenaron con cuidado con las mezclas de lixiviados de relleno sanitario y heces de vaca. Una vez completada la etapa de digestión, se analizaron los gases resultantes utilizando el dispositivo de cromatografía de gases FID F19790II.

Se llevaron a cabo un total de seis experimentos diferentes, cada uno utilizando una composición de mezcla distinta en los biorreactores, todos dentro de un entorno controlado.

Tabla 1. Composición y Condiciones de Mezclas en los Biorreactores, 2023

<b>Biorreactor</b>	<b>Composición de Mezcla de Lixiviados y Heces de Vaca</b>	<b>pH del Lixiviado</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Días</b>
Biorreactor 1	70% de lixiviado (mezcla de lixiviados maduro y joven 70/30) y 30% de heces de vaca.	7	Temperatura Ambiente (25°C)	10
Biorreactor 2	70% de lixiviado joven y 30% de heces de vaca.	7	Temperatura Ambiente (25°C)	10
Biorreactor 3	60% de lixiviado maduro y 40% de heces de vaca.	7	Temperatura Ambiente (25°C)	10
Biorreactor 4	50% de lixiviado joven y 50% de heces de vaca.	7	Temperatura Ambiente (25°C)	7
Biorreactor 5	70% de lixiviado maduro y 30% de heces de vaca.	7	Temperatura Ambiente (25°C)	7
Biorreactor 6	50% de lixiviado joven y 50% de heces de vaca.	7	Temperatura Ambiente (25°C)	7

Para llevar a cabo este estudio, se realizaron recopilaciones separadas de las fracciones de residuos, específicamente, se obtuvieron los lixiviados de vertederos y las heces de vaca. Es importante destacar que se ajustaron los niveles de pH utilizando ácido cítrico para alcanzar el pH óptimo de 7. Los lixiviados de vertederos se recopilaron en un vertedero ubicado en Ceibales, en la ciudad de Machala, mientras que las muestras de heces de vaca se recolectaron en las áreas de la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

La recolección de estas fracciones de residuos se realizó siguiendo procedimientos de recolección y almacenamiento, cuidadosamente diseñados y aplicando prácticas adecuadas de manejo de muestras. Este proceso de recolección permitió asegurar que las fracciones de residuos se mantuvieran

separadas y se conservaran de manera adecuada antes de su uso en los biorreactores para la investigación.

Tabla 2. Proporciones Másicas en gramos(g) de Componentes en los Biorreactores, 2023

Biorreactor	Lixiviado Joven (g)	Lixiviado Maduro (g)	Heces de Vaca (g)
Biorreactor 1	63g	147g	90g
Biorreactor 2	210g	0g	90g
Biorreactor 3	0g	120g	180g
Biorreactor 4	150g	0g	150g
Biorreactor 5	0g	210g	90g
Biorreactor 6	150g	0g	150g

Las proporciones detalladas en la tabla representan las combinaciones específicas de componentes utilizadas en cada uno de los biorreactores de esta investigación. Estas proporciones fueron diseñadas cuidadosamente para investigar el impacto de diferentes mezclas de lixiviado joven, lixiviado maduro y heces de vaca en la producción de metano.

Es importante destacar que el volumen total en cada biorreactor se mantuvo constante en 300 gramos, lo que garantiza una comparación justa y precisa entre los diferentes experimentos. Las proporciones específicas reflejan la variabilidad en la composición de las mezclas y se seleccionaron con base en los objetivos de este estudio.

Los resultados obtenidos de estos biorreactores proporcionarán información valiosa sobre cómo las diferentes proporciones de componentes afectan la generación de metano, lo que contribuirá al entendimiento de los procesos de digestión anaerobia en sistemas similares a los rellenos sanitarios.

## RESULTADOS

Tabla 3. Concentraciones de Metano y Dióxido de Carbono en Biorreactores (Días 1,2,3), 2023

Biorreactor	Fecha	Metano (%)	Dioxido de carbono (%)
Biorreactor 1	22-25/08/2023	10.00	25.11
Biorreactor 2	22-25/08/2023	36.7	43.11
Biorreactor 3	22-25/08/2023	21	68.68
Biorreactor 4	22-25/08/2023	-	31.80
Biorreactor 5	22-25/08/2023	-	24.57
Biorreactor 6	22-25/08/2023	-	35

En la Tabla 3, se muestran los valores del parámetro % Metano y % Dióxido de Carbono, evidenciando que el biorreactor 2 tuvo el mejor resultado en relación al metano.

Tabla 4. Concentraciones de Metano y Dióxido de Carbono en Biorreactores (Días 4,5,6,7), 2023

Biorreactor	Fecha	Metano (%)	Dioxido de carbono (%)
Biorreactor 1	25-29/08/2023	43.24	14.27
Biorreactor 2	25-29/08/2023	24.52	58.52
Biorreactor 3	25-29/08/2023	45.01	38.76
Biorreactor 4	25-29/08/2023	17.17	61.72
Biorreactor 5	25-29/08/2023	1.94	61.63
Biorreactor 6	25-29/08/2023	14.21	51.17

En la Tabla 4, se muestran los valores del parámetro % Metano y % Dióxido de Carbono, evidenciando que el biorreactor 1 tuvo el mejor resultado en relación al metano.

Tabla 5. Concentraciones de Metano y Dióxido de Carbono en Biorreactores (Días 8,9,10), 2023

Biorreactor	Fecha	Metano (%)	Dioxido de carbono (%)
Biorreactor 1	29-01/09/2023	72.15	19.62
Biorreactor 2	29-01/09/2023	71	21
Biorreactor 3	29-01/09/2023	62.6	78.91
Biorreactor 4	29-01/09/2023	51.04	42.72
Biorreactor 5	29-01/09/2023	-	-
Biorreactor 6	29-01/09/2023	7.21	62.68

En la Tabla 5, se muestran los valores del parámetro % Metano y % Dióxido de Carbono, evidenciando que el biorreactor 1 tuvo el mejor resultado en relación al metano.

Tabla 6. Concentración de Volumen en los Biorreactores (7 Días) 2023

Fecha	Biorreactor 1	Biorreactor 2	Biorreactor 3	Biorreactor 4	Biorreactor 5
22/08/2023	400ml	500ml	300ml	200ml	1550ml
23/08/2023	600ml	550ml	450ml	400ml	200ml
24/08/2023	200ml	450ml	100ml	250ml	50ml
25/08/2023	200ml	500ml	200ml	300ml	250ml
26/08/2023	400ml	450ml	500ml	475ml	250ml
27/08/2023	700ml	250ml	100ml	450ml	200ml
28/08/2023	50ml	300ml	300ml	250ml	450ml

En la Tabla 6, se muestran los valores del volumen generado por los gases, evidenciando que el biorreactor 2 tuvo el mejor resultado en relación a la eficiencia y producción.

## DISCUSIÓN

La variabilidad en las concentraciones de metano y dióxido de carbono en los biorreactores se vuelve aún más esclarecedora cuando consideramos la composición y las condiciones de mezcla de los sustratos.

En el primer muestreo, el biorreactor 2 mostró una concentración significativamente alta de metano, a pesar de recibir una cantidad sustancial de heces de vaca. Esto podría explicarse por su mezcla de lixiviado joven, que podría contener una comunidad microbiana más eficiente en la producción de metano. Además, el biorreactor 1, que también recibió heces de vaca, mostró un aumento significativo en la concentración de metano con respecto al muestreo anterior. La mezcla de lixiviado maduro y joven (70/30) en este biorreactor podría haber favorecido el crecimiento de microorganismos metalogénicos.

En el segundo muestreo, se observa una disminución en la concentración de metano en el biorreactor 2, a pesar de recibir una cantidad constante de heces de vaca. Esto podría sugerir cambios en la comunidad microbiana debido a la introducción de lixiviado joven en lugar de la mezcla 70/30 utilizada anteriormente.

En el tercer muestreo, el biorreactor 1 continuó mostrando una alta concentración de metano, lo que podría estar relacionado con su mezcla de lixiviado maduro y joven. Sin embargo, el biorreactor 3, que recibió una mezcla de lixiviado maduro y heces de vaca, mostró una concentración de metano significativamente más baja en comparación con los dos muestreos anteriores. Esto indica que la composición de la mezcla puede tener un impacto directo en la producción de metano, y que una mayor proporción de lixiviado maduro podría no ser beneficiosa en este caso.

Las condiciones de pH y temperatura en los biorreactores se mantuvieron constantes en la mayoría de los casos, lo que sugiere que estos factores no son la principal causa de las variaciones en la producción de metano observadas en los muestreos.

Respecto al volumen los datos de los biorreactores a lo largo de siete días muestran fluctuaciones significativas en los volúmenes del gas. Cada biorreactor tiene su propia dinámica de cambios en el volumen, lo que puede indicar variaciones en los procesos de producción o demanda. La estabilidad del Biorreactor 2 sugiere un proceso de producción más controlado y el más eficiente, mientras que los cambios en otros biorreactores pueden indicar desafíos en la planificación de la producción y la necesidad de ajustes en los flujos de entrada y salida para optimizar la eficiencia de producción.



## CONCLUSIÓN

El seguimiento de este estudio respalda la importancia crítica de la composición de la mezcla de sustratos en la producción de metano en biorreactores. La mayor eficiencia en la producción de metano se logró en el biorreactor que utilizó una mezcla compuesta por un 70% de lixiviado maduro y un 30% de heces de vaca en el tercer muestreo. Esto destaca la influencia significativa de la proporción específica de lixiviado joven y maduro en la producción de metano.

Además, se destacó la adaptabilidad de las comunidades microbianas en los biorreactores a lo largo del tiempo, lo que sugiere la capacidad de estas comunidades para ajustarse a condiciones cambiantes. Sin embargo, también se observaron fluctuaciones en la producción de metano en algunos biorreactores, lo que destaca la importancia de un monitoreo continuo y la optimización de las condiciones de operación.

En cuestión del volumen obtenido los datos resaltan la necesidad de adaptarse a las fluctuaciones en la producción y tomar medidas para optimizar la gestión de los biorreactores, pero se obtuvo información muy valiosa.

En última instancia, estos hallazgos resaltan la importancia de la composición de la mezcla de sustratos y el control de las condiciones de operación en la producción de metano en biorreactores. Para lograr un rendimiento óptimo en la producción de biogás, es esencial considerar cuidadosamente la selección de la mezcla de sustratos y realizar ajustes basados en un monitoreo continuo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENTON- J. y SHORT, Cities and Nature, University of Oxon. Estados Unidos: Routledge. 2013, pp.379.
- Camargo, Y. & Vélez, A. (2009). Emisiones de Biogás producidas en rellenos sanitarios. *II Simposio Iberoamericano de ingeniería de residuos*. REDISA. UNIVERSIDAD DEL NORTE
- Cortés Rangel, R. J. (2021). *Identificación de las condiciones fisicoquímicas de un biodigestor anaerobio y de los lodos que se generan en la producción de biogás a partir de residuos orgánicos domésticos*.
- Gómez, R.S., Filigrana, P.A. (2008). Descripción de la calidad del aire en el área de influencia del Botadero de Navarro, Cali, Colombia. *Colombia Médica*. Vol 39(3): 245-252
- Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente. CITMA. *Estrategia Ambiental Nacional*. Ciudad de La Habana, Cuba, 27, 1999 12.
- Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente. *CITMA Estrategia Ambiental de Ciudad de La Habana, Ciudad de La Habana, Cuba, 2004*.
- Pohland, F.G., Harper, S.R. (1985). Critical review and summary of leachate and gas production from landfills, EPA/600/2-86/073.
- Rodríguez G.S., Sauri R.M. Peniche A.I. (2005). Aerotransportables viables en el área de tratamiento y disposición final de residuos sólidos municipales de Mérida, Yucatán. *Ingeniería Revista Académica*, 9(3):19-29.
- RODRÍGUEZ, CONTRERAS J.C. *Manejo Integral de Residuos Sólidos Urbanos Domiciliarios en Colombia Mitos y Realidades*. Tesis inéditas Universidad Militar Nueva Gerona. Bogotá 2015. pp. 3
- Themelis, N. J., & Ulloa, P. A. (2007). Methane generation in landfills. *Renewable energy*, 32(7), 1243-1257.
- Tobares, L. (2013). La importancia y el futuro del biogás en la Argentina. *Petrotecnia*, 68-74.

# Aislamiento de Pseudomonas del estero El Macho para la remoción de arsénico en agua sintética

## Isolation of Pseudomonas from the El Macho estuary for Arsenic Water Treatment

**Cristopher Manuel Choez Tobo**

Universidad Técnica de Machala

cchoez1@utmachala.edu.ec

ORCID: 0009-0004-5761-6161

**Eliana Milagros Tapia-Galarza**

Universidad Técnica de Machala

etapia2@tmachala.edu.ec

ORCID: 0009-0007-0391-118

Revista Científica de Biotecnología Vol.1 N°1

Versión electrónica

<https://investigacion.utmachala.edu.ec/revistas/index.php/biotecnologia>

## RESUMEN

El arsénico es un metaloide presente en el agua y está asociado a la actividad de extracción de metales preciosos como residuo, que puede migrar fácilmente al medio ambiente y representar un riesgo para la salud humana. La exposición prolongada al arsénico en el agua potable y fuentes de agua se ha vinculado con cánceres y enfermedades no cancerosas. Por otro lado, la *Pseudomona aeruginosa* es una bacteria que ha demostrado adaptarse a diferentes condiciones ambientales y puede utilizar una amplia gama de compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía. El estudio se enfoca en la capacidad de una solución de *P. aeruginosa* para eliminar arsénico en soluciones de agua sintética. Los resultados indican que, después de tres días de exposición, este tratamiento logró reducir la concentración de arsénico de 0.1ppm a 0.05ppm lo que sugiere un potencial efectivo para la eliminación de arsénico en aplicaciones prácticas futuras.

**Palabras clave:** Biorremediación, arsénico, *Pseudomona*, contaminación.

## ABSTRACT

Arsenic is a metalloid found in water and is associated with precious metal extraction activities as a residue, which can easily migrate to the environment and pose a risk to human health. Prolonged exposure to arsenic in drinking water and water sources has been linked to cancers and non-cancerous diseases. On the other hand, *Pseudomonas aeruginosa* is a bacterium that has demonstrated its ability to adapt to various environmental conditions and can utilize a wide range of organic compounds as a source of carbon and energy. The study focuses on the capability of a *P. aeruginosa* solution to remove arsenic from synthetic water solutions. The results indicate that, after three days of exposure, this treatment successfully reduced the arsenic concentration from 0.1 ppm to 0.05 ppm, suggesting effective potential for arsenic removal in future practical applications.

**Keywords:** Bioremediation, arsenic, *Pseudomonas*, contamination.

## INTRODUCCIÓN

### Arsénico

El arsénico es un metaloide que se encuentra en promedio entre 2 y 5 mg/kg en el suelo y está asociado principalmente con rocas volcánicas y sedimentarias en forma de compuestos inorgánicos, es un elemento altamente tóxico que causa diferentes enfermedades (Salas et al, 2020). Se combina con otros elementos como el oxígeno, el cloro o el azufre para formar compuestos de As inorgánico y orgánico con hidrógeno o carbono. Así, los compuestos de As se pueden clasificar en 3 grupos: inorgánicos, orgánicos y gas arsina. (Magdalena Montalva Redon, 2016).

La distribución y contaminación del arsénico son causadas por procesos naturales y provocados por el hombre, el problema es que migra fácilmente al medio ambiente. (Baird, C. 2018). Las altas concentraciones de arsénico en el agua y el suelo se han convertido en un problema mundial porque la exposición prolongada a este tipo de metal puede causar severos daños a la salud. (Edelweiss Rangel Montoya, 2015).

La disponibilidad de metales pesados en el suelo y a los ecosistemas acuáticos y en relativamente menor medida a la atmósfera en forma de partículas o vapores. Un aumento en su uso en la industria y la agricultura, así como en tecnología e incluso en compuestos para uso doméstico resultó en una mayor exposición humana este elemento. (de la Torre et al, 2021). Actualmente se acepta generalmente que la distribución, movilidad, biodisponibilidad y toxicidad de los elementos químicos no dependen de su concentración total, sino más bien de su forma química. (Juan José Vicente, 2010).

La exposición al arsénico en el agua potable se ha relacionado con cánceres de piel y viscerales, así como con efectos no cancerosos como diabetes, neuropatía periférica y enfermedades cardiovasculares (Barrera et al, 2020). Las personas pueden estar expuestas al arsénico a través de: Inhalación, ingesta de alimentos y bebida de agua, especialmente en algunos lugares donde el agua contiene minerales que contienen arsénico. (Herrera et al, 2014).

### *Pseudomonas*

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria gramnegativa que causa muchas infecciones se asocian principalmente con el entorno hospitalario, el potencial patogénico proviene de su producción, una serie de factores de virulencia, formación de biopelículas y resistencia antibióticos; vive en una variedad de ambientes, incluidos terrestres, acuáticos y animales, humano y relacionados con las plantas. (Zurita, 2018).

Schroeter aisló por primera vez *Pseudomonas aeruginosa* de muestras ambientales en 1872. Dado que las colonias de *P. aeruginosa* están pigmentadas, el nombre de la especie proviene de la palabra (*aeruginosa*), que significa "color cobre oxidado", refleja el característico color azul verdoso de las colonias debido a producción de pigmentos, este bacilo aeróbico gramnegativo es metabólicamente muy versátil, capaz de utilizar más de 80 compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía. Es oxidasa positiva y puede

crecer por encima de los 42°C, aunque las cepas se clasifican como estrictamente aeróbicas, algunas pueden crecer anaeróbicamente desnitrificando o fermentando compuestos como la arginina o el piruvato. (Lidia Ruiz Martínez, 2007).

Según Yosuke Tashiro et al (2013) *P. aeruginosa* causa enfermedades en plantas y animales. Por lo tanto, se sabe que esta bacteria es muy adaptable y tiene diferentes características fenotípicas que le permiten vivir en diferentes condiciones ambientales".

Según Wibowo et al (2020) *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno humano oportunista que causa infecciones agudas y crónicas devastadoras en personas inmunodeprimidas. Su notable persistencia en entornos clínicos se debe a su capacidad para formar biopelículas resistentes a los antibióticos.

En cuanto al tratamiento de este metal pesado, existen estudios globales donde los microorganismos juegan un papel fundamental. Debido a su exposición y a los compuestos derivados de Arsénico hay una presión selectiva para que los microorganismos adquieran diversos sistemas de tolerancia al metal. (Serrato y Cervantes, 2017). Dentro de los estudios de remoción de metales pesados se encontró que la *P. aeruginosa* puede remover en su totalidad y tolerar As en altas concentraciones. (Layza & Polo, 2018).

El objetivo de esta investigación es determinar los niveles de remoción de arsénico en solución acuosa sintética mediante el tratamiento con una solución bacteriana de *Pseudomonas Aeruginosa* a condiciones controladas de laboratorio para establecer un precedente en investigaciones con aplicaciones prácticas a futuro.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### ***Aislamiento de Pseudomonas aeruginosa***

Se tomó muestras de lodo del estero El Macho, ubicado en la ciudad de Machala, Ecuador. Se usó el lodo como inóculo para cultivar en agar cetrimide como medio de cultivo selectivo. Los inóculos fueron preparados diluyendo un gramo de muestra de lodo en 100 ml de agua destilada y agitados a 100 rpm durante 30 minutos para homogeneizar la solución. Luego de agitar se tomó 1ml de la solución y se diluyó en 9 ml de agua destilada. Se homogenizó la solución de 10ml y se toma 1ml para inocular en una caja Petri preparada con agar cetrimide, se realiza la siembra en 3 cajas Petri en total. Se incubó en una estufa las cajas a 45°C durante 3 días hasta observar un crecimiento bacteriano notable.

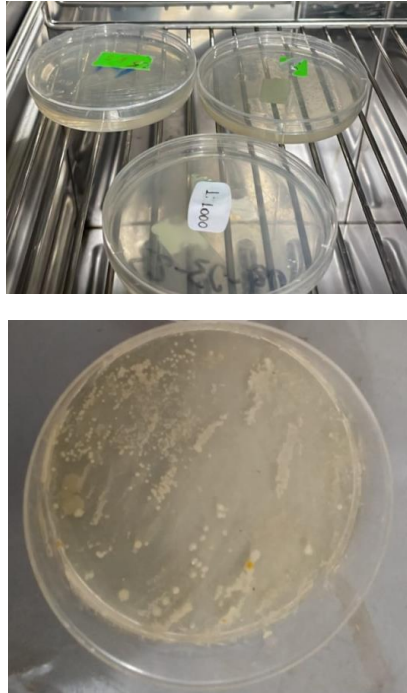


Figura 1 Aislamiento e incubación de *Pseudomonas Aeruginosa*

### **Incubación en caldo enriquecido**

Se preparó el caldo enriquecido en un matraz esterilizado de 500 ml y se mezcla 2g de polvo de caldo de gallina con 200 ml de agua destilada. Se lleva a ebullición al caldo durante 5 minutos y se vierten en recipientes estériles de vidrio de 15 ml.

Luego, con un ansa se realizó la siembra en el caldo enriquecido de las cajas con agar selectivo, se realiza un raspado superficial en un ambiente estéril y se siembra en el medio líquido. Los recipientes que contienen el caldo enriquecido y el inóculo se conservó a 45 °C durante 3 días.

### **Mezcla con arsénico**

A partir de una solución patrón de 10 ppm de As se prepara una solución de 0.2 ppm de As con agua destilada.

Después se toman 15 ml de la solución de As a 0.2 ppm y se mezcla con 15 ml del cultivo enriquecido en recipientes estériles. Se toma en cuenta que al diluir 15 ml de la solución 0.2 ppm de As con 15 ml de caldo enriquecido la concentración de arsénico baja a la mitad teniendo una concentración inicial nueva de 0.1 ppm.

Se incuba la mezcla en la estufa a 45 grados Celsius durante 3 días.

### **Determinación de arsénico**

Se utilizó un test de arsénico MQuant® siguiendo las especificaciones y procedimiento recomendado por el fabricante.



Figura 2 Test de arsénico MQuant®

## RESULTADO Y DISCUSIÓN

Se diluyó la muestra inicial de As 0.2 ppm a una concentración de 0.1 ppm y se midió con el test de As, corroborándose que efectivamente se encontraba a esa concentración mediante la colorimetría del test. Mientras que, al medir los niveles de arsénico del agua con el tratamiento de pseudomonas se obtuvo una lectura de 0.05 ppm.

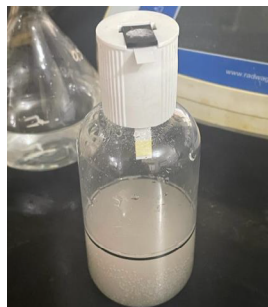


Figura 3 Determinación de arsénico en muestra usando el test de arsénico



Figura 4 Resultados del test de arsénico del patrón inicial y el agua tratada respectivamente.



Teniendo en cuenta que la concentración total de As en el agua antes del tratamiento fue de 0.1 ppm y que la concentración final de As después del tratamiento fue de 0.05 ppm se puede inferir que el tratamiento tiene una efectividad del 50% de reducción de As después de 72 horas de acción de las pseudomonas.

$$\%Remoción = \frac{C_0 - C_f}{C_0} \cdot 100\%$$

$$\%Remoción = \frac{0.1ppm - 0.05ppm}{0.05ppm} \cdot 100\%$$

$$\%Remoción = 50\%$$

Es importante saber también que existe un error de medición implícito en la medición de arsénico, sin embargo, no es tomado en cuenta debido a la falta de esta información proporcionada por el fabricante del test de arsénico.

Mientras que otros estudios muestran una capacidad de remoción de As del 60% (Pellizari et al., 2015) después de largos tiempos de aplicación, mientras que el actual estudio muestra un tiempo de aplicación de 3 días y muestra resultados cercanos al obtenido por los autores anteriormente citados. Esto puede deberse a que la carga bacteriana inoculada dentro del agua sintética fue alta en relación a la cantidad de arsénico que se utilizó como inicio de experimentación que fue de 0.1 ppm.

## CONCLUSIÓN

El tratamiento de una solución acuosa de arsénico con una solución bacteriana de Pseudomonas aeruginosa es posible y muestra una reducción en la concentración del metal pesado en condiciones controladas de temperatura y tiempo de acción.

El potencial oxidativo del tratamiento con Pseudomonas de arsénico en agua es grande y ha demostrado tener una eficiencia de al menos el 50% de remoción de As durante tres días de tratamiento demostrando la posibilidad de dar paso a la experimentación local en muestras de agua de cuerpos hídricos con altas concentraciones de arsénico y poder estudiar métodos de biorremediación con Pseudomonas Aeruginosa aplicables a escala real.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Airam, E., Montoya, R., Montañez Hernández, L. E., Luévanos Escareño, M. P., & Balagurusamy, N. (2015). Impact of Arsenic on the Environment and its Microbial Transformation. *Terra Latinoam*.
- Baird, C. (2018). Química ambiental. Reverté. pp556.
- Barrera-Prieto, Y., Espino-Valdés, M. S., & Herrera-Peraza, E. (2020). Presencia de arsénico en la sección norte del acuífero Meoqui-Delicias del estado de Chihuahua, México: Arsenic presence in North section of Meoqui-Delicias aquifer of State of Chihuahua, Mexico. *TECNOCIENCIA Chihuahua*, 3(1), 8-18. <https://doi.org/10.54167/tch.v3i1.739>
- De la Torre-Munilla, P., Vicente-Vicente, L., Prieto, M., Casanova, A. G., & Morales, A. I. (2021). Neurotoxicidad por exposición a metales pesados: evidencias y cuestiones por resolver. *Revista de Toxicología*, 38.
- HERRERA, M. T. A., & MARTIN, I. (2014). Arsénico en agua: Presencia, cuantificación analítica y mitigación.
- Layza, C., & Polo, K. (2018). Capacidad de remoción de arsénico por *Pseudomonas aeruginosa* a diferente tiempo y concentración, en aguas contaminadas del Río El Toro - Huamachuco. *Universidad César Vallejo*.
- Montalva Redon, M. (2016). Enfermedad de Bowen tras 45 años de exposición a arsénico en Antofagasta: comparación con una población no expuesta de la Región Metropolitana (Doctoral dissertation).
- Pellizzari EE, Marinich LG, Flores SA & Giménez CM (2015) Degradación de arsénico por *Pseudomonas aeruginosa* para biorremediación de agua. Estudio preliminar. *Av. Cienc. Ing.* 6:1-5.
- Ruiz-Martinez, L. (2007). *Pseudomonas aeruginosa*: aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos. *Universidad de Barcelona, Tesis doct.*
- Salas-Mercado, D., Hermoza-Gutiérrez, M., & Salas-Ávila, D. (2020). Distribution of heavy metals and metalloids in surface waters and on sediments of the crucero river, Perú. *Revista Boliviana de Química*, 37(4). <https://doi.org/10.34098/2078-3949.37.4.1>
- Serrato, N., & Cervantes, C. (2017). Diversidad de genes de resistencia a arsénico en procariotas. *Ciencia Nicolaita*, 70.
- Tashiro, Y., Yawata, Y., Toyofuku, M., Uchiyama, H., & Nomura, N. (2013). Interspecies interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and other microorganisms. In *Microbes and Environments* (Vol. 28, Issue 1). <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME12167>
- Thi, M. T. T., Wibowo, D., & Rehm, B. H. A. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 22). <https://doi.org/10.3390/ijms21228671>
- Vicente Martorell, J. J. (2010). Biodisponibilidad de metales pesados en dos ecosistemas acuáticos de la costa suratlántica andaluza afectados por contaminación difusa. <http://hdl.handle.net/10498/15776>
- Zurita Ruiz, G. P. (2018). Efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico de "caesalpinia spinosa" sobre *pseudomonas aeruginosa*.

# Evaluación sensorial de una bebida láctea fermentada a base de piña (*Ananas Comosus L.*)

Sensory evaluation of a fermented milk drink based on pineapple (*Ananas comosus L.*)

**Emily Nicole Sánchez Bravo**

Universidad Técnica de Manabí

esanchez9282@utm.edu.ec

ORCID: 0000-0002-9500-1975

**Kiana Elizabeth Cedeño Cevallos**

Universidad Técnica de Manabí

kcedeno3601@utm.edu.ec

ORCID: 0000-0003-2137-1858

**Francisco Alfredo Sánchez Plaza**

Universidad Técnica de Manabí

rancisco.sanchez@utm.edu.ec

ORCID: 0000-0002-9359-5749

**Ramón Eudoro Cevallos Cedeño**

Universidad Técnica de Manabí

ramon.cevallos@utm.edu.ec

ORCID: 0000-0002-8583-4674

Revista Científica de Biotecnología Vol.1 N°1

Versión electrónica

<https://investigacion.utmachala.edu.ec/revistas/index.php/biotecnologia>

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación se enfocó en el desarrollo de una bebida láctea a base de pulpa de piña, el cual tuvo como objetivo, evaluar las características sensoriales de la bebida, y la influencia de los diferentes tratamientos planteados; se aplicaron formulaciones porcentuales de pulpa de piña en tres niveles: (10, 15 y 20%) y el porcentaje de sacarosa en dos niveles: (8 y 10%), se obtuvieron tres tratamientos para determinar cuál presenta mejores características organolépticas y fisicoquímicas. Se valoraron parámetros fisicoquímicos como: pH, acidez, y °Brix para cada tratamiento, en intervalos de tiempo después del envasado al primero, octavo y quinceavo día. Al final del almacenamiento de quince días se realizó un análisis de aceptabilidad sensorial en el Cantón Tosagua a 30 catadores no entrenados. A estos resultados, se les aplicó la prueba de Friedman. Se determinó que los tratamientos estudiados se encuentran dentro de los parámetros que exige la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2395: 2011, y también se evidenció que el mejor tratamiento fue el que tenía composición de pulpa de piña natural al 20% y sacarosa al 10%, dichas formulaciones porcentuales favorecieron a que el producto desarrollado presentara mejor estabilidad durante el proceso y a su vez mejor aceptación durante la evaluación sensorial.

**Palabras clave:** sacarosa, parámetros fisicoquímicos, piña, aceptabilidad sensorial.

## ABSTRACT

The present research work focused on the development of a pineapple pulp-based milk beverage, the objective of which was to evaluate the sensory characteristics of the beverage and the influence of the different treatments proposed; percentage formulations of pineapple pulp were applied at three levels: (10, 15 and 20%) and the percentage of sucrose at two levels: (8 and 10%), three treatments were obtained to determine which had the best organoleptic and physicochemical characteristics. Physicochemical parameters such as pH, acidity and °Brix were evaluated for each treatment at intervals after packaging on the first, eighth and fifteenth day. At the end of the fifteen-day storage period, a sensory acceptability analysis was carried out in Cantón Tosagua with 30 untrained tasters. The Friedman test was applied to these results. It was determined that the treatments studied were within the parameters required by the Ecuadorian Technical Standard INEN 2395: 2011, and it was also found that the best treatment was the one with a 20% natural pineapple pulp composition and 10% sucrose; these percentage formulations favored the product developed to present better stability during the process and better acceptance during the sensory evaluation.

**Keywords:** sucrose, physicochemical parameters, pineapple, sensory acceptability.

## INTRODUCCIÓN

La piña es proveniente de Sudamérica, concretamente de Brasil, es el fruto de la plata conocida como Ananás, que para los indígenas significa “fruta excelente”. El cultivo de piña en Ecuador, está favorecido, debido a las propiedades que tiene este para adaptarse a las condiciones geográficas (Pinto, 2012). En Ecuador, la piña es consumida en los hogares o empresas dedicados a comercializar productos a base de piña (Trujillo, 2021). En la actualidad, se ha evidenciado mediante investigaciones que las bebidas lácteas a base de piña, constituyen una innovación para la industria láctea. Por otra parte, estudios indican que el yogur es capaz de proporcionar a sus consumidores diversos efectos benéficos como regular el tracto gastrointestinal y mejorar el metabolismo (García, 2011). Las bebidas fermentadas, son aquellas que en su proceso de elaboración existe una fase de fermentación, en la cual el azúcar se transforma en alcohol usualmente con producción de gases (Herrera, 2011). Las bacterias ácido lácticas (BAL), son microorganismos que tienen diversas aplicaciones, siendo una de las principales la fermentación de alimentos como la leche, carne y vegetales para obtener productos como el yogur, quesos, encurtidos, embutidos, ensilados, etc (Ramírez et al., 2011). Además, las BAL favorecen la biopreservación de los alimentos, mejoran las características sensoriales como el sabor, olor, textura y aumentan su calidad nutritiva. El yogur es producido por fermentación ácido láctica de la lactosa en la leche por bacterias como *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, las acciones sinérgicas de estas contribuyen a una textura específica, composición y propiedades sensoriales del yogur (Hashemi et al., 2015).

Las bacterias del yogur ayudan a prevenir los resfriados debido a que potencian el sistema inmunitario, sobre todo en los niños (Kellow, 2007). Durante los procesos de transformación de la leche, se generan cambios a nivel físico y químico que modifican las características de apariencia, olor, textura, sabor y aroma, convirtiéndose el análisis sensorial en una de las principales herramientas para la caracterización y control de calidad de los productos lácteos (Zuluaga, 2017).

El objetivo de la investigación fue evaluar las características sensoriales de una bebida láctea fermentada a base de pulpa de piña.

## METODOLOGÍA

La elaboración de los tratamientos se llevó a cabo de manera artesanal en Portoviejo, Ecuador. La bebida se elaboró empleando leche descremada con un porcentaje de grasa del 3 % y pulpa de piña 100 % natural sellada al vacío, se utilizó gelatina sin sabor como estabilizante y el cultivo ABY-3 de la marca CHR Hansen. Para la elaboración de la bebida láctea fermentada a base de piña, se realizaron tres tratamientos; el tratamiento uno (T 1) consta de 10 %

pulpa de piña con 8 % sacarosa, tratamiento dos (T2) de 15 % pulpa de piña con 8 % sacarosa y el tratamiento tres (T3) de 20 % pulpa de piña con 10 % sacarosa. Cada tratamiento contenido en un volumen de 1 L de leche descremada. La Tabla 1, plantea la formulación que se tomó en cuenta para realizar cada tratamiento donde, se tomaron en cuenta distintas concentraciones de sacarosa y pulpa de piña para determinar la interacción de estas variables durante el proceso.

Tabla 1. *Formulaciones de los tratamientos para la bebida fermentada de estudio.*

Ingredientes (%)					
Tratamientos	Leche	Pulpa	Sacarosa	Cultivo	Estabilizante
T1	81,5	10	8	0,2	0,3
T2	76,5	15	8	0,2	0,3
T3	81,5	20	10	0,2	0,3

La metodología consistió en verter cada litro de leche descremada en recipientes de acero inoxidable, luego se procedió a llevarlos a la estufa para su pasteurización midiendo la temperatura cada 3 minutos. Cuando la leche en proceso de pasteurización alcanzó los 50 °C se le añadió una mezcla de sacarosa y gelatina sin sabor como estabilizante establecido en la Tabla 1, hasta alcanzar los 85 °C donde se mantuvo esta temperatura durante 15 minutos. Posteriormente, se procedió a llevar los recipientes a baño maría que contenía agua fría y trozos de hielo, para realizar el respectivo choque térmico, hasta que la mezcla disminuyera a 41 °C. Cuando alcanzó esta temperatura, se inoculó con el cultivo ABY-3 (especies de *Bifidobacterium animalis spp lactis BB-12*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*) de la marca CHR Hansen, en base a las especificaciones del fabricante que consistían en añadir el cultivo directamente al producto pasteurizado mientras se agitaba suavemente durante un periodo de 10 a 15 minutos para distribuirlo homogéneamente. Durante un periodo de 4 horas, la bebida se fermentó y se conservó en un recipiente de acero que contenía agua a 44 °C. Transcurrido este tiempo, fueron extraídos de la tina de acero los tratamientos para llevarlos a refrigeración a 4 °C durante 12 horas, y se realizó el corte de cuajo, se mezcló la base láctea probiótica con la pulpa de piña en las distintas proporciones establecidas. Posterior a ello, se envasó cada uno de los tratamientos en 10 botellas de 100 ml, las cuales se utilizaron para realizar los análisis de las características físicas - químicas al primero, octavo y quinceavo día. Se procedió a realizar nuevamente los tratamientos para almacenarlos en galones de 1 L, mismos que serían utilizados en la evaluación sensorial para ofrecer al grupo de catadores no entrenados. Los análisis de los parámetros fisicoquímicos, fueron realizados en el laboratorio de Procesos Químicos de la Universidad Técnica

de Manabí, ubicado en la ciudad de Portoviejo - Ecuador, evaluando los parámetros fisicoquímicos de pH inicial y final de las bebidas, pH de la pulpa, acidez titulable de las bebidas y de la pulpa y °Brix.

#### **Determinación de Acidez Titulable**

**Pulpa:** para la determinación de la acidez titulable de la pulpa de piña, se realizó una dilución 1:2 de la pulpa en agua destilada, se añadieron cuatro gotas de fenolftaleína y se tituló con una solución de hidróxido de sodio 0,1N. El resultado se expresa como porcentaje de ácido cítrico (m Eq = 0,192).

**Bebida:** la metodología consistió en medir 9 ml de la muestra en un vaso precipitado, añadiéndole cinco gotas de Fenolftaleína; seguidamente se tituló con Hidróxido de Sodio (NaOH) 0,1N hasta el cambio a color rosa. (Instituto Ecuatoriano de Normalización, 2012). El resultado se expresa como porcentaje de ácido láctico (m Eq = 0,09). La acidez titulable se determinó por triplicado para establecer un promedio de las réplicas de cada tratamiento y determinar el coeficiente de variación.

$$\% \text{ De acidez} = \frac{N * V * mEq}{v} * 100$$

#### **Determinación de Grados Brix**

Los °Brix, se determinaron empleando un refractómetro manual de marca Beer Refractometer (RHB-32SG) a 30 °C (Instituto Ecuatoriano de Normalización, 1985).

**Determinación de pH:** para la medición del pH se empleó un pH-metro digital Portátil de marca ATC. Para esto, se sumergió el extremo en 18 ml de muestra contenido en un vaso precipitado, durante 1 min con el objetivo de estabilizar la lectura de dicho resultado (Instituto Ecuatoriano de Normalización, 2013).

La evaluación sensorial, se llevó a cabo en el Cantón Tosagua en la Provincia de Manabí, Ecuador, haciendo una minuciosa selección de 30 catadores no entrenados de ambos sexos, correspondientes a un rango de edad de entre 20 a 45 años. Cada catador, recibió las muestras de los tres tratamientos realizados en vasos plásticos (25 g cada uno), se les brindó también un vaso de agua (30 g) para eliminar sabores restantes entre muestras. Posterior a esto, los catadores seleccionados fueron sometidos a la evaluación sensorial mediante una escala hedónica de cinco puntos, donde plasmaron su calificación basándose en la percepción de cada muestra. El procedimiento fue realizado una sola vez, en este caso se presentaron varias muestras y se solicitó a los jueces que lo califiquen u ordenen por orden de preferencia y se suma los rangos para cada muestra, los resultados de estas variables categó-

ricas obtenidas de esta evaluación sensorial se interpretaron con la prueba de Friedman, que es una prueba no paramétrica desarrollado por el economista Milton Friedman, que se utiliza para varias muestras relacionadas, el método consiste en ordenar los datos por filas o bloques, reemplazándolos por su respectivo orden (Quispe et al., 2019). A continuación, se detalla la escala hedónica en la Tabla 2.

Tabla 2. Escala Hedónica

Valores de la tabla hedónica	
1	Me disgusta mucho
2	Me disgusta
3	Me es indiferente
4	Me gusta
5	Me gusta mucho
Fuente: (Díaz, 2020)	

En cambio, para las variables numéricas se utiliza el análisis ANOVA con el fin de probar la importancia de los factores y sus interacciones, al comparar las medias con la estimación de los errores experimentales en niveles de confianza específicos, siendo la estadística F el resultado de este análisis donde muestra la diferencia entre la varianza dentro del grupo y la varianza entre grupos, lo que finalmente produce la cifra que permite concluir que la hipótesis nula es aceptada o rechazada, en caso de existir diferencia significativa entre los grupos, la hipótesis nula no es compatible y la estadística F será mayor.

La prueba F, se compara el valor calculado con el valor de la tabla Fisher, con un nivel de confianza de un 95%, el cual indica que el parámetro a estimar se encuentra en dicho intervalo de confianza estadísticamente y un nivel de confianza de 0,05; lo que indicará el 5% de riesgo de cometer un error en la hipótesis.

## RESULTADOS

### Análisis e interpretación de los resultados

#### Caracterización de pulpa de piña

En la Tabla 3 se presentan los resultados de la caracterización fisicoquímica de la pulpa de piña utilizada en el desarrollo de la bebida, valores que se encuentran dentro de los requisitos de la NTE INEN 2337: 2008 para Jugos, pulpas, concentrados, néctares, bebidas de frutas y vegetales.

Tabla 3. Características fisicoquímicas de la pulpa de piña.

Peso:	450g
Ph:	3
°Brix:	10
Acidez:	0,344 %



**Caracterización de bebida láctea fermentada a base de pulpa de piña**

En la Tabla 4, se muestran los resultados de la caracterización fisicoquímica de los tres tratamientos tomados al primer, octavo y quinceavo día de procesado y envasado, donde T1: 10% pulpa de piña con 8 % sacarosa; T2: 15 % pulpa de piña con 8 % sacarosa y T3: 20 % pulpa de piña con 10 % sacarosa.

Tabla 4. Características fisicoquímicas de cada tratamiento (día 1, día 8 y día 15).

Tratamientos	Parámetros	Día 1	Día 8	Día 15
T1	Acidez (%)	1,36	1,16	0,983
	°Brix	15	15	15
	pH	4	4	4
T2	Acidez (%)	0,99	0,94	0,916
	°Brix	15	15,1	15,5
	pH	4	4	4
T3	Acidez (%)	1,137	1,06	0,973
	°Brix	15,5	16	17
	pH	4	4	4

De acuerdo a los valores reflejados en la Tabla 4, se observa que varían en el transcurso de los días, en el caso del pH no hubo diferencia, ya que cada uno de los tratamientos obtuvo el mismo valor en los distintos días en los que se realizaron las mediciones. Mientras que, los valores de °Brix en los todos tratamientos tuvieron diferencias en el periodo en que se llevó a cabo el procedimiento.

Se comprobaron que los valores de los parámetros fisicoquímicos de pH y acidez no fueron estadísticamente significativos con un nivel de confianza del 95% ( $p < 0,05$ ) a excepción de los grados Brix que presentan diferencias significativas en sus tratamientos; determinando estos resultados a través de un análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo, los cuales se reflejan en la Tabla 5.

Tabla 5. ANOVA parámetros fisicoquímicos.

Parámetros		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	
pH	Tratamientos	0,00	2	0	65535	0,00	
	Días	0,00	2	0	65535	0,00	
	Error	0,00	4	0			
	<b>Total</b>	<b>0,00</b>	<b>8</b>	<b>0</b>			
Acidez	Tratamientos	0,072	2	0,036	5,910	0,064	ns
	Días	0,063	2	0,032	5,185	0,077	ns
	Error	0,024	4	0,006			
	<b>Total</b>	<b>0,159</b>	<b>8</b>				

Brix	Tratamientos	2,34	2	1,168	7,728	0,04	*
	Días	0,70	2	0,351	2,324	0,21	ns
	Error	0,60	4	0,151			
	<b>Total</b>	<b>3,6422</b>	<b>8</b>				

ns: No existe diferencia significativa

\*: Existe diferencias significativas

\*\* : Existen diferencias altamente significativas

En la Figura 1 se aprecia que, en el transcurso del procedimiento, el pH es constante con respecto al tiempo de almacenamiento para cada uno de los tratamientos, puesto que al realizar la toma de muestras en el primero, octavo y quinceavo día, en los resultados no se observa alteración del pH en ningún momento, puesto que todos los tratamientos denotan valores de 4 en el pH, con esto se asegura que las muestras no contiene microorganismos patógenos, debido a que en un medio con pH inferior a 4.5 estos no sobreviven.

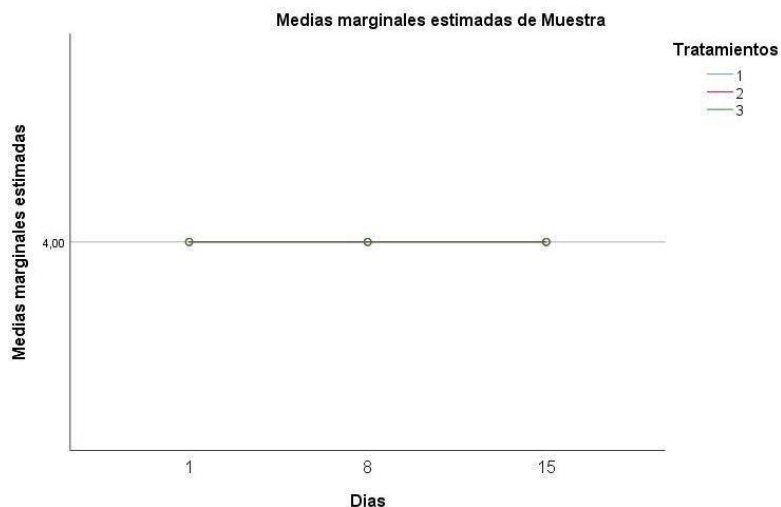


Figura 1. Variación del pH.

En base a la Figura 2, se obtienen los resultados del comportamiento de la acidez, en donde se detalla la incorporación de sacarosa y pulpa de piña, observando el mayor porcentaje de acidez en el tratamiento uno, así mismo, la disminución en función al tiempo dentro de los tres tratamientos. Al quinceavo día se tiene la disminución de todos los tratamientos a valores inferiores 1,00% de acidez. Dando con estos valores a que, la madurez será el factor que determinará que tan bien se almacenará la fruta y su sabor.

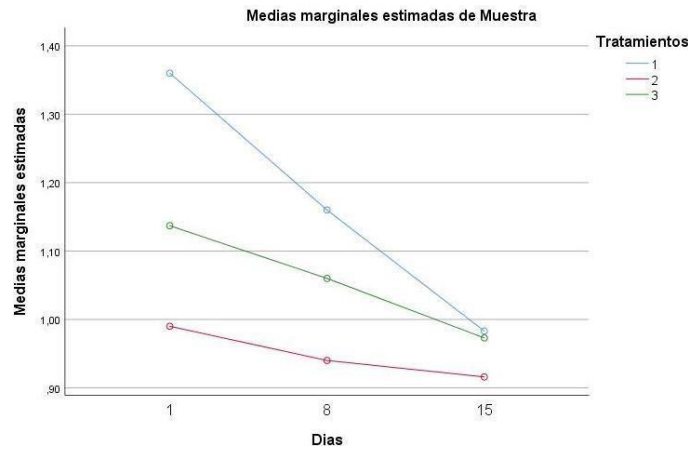


Figura 2. Comportamiento de la acidez.

En la Figura 3, se expone el comportamiento de los grados °Brix en los tratamientos planteados, el mejor tratamiento en cuanto a °Brix, fue el tercer tratamiento, guardando relación a que contiene 10% de sacarosa y 20% de pulpa, con lo cual genera un valor mayor en el comportamiento de °Brix conforme el tiempo de almacenamiento.

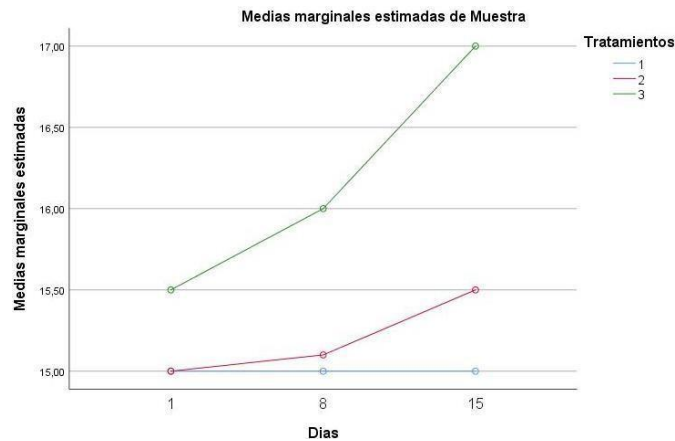


Figura 3. Comportamiento de °Brix.

Basándose en los resultados de la evaluación sensorial que consta de cinco parámetros: aceptabilidad, consistencia, sabor, acidez y aroma, se aplicó la prueba no paramétrica de Friedman para determinar cuál de los tres tratamientos estudiados presentó mayor aceptabilidad en el consumidor. En la Tabla 6, se expone los subconjuntos homogéneos según Friedman para el parámetro sensorial de aceptabilidad, denotando que el T3 posee los mejores valores en comparación con los otros tratamientos.

Tabla 6. Subconjuntos homogéneos según Friedman  $p < 5\%$  para la prueba de aceptabilidad

Tratamientos	Subconjunto	
	1	2
T1	1,55	
T2	1,92	
T3		2,53

La prueba de Friedman para el parámetro consistencia, plantea mediante los subconjuntos homogéneos (Tabla 7), que el tratamiento uno (T1) posee un valor de consistencia significativo versus el tratamiento dos y tres.

Tabla 7. Subconjuntos homogéneos según Friedman  $p < 5\%$  para consistencia.

Tratamientos	Subconjunto	
	1	2
T1	1,60	
T2		2,05
T3		2,35

En la Tabla 8, se muestran los valores de los subconjuntos del parámetro sabor según la prueba Friedman, evidenciando que el tratamiento tres (T3) tuvo el mejor resultado.

Tabla 8. Subconjuntos homogéneos según Friedman  $p < 5\%$  para sabor.

Tratamientos	Subconjunto	
	1	2
T1	1,53	
T2	2,03	
T3		2,43

Los subconjuntos homogéneos del parámetro sensorial acidez (Tabla 9), denota que los mejores calificados en cuanto a este parámetro sensorial son los tratamientos dos y tres.

Tabla 9. Subconjuntos homogéneos según Friedman  $p < 5\%$  para acidez.

Tratamientos	Subconjunto	
	1	2
T1	1,73	
T2		2,13
T3		2,13

La Tabla 10 expone los valores de los subconjuntos del parámetro aroma, donde el tratamiento mejor calificado fue el T3 con un valor de 2,22.

Tabla 10. Subconjuntos homogéneos según Friedman  $p < 5$  % para aroma.

Tratamientos	Subconjunto	
	1	2
T1	1,78	
T2		2,00
T3		2,22

## DISCUSIÓN

En la Tabla 4 se exponen los valores obtenidos de los análisis del parámetro fisicoquímico de acidez, donde se plantea que la bebida láctea fermentada del tratamiento tres (T 3) a los 15 días de elaborado, posee una acidez de 0.973 %, determinando que el tratamiento se encuentra dentro de los valores de Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2395: 2011; para leches fermentadas se establece que el rango mínimo de acidez es 0.6 % y el máximo 1.5 %, para yogures tipo 1, 2 o 3. En la tabla 4, se describen los valores del análisis físico - químico realizado a los 15 días de elaborado el producto, entre ellos se encuentran los valores de pH de la bebida láctea fermentada, donde, comparando el día 1 con el día 8, no existe variación de pH entre tratamientos, manteniéndose con pH 4. De acuerdo con Schmidt et al. (2012), el rango de pH entre 4,0 y 4,4 se considera más cercano al ideal para yogur, ya que el producto en este intervalo de pH no presenta un sabor demasiado amargo o agrio.

De acuerdo a la investigación realizada por Díaz et al. (2004) indican que el pH y la acidez en el yogur, están relacionados de manera inversamente proporcional; es decir, que a mayor acidez menor pH. Por lo tanto, durante la elaboración del yogur, se debe considerar el pH de la fruta, ya que este debe ser aproximado al del yogur, para evitar la sobre acidificación. Por ello, se estableció mediante un análisis fisicoquímico realizado a la pulpa de piña utilizada que constaba de un pH de 3, aproximado al valor de pH de los tratamientos ejecutados. Además, según el Instituto Ecuatoriano de Normalización (2008) establece que la pulpa de piña debe poseer un contenido mínimo de °Brix de 10 y un pH inferior a 4,5. Por lo que, se corroboró que la pulpa de piña utilizada es apta, al encontrarse dentro del límite de °Brix permitidos en la norma. Según Balcázar (2011), una acidez menor con pH mayor a 4,6 influye desfavorablemente en la consistencia del yogur, un pH igual o menor a 4,6 ayuda a la hidratación de proteínas en el yogur. Mientras que Mestres et al. (2004) indica que un pH comprendido entre 4 y 4.6, favorece a la hidratación de las proteínas; por consiguiente, se obtiene un yogur de aceptable consistencia. Sin embargo, un yogur con un pH mayor a 4.6 genera un yogur de consistencia desfavorable; mientras que un pH menor a 4 favorece la contracción del coágulo del yogur lo que le confiere una tendencia a sufrir sinéresis.

Un estudio realizado por Ayala (2012), determinó que las formulaciones que contenían 10 % de sacarosa presentaron mayor estabilidad a lo largo

del tiempo que aquellas que integraban únicamente el 8 % de sacarosa; por lo cual, se comprobó que la sacarosa ejerce cierto efecto conservante en el producto. Por otra parte, el Instituto Ecuatoriano de Normalización (2011) plantea que el límite mínimo de °Brix para leches fermentadas es de 12, no establece límite máximo. Por lo tanto, se puede decir que los tratamientos se encuentran dentro de lo establecido en la norma INEN 2395: 2011, ya que al quinceavo día el T 1 posee un °Brix = 15, T2 con 15,5 y T3 con 17. La prueba de Friedman, determinó en base a los resultados de la evaluación sensorial que el mejor tratamiento fue el T 3 (20 % pulpa de piña, 10 % sacarosa, 0.3 % estabilizante y 0.2 % de cultivo), debido a que presenta mejor estabilidad fisicoquímica en comparación con el resto de tratamientos. Estudios realizados por Costa (2003) demuestran que la gelatina controla la consistencia del yogur mejor que otros estabilizantes como la pectina y el almidón. Con el resultado del análisis de varianza se logró obtener que la pulpa de piña presenta diferencias significativas por efecto de los tratamientos (%sacarosa/%pulpa), con respecto a los °Brix determinados, de acuerdo a la separación de medias con la prueba DMS (Diferencias Mínimas Significativas) se establece que existe menor contenido de °Brix en el tratamiento uno.

## CONCLUSIONES

Se determinó que todos los tratamientos ejecutados se encuentran dentro de los parámetros que exige la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 2395: 2011, sin embargo, se estableció que el mejor tratamiento fue el T3, debido a su composición de 20 % de pulpa de piña natural y 10 % de sacarosa contribuyó a mejorar la estabilidad durante el proceso y aceptación en la evaluación sensorial. Se comprobó que los parámetros fisicoquímicos analizadas en los tratamientos no presentan diferencias estadísticas significativas, lo cual, se debe a que el pH no es influenciado por la presencia de ácido cítrico predominante en la pulpa de fruta por la presencia de sacarosa, la que ofrece cierto conservante en el yogur, de tal manera que mantuvo un pH estable. Finalmente se demostró que en los tratamientos analizados las diversas concentraciones de pulpa de piña, no influyeron significativamente en los niveles de ácido láctico, debido a que la cantidad de sacarosa agregada disminuye la acidez; por ende, los tres tratamientos poseen valores de acidez dentro de los límites de la NTE INEN 2395: 2011.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ayala, J. (2012). Desarrollo de un yogurt con piña en la planta de producción de la empresa " Lácteos de Belén". Universidad Tecnológica Equinoccial.
- Balcázar, M. (2011). Elaboración y aplicación gastronómica del yogurt.
- Costa, S. P. (2003). *Modelización de la consistencia de yogurt batido: efecto de la adición de varios gelificantes*. Reynosa, México.: Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de Alimentos.
- Díaz, B., Sosa, M. y Vélez, J. (2004). Efecto de la adición de fibra y la disminución de grasa en las propiedades fisicoquímicas del yogurt. *Rev. Mexicana de Ingeniería Química*.
- Díaz, G. (2020). *Influencia de la pitahaya roja (hylocereus undatus) liofilizada y lactosuero en las propiedades fisicoquímicas, antioxidantes y sensoriales de una bebida fermentada*.
- García, G., López, M. y Quintero, R. (20004). *Biotecnología Alimentaria* (Quinta edición ed.). México: Limusa.
- Hashemi, H., Hadi, M., Mesbahi, B., & Amin, M. (2015). Scientific and technical aspects of yogurt fortification. *Food Science and Human Wellness*, Vol. 4, pp 1-8.
- Herrera. (2011). Elaboración de una bebida fermentada a partir de piña.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización. (1985). *Conservas vegetales. Determinación de sólidos solubles. Método refractrométrico*.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización. (2008). *Jugos, pulpas, concentrados, nectares, bebidas de frutas y vegetales. Requisitos* (Primera edición. ed.).
- Instituto Ecuatoriano de Normalización. (2011). *Leches fermentadas requisitos norma INEN NTE 2395:2011* (Primera edición, segunda revisión ed.).
- Instituto Ecuatoriano de Normalización. (2012). *Leche. Determinación de la acidez titulable*. (Primera ed.).
- Instituto Ecuatoriano de Normalización. (2013). *Productos vegetales y de frutas. Determinación de pH*. (Segunda ed.).
- Kellow, J. (2007). *Miracle foods for kids*. Recuperado el 25 de 03 de 2022, de <http://books.google.com.ec>
- Kuehl, R. O. (2011). Diseño de experimentos: *Principios estadísticos de diseño y análisis de investigación*.
- Mestres, J. &. (2004). *Productos Lácteos*. (Primera edición ed.). España: UPC, S.L.: Tecnología.
- Pinto, M. (2012). *El cultivo de la piña y el clima en el Ecuador*. Obtenido de <http://www.inamhi.gob.ec/meteorologia/articulos/agrometeorologia/El%20cultivo%20de%20la%20pi%C3%B1a%20y%20el%20clima%20en%20el%20Ecuador.pdf>
- Quispe, A., Calla, K., Yangali, J., Rodríguez, J., & Pucamayo, I. (2019). *Estadística no paramétrica aplicada a la investigación científica con software SPSS, MINITAB Y EXCEL*. Colombia: EIDEC.

- Ramírez, J., Ulloa, P., Velázquez, M., Ulloa, J., & Arce, F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente Año 2, No. 7, Pag 1*.
- Schmidt, C., Pereira, C., Anjus, G., & Lucas, S. (2012). Formulación y evaluación sensorial hedónica de yogur con pulpa de acerola. *Revista Eletrônica Científica Inovação e Tecnologia, Vol 01(No. 5)*.
- Trujillo, J. (2021). Evaluacion de la capacidad antioxidante de extractos de la cascara de piña (Ananas Comosus L.) frente a un producto comercial.
- Zuluaga, N. (2017). El análisis sensorial de alimentos como herramienta para la caracterización y control de calidad de derivados lácteos.



# Técnicas de machine learning aplicadas a la producción de bioetanol a partir de la caracterización de biomasa lignocelulósico (*Theobroma cacao L.*)

Machine learning techniques applied to the production of bioethanol from the characterization of lignocellulosic biomass (*Theobroma cacao L.*)

Greta Valeria Basauri Romero

Universidad de Lima  
20160142@aloe.ulima.edu.pe  
ORCID: 0000-0003-4492-9324

Melanie Evelyn Velarde Herrera

Universidad de Lima  
20161515@aloe.ulima.edu.pe  
ORCID: 00000-0003-0113-2921

Yvan Jesús García López

Universidad de Lima  
ygarcia@ulima.edu.pe  
ORCID: 0000-0001-9577-4188

Revista Científica de Biotecnología Vol.1 N°1

Versión electrónica

<https://investigacion.utmachala.edu.ec/revistas/index.php/biotecnologia>

## RESUMEN

En los últimos años, la demanda de combustibles fósiles ha ido en aumento y esto ha generado una escasez en las reservas mundiales lo que limita el crecimiento económico; ejemplo de ello es Tocache, una de las provincias más aisladas y pobres del Perú. En este estudio se aborda el uso de residuos lignocelulósicos como la cáscara de cacao para generar biocombustible, cuyo objetivo es comparar los resultados experimentales con los obtenidos de la simulación. Asimismo, se realizaron los procesos de pretratamiento, hidrólisis enzimática y fermentación en la Universidad Técnica de Machala. El Machine Learning se realizó con el software Orange, el cual se basó en los datos y las variables experimentales halladas previamente. El mejor resultado corresponde al método Random Forest, con el que se obtuvo una precisión con el R<sup>2</sup> (0.83). Por consiguiente, la glucosa predicha fue 1.04 g/L y la cantidad óptima de alcohol etílico fue 5.34 g / L. Los resultados demuestran que el alcohol etílico simulado se aproxima al hallado experimentalmente (7.1 g/L) y a otros estudios realizados previamente. Finalmente, el uso de Machine Learning es menos costoso y los resultados se pueden obtener en el menor tiempo posible en comparación con los procedimientos experimentales.

**Palabras clave:** Bioetanol, cáscara de cacao, fermentación, hidrólisis Enzimática, aprendizaje automático.

## ABSTRACT

In recent years, the demand for fossil fuels has been increasing and this has generated a shortage in world reserves, which limits economic growth; An example of this is Tocache, one of the most isolated and poorest provinces in Peru. This study deals with the use of lignocellulosic residues such as cocoa husks to generate biofuel, whose objective is to compare the experimental results with those obtained from the simulation. Furthermore, the pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation processes were carried out at the Technical University of Machala. The Machine Learning was carried out with the orange software, which was based on the data and the experimental variables previously found. The best result corresponds to the Random Forest method, with which a precision with R<sup>2</sup> (0.83) was obtained. Therefore, the predicted glucose was 1.04 g/L, and the optimal amount of ethyl alcohol was 5.34 g/L. The results show that the simulated ethyl alcohol is close to that found experimentally (7.1 g/L) and to previous studies. Finally, the use of Machine Learning is less expensive, and the results can be obtained in the shortest possible time compared to experimental procedures.

**Keywords:** Bioethanol, cocoa pod husk, fermentation, enzymatic hydrolysis, machine learning.

## INTRODUCCIÓN

Chohan et al. (2020) señala que “más del 80% de la energía global se produce utilizando combustibles fósiles” (p. 1031). Sin embargo, se ha generado un desabastecimiento de las reservas mundiales de los combustibles fósiles debido principalmente a la alta demanda de estos, causado por la expansión de la población y el uso de estos en los sectores residencial, industrial, de servicios y de calefacción (Marques et al.,2018).

En la literatura analizada, el desabastecimiento también se da por la falta de diversificación en otras fuentes de energía debido a los altos costos en producción, infraestructura subdesarrollada y falta de economías de escala en comercialización (Kochtcheeva,2016). En otro artículo, podemos encontrar que existe una desigualdad en la introducción de energías renovables debido a la escasez de políticas públicas y regulaciones para su implementación, además de la falta de apoyo financiero y fondos del gobierno (Ang et al.,2022).

Sobre la base explicada anteriormente, el Perú no es la excepción, ya que necesita un suministro mayor de energía para sostener el aumento de la demanda, debido a que según el Comité de Operación Económica del Sistema Interconectado Nacional (COES, 2019), se espera una tasa de crecimiento promedio de la demanda de energía de 6.4% con respecto al periodo 2019-2024. “La tasa de cobertura eléctrica global en el Perú es relativamente alta, no obstante, el abastecimiento de electricidad en las zonas rurales es una constante preocupación” (Falcón-Roque et al.,2017, p. 065903-2). Este es el caso de San Martín, que, según el Organismo Supervisor de la Inversión en Energía y Minería (Osinergmin, 2019), su consumo per cápita semestral de combustibles líquidos en 2019 fue de 0.57 barriles por habitante en comparación de los 4.03 barriles consumidos en Moquegua y Madre de Dios; siendo Tocache, provincia de San Martín, afectada por el déficit de combustibles.

Por todo lo anterior, en la Figura 1 muestra el árbol de problemas para resumir los aspectos más destacados del análisis realizado previamente.

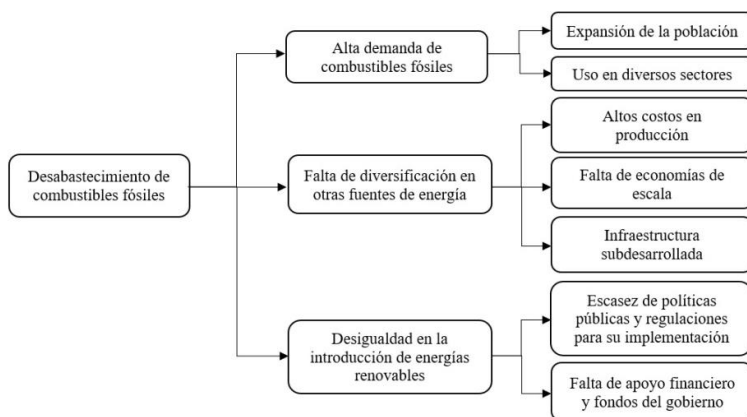


Figura 1. Árbol de Problemas

En orden de brindar una solución a este problema, en los últimos años, los biocombustibles se han vuelto una alternativa de gran interés para resolver este déficit de combustibles. Los principales sectores industriales en la producción de biocombustibles son el bioetanol y biodiesel, siendo Estados Unidos y Brasil los mayores productores a nivel global, gracias a que ambos han recibido un inmenso apoyo a través de medidas como exenciones fiscales y acuerdos regulatorios (Zentou et al.,2019). Asimismo, la producción de estos podría seguir aumentando con el paso de los años, ya que Torroba et.al (2022) señala que “en la última década (2012-2021) el consumo mundial de biocombustibles líquidos tuvo un crecimiento acumulado de 41%” (para.1).

En el Perú, para promover la demanda de producción y consumo de biocombustibles se emitió el Decreto Supremo 021-2007 que establece los parámetros necesarios de biocombustibles en la mezcla de gasolina, esta debe contener al menos 7.8% de bioetanol y por su parte, el combustible diésel un mínimo 5% de biodiésel (Ramírez-Triana,2017).

Banerjee y Tomar (2019) señalan que “la producción de bioetanol a nivel mundial puede reemplazar el 2% aproximadamente, del consumo total de gasolina” (p.509). Diversos países, como EE.UU., Brasil, China, Canadá y varios países de la UE se han comprometido en programas de producción de bioetanol para resolver el gran problema de desabastecimiento que existe actualmente, aunque solo EE. UU y Brasil han mostrado mayores propuestas hasta el momento (Zabed et al.,2017).

De igual manera, en Perú la producción de bioetanol ha tenido variación positiva durante el periodo de 2012-2021 de 51% y en consumo, de 65%, teniendo como materia prima la caña de azúcar (Torroba et.al.,2022).

Este estudio se centrará en los biocombustibles de segunda generación. Estos son productos de la conversión de biomasa lignocelulósica a partir de los residuos de la industria agrícola, como es el caso de la cascarilla de cacao, abundante en Tocache, donde se produce la mayor cantidad de cacao en grano. Además, esta materia prima es una alternativa a la cáscara de yuca, la mazorca de maíz y el bagazo de caña de azúcar, que son materias primas que se suelen utilizar para producir bioetanol. “Debido principalmente a su abundancia, alta composición de carbohidratos y contenido mínimo de lignina” (Taherzadeh & Karim,2008, citado en Jugwanth et al.,2020, p.116553). Asimismo, la producción de bioetanol implica diferentes pasos del proceso que incluyen la caracterización de la biomasa, el pretratamiento de la biomasa, la hidrólisis y la fermentación (Jannah & Asip, 2015).

En ese sentido, se utilizará la cascarilla de cacao, “la cual contiene una mezcla de celulosa, hemicelulosa, lignina, pectina y fibra cruda y, por lo tanto, sirve como una fuente potencial de sustratos de biomasa para la producción bioquímica” (Adjin-Tetteh et al., 2018, p.305). Esta biomasa es compuesta principalmente por celulosa (16.9%), hemicelulosa (4%) y lignina (69%) (Shet et al., 2018). Por otra parte, según Laconi y Jayanegara (2015), la composición porcentual estuvo constituida por hemicelulosa (6%), celulosa (35.3%) y lignina (38.8%). Estos estudios obtuvieron valores muy diferentes debido

a que “esta variabilidad se relaciona con la variedad, el riego, fertilizantes utilizados, el transporte, almacenamiento, suelo y otros” (Han & Bao, 2018, citado en Alvarez-Barreto et al., 2021, p.1490).

Para Wei et al. (2017, citado en Alvarez-Barreto et al., 2021) “esta biomasa lignocelulósica tiene una estructura compleja porque la celulosa está envuelta en una matriz de hemicelulosa que, a su vez, está rodeada por paredes de lignina” (p.1490). Por este motivo, la implementación de un pretratamiento de biomasa es muy importante, “ya que su tarea es destruir la matriz de lignina de celulosa para reducir la cristalinidad de la celulosa para que actúen enzimas y microorganismos” (Jaramillo & Sanchez, 2018, p.151). Existen pretratamientos físicos, químicos, biológicos y combinados, en varios estudios se realiza la molienda como pretratamiento mediante un mortero de madera o un molino para triturar la cascarilla de cacao y tamizarla, reduciendo la cristalinidad de la celulosa. Asimismo, los pretratamientos ácidos y alcalinos son los más comunes, debido a que se puede obtener una mayor concentración de celulosa (Akhtar et al., 2017).

Una vez que la biomasa sea pretratada debe pasar por un proceso de hidrólisis que permita la conversión de la celulosa en azúcares fermentables. En ese sentido, a lo largo de los años las enzimas celulolíticas han sido la principal área de interés para poder hidrolizar diversas biomásas. “El repertorio general de enzimas celulolíticas consistió en endo-glucanasa, exo-glucanasa y b-glucosidasa, generalmente actúan de manera colegiada para mejorar la hidrólisis de materiales celulósicos” (Akhtar et al., 2017, p.134).

En referencia a la fermentación, en la mayoría de los estudios se emplea el microorganismo *Saccharomyces cerevisiae*. En la actualidad, se están construyendo nuevas plantas para etanol de segunda generación; debido a esto, el uso del *S. cerevisiae* se maximizará ya que permite la fermentación de hidrolizados lignocelulósicos de residuos agrícolas y cultivos energéticos (Jansen et al., 2017).

En los últimos años se han utilizado métodos de aprendizaje automático para producir bioetanol a partir de biomasa, como redes neuronales artificiales y bosques aleatorios. Por ello, en nuestro estudio buscaremos obtener bioetanol a partir de cáscaras de cacao aplicando técnicas de Machine Learning.

Las redes neuronales artificiales han demostrado su eficacia como herramienta de modelado debido a las funciones de procesamiento de información que poseen; además de los bosques aleatorios que permiten manejar conjuntos de datos con una gran cantidad de variables predictoras y son fáciles de emplear debido a sus modelos simples (Speiser et al., 2019). Con la implementación de estos algoritmos, en los resultados obtenidos de la experimentación, será posible predecir la concentración de este biocombustible (Smuga-Kogut et al., 2021). Por lo tanto, el presente estudio tiene como objetivo realizar la comparación de los resultados experimentales junto con los obtenidos de la simulación con respecto al rendimiento de la producción de bioetanol a partir de la caracterización de la cáscara de cacao.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología utilizada en el estudio fue cuantitativa, ya que se estudiaron y analizaron mediante procedimientos estadísticos datos numéricos recogidos de experimentos realizados en un laboratorio para la obtención de bioetanol. El proceso de investigación inició con la recolección de datos experimentales, donde se determinaron las variables de decisión del proceso de hidrólisis y fermentación alcohólica con base en la investigación de Romero et al., (2016), donde se realizó un estudio cinético de producción de bioetanol a partir de residuos agroindustriales.

Posterior a ello, se realizó una preparación de datos a través de la técnica de "Data augmentation" (aumento de datos) que se refiere a una técnica utilizada en el campo del machine learning y la inteligencia artificial para mejorar el rendimiento de un modelo mediante la generación de nuevas instancias de entrenamiento a partir de las instancias originales. Esta técnica es comúnmente empleada en problemas de clasificación de imágenes, aunque también puede aplicarse en otros tipos de datos (Shorten & Khoshgoftaar, 2019).

La idea detrás de la data augmentation es crear datos originales introduciendo pequeñas transformaciones mientras se mantiene la etiqueta o clase asociada. Al introducir estas variaciones, se le proporciona al modelo más diversidad y generalización, ayudando a prevenir el sobreajuste y mejorando la capacidad del modelo para reconocer patrones en datos nuevos.

Se preparó 956 experimentos de datos que a continuación se obtiene la siguiente Tabla 1.

Tabla 1. Análisis de la data experimental

	Glucosa [g/L]	ph	Brix	Sacarosa gr/100gr	Do[g/L]	DQO [g/L]
<b>Exp</b>	956	956	956	956	956	956
<b>Media</b>	0,85	4,75	1,30	1,30	14,56	0,61
<b>Desy. Es-tandar</b>	136,01	0,19	0,06	0,06	0,65	27,74
<b>Min</b>	0,61	4,33	1,20	1,20	13,46	0,56
<b>25%</b>	0,73	4,59	1,25	1,25	13,99	0,58
<b>50%</b>	0,86	4,76	1,30	1,30	14,55	0,61
<b>75%</b>	0,96	4,93	1,35	1,35	15,14	0,63
<b>Max</b>	1.09	5,08	1,40	1,40	15,70	0,65

La data augmentation es una estrategia valiosa para mejorar el rendimiento de los modelos de Machine Learning, especialmente cuando el conjunto de datos de entrenamiento es limitado.

Luego estos datos se introdujeron al software Orange para la simulación en los diferentes modelos de Machine Learning para conseguir la cantidad óptima de bioetanol.

### **Materia prima**

Las cascarillas de cacao (*Theobroma cacao* L) fueron obtenidas en el mercado mayorista de frutas “Las flores” de la ciudad de Lima. Estas fueron desechadas en el descascarillado, provenientes de diversos productores de la provincia de Tocache, San Martín.

### **Pretratamiento, hidrólisis enzimática y fermentación alcohólica**

Estos procedimientos se efectuaron en el laboratorio de la Universidad Técnica de Machala, Ecuador. En el pretratamiento, se utilizó un molino de laboratorio para reducir el tamaño de la cascarilla de cacao. Posteriormente, se realizó el método de campos eléctricos pulsados, donde se empleó corriente alterna para conducir electricidad al equipo que genera pulsos eléctricos mediante dos varillas de metal. Luego, se preparó un vaso de precipitado que tenía agua y cáscara de cacao; y se lo expuso a pulsos eléctricos por 1 hora a 60 V para hidrolizar la celulosa, la hemicelulosa y lignina; y así esté libre para convertirla en glucosa. La hidrólisis enzimática se realizó en biorreactores de 2 a 50 g/L de polvo de cascarilla de cacao; después se añadieron 0.2 ml de la enzima beta-glucosidasa, previamente elegida para romper los enlaces glucosídicos, luego se agitó durante 1 hora a 120 rpm y para finalizar se tomó una muestra. En este proceso se midieron nuestras variables de decisión, que son pH, °Bx (grados Brix), oxígeno disuelto y demanda química de oxígeno. Para la cuantificación de la glucosa se empleó el método del ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS), utilizando un colorímetro Hach DR / 870 para generar una curva de calibración con soluciones de concentraciones de glucosa (Romero Bonilla, et al., 2016). Posteriormente, la fermentación alcohólica se realizó con 100 ml de solución, donde se controló el pH y se agregó 800 ufc/mL de levadura seca comercial (*Saccharomyces cerevisiae*), previamente activada. Se cuantificó la concentración de etanol mediante cromatografía de gases a través de muestras del jarabe glucosado. Cabe recalcar que las variables de decisión también se controlaron en la fermentación.

### Machine learning

Machine learning o aprendizaje automático es una disciplina compuesta por un conjunto de técnicas que permiten a los computadores aprender desde los datos, generando predicciones a partir de algoritmos, adquirir conocimiento sobre un dominio y facilitando la toma de futuras decisiones (Gramajo et al., 2020). En el proceso de aprendizaje, los algoritmos pueden clasificarse en cuatro categorías: aprendizaje supervisado, no supervisado, semi supervisado y por refuerzo. Esto se muestra en la Figura 2.

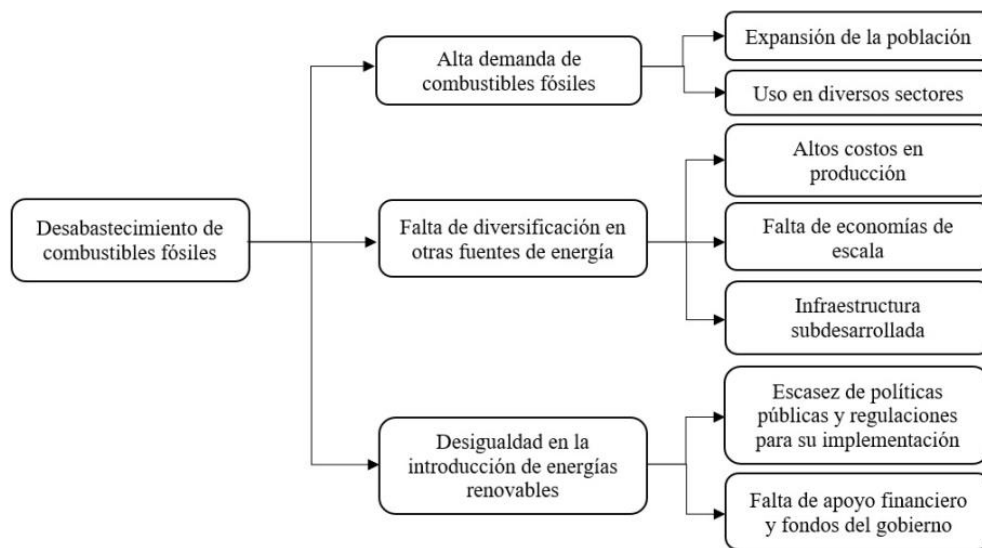


Figura 2. Clasificación de algoritmos de aprendizaje automático

Nota. Adaptada de "Seizing requirements engineering issues through supervised learning techniques" por M. G. Gramajo, 2020, IEEE Latin America Transactions, 18(7), p.1164-1184 (<https://latamt.ieeeer9.org/index.php/transactions/article/view/54>)

En el caso del aprendizaje sin supervisión, los algoritmos cuentan con datos con estructura desconocida y sin etiquetado, con el objetivo de reestructurar los datos de entrada con nuevas funciones. Por parte de la semi supervisada, tiene la capacidad de usar datos sin etiqueta para mejorar la funcionalidad del aprendizaje supervisado. Mientras que, "el aprendizaje por refuerzo se basa en la retroalimentación obtenida del entorno producto de distintas interacciones, siendo su objetivo mejorar su desempeño a base de recompensas" (Gramajo et al., 2020, p. 1165).

Por último, el aprendizaje supervisado, predice los resultados futuros gracias a un entrenado modelo con entradas y salidas ya conocidos, que son monitoreados constantemente (Harippriya et al., 2022). A continuación, la Figura 3 muestra el diagrama de flujo, a partir de un modelo de datos dividido en capacitación y pruebas.



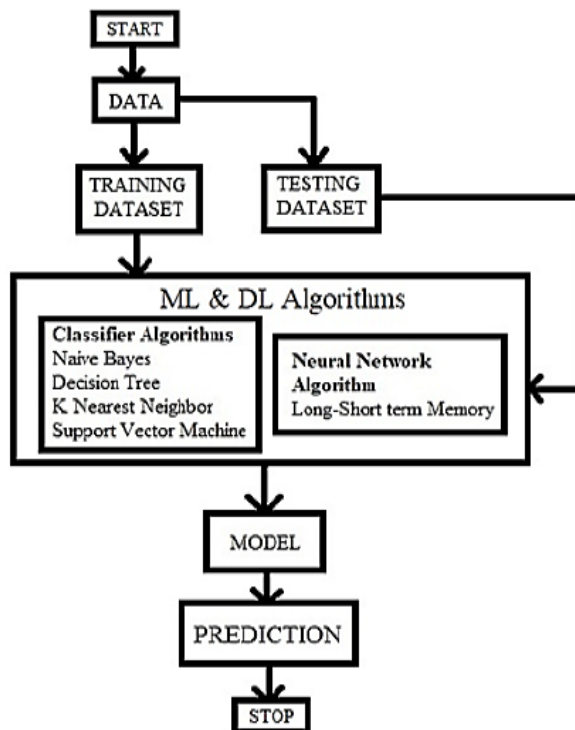


Figura 3. Diagrama de Flujo de un modelo de datos

Nota. Adaptada de "Battery management system to estimate battery aging using deep learning and machine learning algorithms", por S. Haripriya, E.E Vigneswaran & S.Jayanthi, 2022, Journal of Physics: Conference Series, 2325(1), p.012004 (<https://doi.org/10.1088/1742-6596/2325/1/012004>).

Como se muestra en la Figura 3 los datos son recolectados en los algoritmos de aprendizaje supervisado y no supervisado, estos se encuentran divididos en 80% y 20% de los datos de entrenamiento y prueba. Para finalmente obtener el modelo e iniciar el proceso predicción, en base a lo aprendido.

Para la creación del modelo de aprendizaje automático en su primera fase se usó el software Orange Data Mining que es un software libre para planificar como sería el modelo propuesto y posterior a ello en la segunda fase el modelo fue comprobado usando el lenguaje de programación Python (Romero, E., et al., 2023); los datos recolectados fueron obtenidos en la prueba piloto de hidrólisis enzimática del laboratorio de la Universidad Técnica de Machala, Ecuador. A continuación, en la figura 4a y 4b se describe las variables numéricas que fueron evaluadas y su comportamiento dentro de una distribución normal

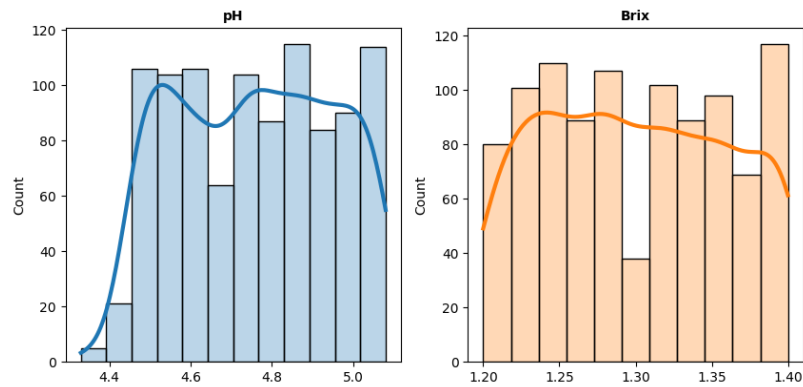


Figura 4a. Diagrama de distribución normal de pH y Grados Brix

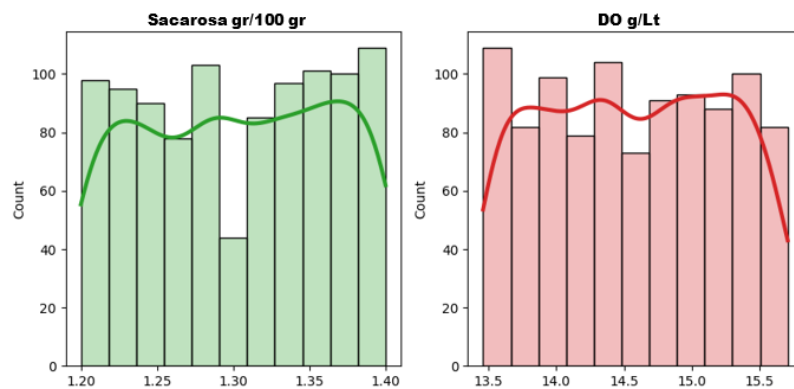


Figura 4b. Diagrama de distribución normal de sacarosa y Demanda de Oxígeno Disuelto

Nota. Extraído del modelo Python desarrollado en el análisis exploratorio de datos de la muestra experimental

### Métodos de Machine Learning utilizados para predecir bioetanol Random Forest

En el modelo basado en la metodología de los árboles de decisión se da un algoritmo entre  $N$  -el número de casos a prueba y  $M$  - el número de variables en el clasificador- asimismo las variables de entrada  $m$  al desarrollar un conjunto de entrenamiento por cada nodo del árbol, elige aleatoriamente en qué basar su decisión, lo cual calcula la mejor participación por conjunto desde estas variables (Vallejos-Romero et al, 2022).

Este método es derivado del árbol de clasificación y regresión que incluye resistencia al ruido y facilidad de ajuste, además se debe aplicar este método debido a que cada árbol es un proceso de aprendizaje, y eso le permite seleccionar muestras al azar, obteniendo un promedio de las predicciones de todos los árboles para la predicción final; evitando el sobreajuste y el efecto de muestras ruidosas (Xing et al., 2019).

Cabe recalcar que el modelo empleando Random Forest va a presentar siempre un buen rendimiento. El diagrama del algoritmo Random Forest es mostrado en la figura 5.

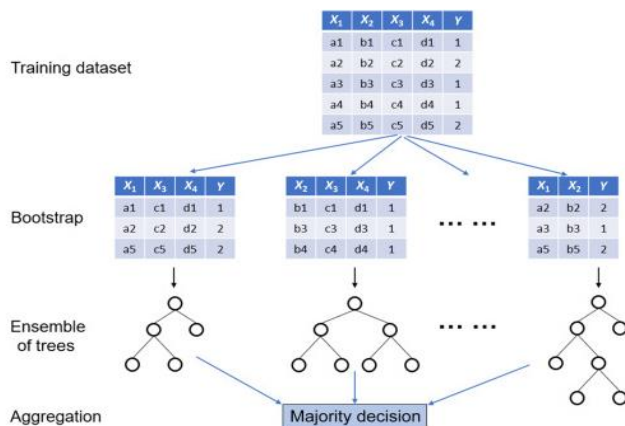


Figura 5. Modelo Random Forest

Nota. Adaptada de "Chapter 9 - Noninvasive fracture characterization based on the classification of sonic wave travel times", por Siddharth, M. y Hao L., 2020, Elsevier, 1, p. 243-287 ( <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817736-5.00009-0>)

### AdaBoost

El segundo método es bastante resistente al sobreajuste generado por datos experimentales inexactos, esto se debe a que en este método se construyen clasificadores posteriores, los cuales modifican instancias mal clasificadas por clasificadores anteriores; permitiendo que sus pesos aumenten en comparación con los clasificados correctamente, de modo que el nuevo clasificador se centre más en los ejemplos incorrectos (Sprenger et al., 2017). La figura 6 muestra el modelo Adaboost.

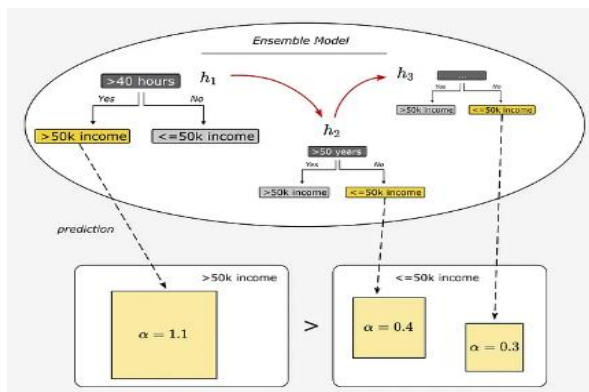


Figura 6. Modelo AdaBoost

Nota. Adaptada de "Chapter 9 - Noninvasive fracture characterization based on the classification of sonic wave travel times", por Siddharth, M. y Hao L., 2020, Elsevier, 1, p. 243-287 ( <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817736-5.00009-0>)

### Gradient Boosting

Finalmente, este es el método principal para el aprendizaje de problemas con características heterogéneas, datos ruidosos y dependencias complejas, ya que se compone de un conjunto de árboles de decisión individuales que están entrenados de forma secuencial, lo que permite que cada árbol nuevo pueda mejorar los errores de los árboles anteriores (Dorogush et al., 2018). Estos tres métodos fueron comparados estadísticamente para determinar el mejor método a emplear para predecir la cantidad de glucosa. La figura 7 muestra el modelo Gradiente Boosting.

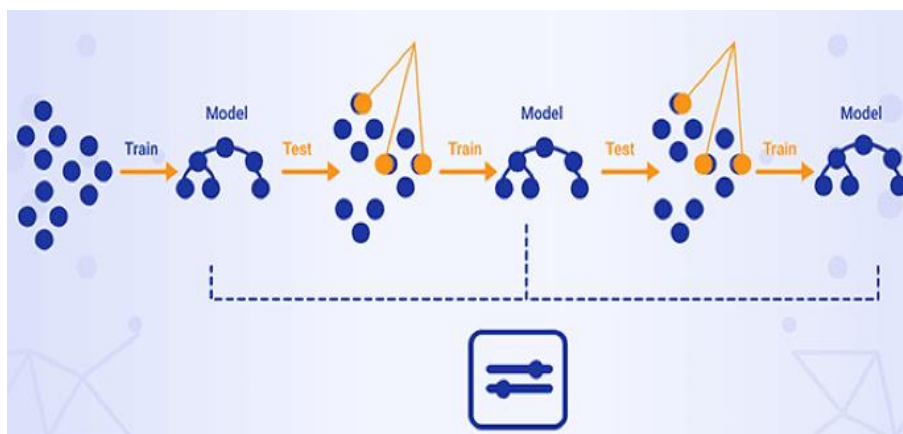


Figura 7. Modelo Gradient Boosting

Nota. Adaptada de: "Chapter 9 - Noninvasive fracture characterization based on the classification of sonic wave travel times", por Siddharth, M. y Hao L., 2020, Elsevier, 1, p. 243-287 ( <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817736-5.00009-0>)

### Resultados de la prueba piloto de producción de bioetanol

Se realizó las pruebas de laboratorio en la Universidad de Machala, Ecuador. Las siguientes variables fueron determinadas: el pH, oxígeno disuelto, la demanda química de oxígeno y el contenido de glucosa para producir bioetanol. Además, con ayuda de 0.5 de porcentaje residuo y 0.2 ml de concentración de la enzima usada en la hidrólisis enzimática se realizaron aproximadamente 956 experimentos en 5 meses, donde su análisis estadístico se muestra en la Tabla 2.

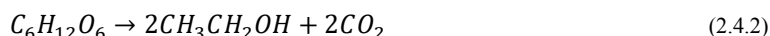
Tabla 2. Análisis estadístico

	Glucosa [g/L]	% Ca-cao	Enzima [L]	pH	DO [g/L]	DO [g/L]
<b>Media</b>	0,85	0,5	0,2	4,76	14,57	0,61
<b>Mínimo</b>	0,61	0,5	0,2	4,33	13,46	0,56
<b>Maximo</b>	1,09	0,5	0,2	5,08	15,71	0,65

Con respecto a la cantidad de etanol a predecir, se halló empleando la Ecuación (2.4.1):

$$\text{Etanol} \left( \frac{g}{L} \right) = \frac{(X_i \times 92140)}{18015.6} \quad (2.4.1)$$

donde la cantidad de glucosa previamente calculada está representada por  $X_i$  donde  $i \in \{1, \dots, 956\}$ . Esta ecuación proviene de la reacción química, identificada como Ecuación (2.4.2) (Castro Giraldez et al., 2018).



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio, se utilizó la cáscara de la mazorca de cacao para producir bioetanol y el proceso de hidrólisis enzimática pudo determinar un valor máximo de glucosa experimental y alcohol etílico (Tabla 3). Los 7.1 g/L de alcohol etílico son superiores a los reportados por Shet et al. (2018), quienes encontraron 2 g/L de alcohol etílico experimental, debido a que realizaron una hidrólisis ácida con ácido clorhídrico, lo que generó la formación de productos tóxicos que directamente afectó la fermentación. Esto se justifica ya que en la hidrólisis ácida se obtuvo un valor máximo de glucosa experimental de 2.37 g/L superior al de nuestro estudio; sin embargo, no se pudo obtener una concentración de alcohol etílico adecuada.

En los experimentos que utilizan aprendizaje automático, incluidos los tres métodos para estimar la glucosa predicha, además se obtiene una precisión con el R2 de determinación del modelo que representa la eficiencia de este y es el más alto conseguido hasta el momento, el cual se obtuvo con el método de Random Forest, como se muestra en la Tabla 4.

El valor de precisión del R2 de determinación fue de 0.83 encontrado en este estudio y es mayor al que fue encontrado por Awolu y Oyeyemi (2015), que busca predecir la cantidad de bioetanol a través de un modelo de predicción optimizado, utilizando la metodología de superficie de respuesta (RSM), que resultó un R2 de determinación de 0.5642. Este resultado confirma aún más la precisión del modelo Random Forest en comparación con otras técnicas.

Además, demuestra que el aprendizaje automático es una gran alternativa para la predicción de modelos tan complejos como el caso del bioetanol.

En el presente estudio se realizaron 956 experimentos donde se pudo obtener el error de raíz cuadrática media (RMSE) más bajo en el método Random Forest, permitiendo tener una mayor precisión en el modelo de predicción ya que la glucosa experimental mínima (0.61) no presenta una diferencia grande con respecto a la glucosa predicha mínima (0.64).

Este resultado permite confirmar los hallazgos en el estudio realizado por Speiser et al. (2019), que en similitud con nuestro estudio analiza conjuntos de datos con 956 observaciones a menos, concluyendo que el método de Random Forest tiende a tener tasas de error más bajas permitiendo tener un mejor ajuste en sus modelos.

En la Figura 8, se analiza la correlación entre las variables a través de Pearson, que miden el grado de relación lineal entre cada par de elementos o variables. Los valores de correlación pueden estar entre -1 y +1.

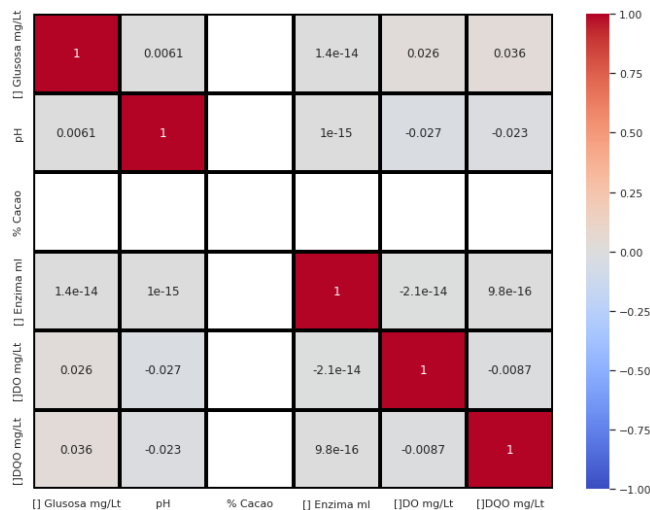


Figura 8. Matriz de correlación de variables

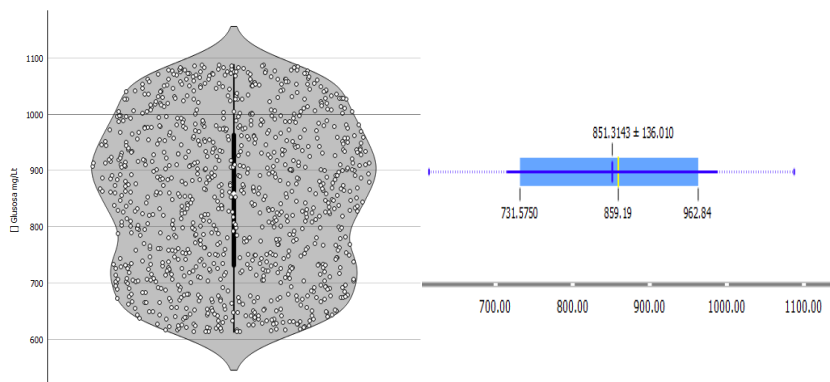


Figura 9. Gráfico de violín y Box-Plot para la concentración de glucosa.

En la figura 9, se muestra el diagrama violín para visualizar la distribución de los datos y su densidad de probabilidad con los datos preparados y suavizados para este análisis de datos. Este gráfico es una combinación de un box-plot junto con un gráfico de densidad girado y colocado a cada lado para mostrar la forma de la distribución de datos. Los valores de la glucosa están en el box-plot en el primer cuartil al 25% es de 731.57 mg/L, para la mediana

o segundo cuartil es 859.19 mg/L, en el tercer cuartil al 75% es de 962.84 mg/L. Se tiene una media de Glucosa de 851.31 mg/L y una desviación estándar de  $\pm 136$ .

La barra negra gruesa en el centro representa el rango intercuartílico, la barra negra delgada que se extiende desde ella representa los intervalos de confianza del 95 % y el punto blanco en el centro es la mediana.

Además, la comparación de los tres métodos de aprendizaje automático se puede ver en la Tabla 3. En el modelo de aprendizaje automático Random Forest se observa una mayor precisión con un R cuadrado (0.83) con respecto a los demás. Por otro lado, se presenta una raíz del error cuadrático medio bastante bajo RMSE (55.06), esto indica que hay un mejor ajuste y que el modelo tiene una mayor precisión en la predicción de la concentración de glucosa.

Tabla 3. Comparación de los modelos de predicción de la concentración de glucosa

Modelo	Error cuadrático medio (MSE)	Error de raíz cuadrada media (RMSE)	Error absoluto medio (MAE)	R2
<b>Random Forest</b>	3032.11	55.06	44.83	0.830
<b>AdaBoost</b>	17519.62	132.36	114.16	0.027
<b>Gradient Boosting</b>	13002.57	114.03	96.79	0.278

Posteriormente se realiza la simulación para predecir la concentración de glucosa con el método Random Forest (Ecuación 2.4.1), obteniendo los resultados en la Tabla 4.

Tabla 4. Comparación del proceso experimental con la simulación

	Glucosa experimental [g/L]	Glucosa predicha [g/L]	Bioetanol experimental [g/L]	Bioetanol predicho [g/L]
<b>Media</b>	0,85	0,85	-	4,36
<b>Mínimo</b>	0,61	0,64	-	3,28
<b>Maximo</b>	1,09	1,04	7,10	5,34

A continuación, se presenta los datos reales con el modelo Random Forest ajustado.

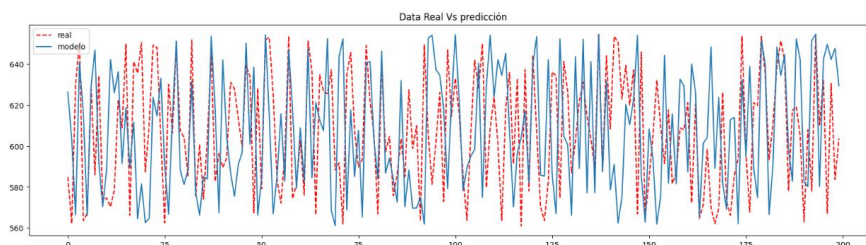


Figura 10. Modelo Random Forest para determinación de la Glucosa con R2:0.830

## CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio indican que el Machine Learning es una buena opción como herramienta para predecir el desempeño del etanol en un proceso de hidrólisis enzimática y fermentación a partir de la biomasa lignocelulósica de la cáscara de la mazorca de cacao, siendo un buen primer paso antes de pasar a gran escala, para lo cual se recomendaría un análisis de prefactibilidad y posteriormente un estudio de factibilidad si el proyecto es viable, para implementarlo en la provincia de Tocache. Además, el Machine Learning sigue demostrando que tiene un gran potencial como técnica de simulación porque se puede aplicar en diferentes campos, aportando precisión y calidad en sus modelos propuestos. Asimismo, su uso es menos costoso y los resultados se pueden obtener en el menor tiempo posible en comparación con los procedimientos experimentales. La calidad de este estudio indica que los resultados de investigaciones adicionales sobre la producción de bioetanol a partir de la cáscara de la mazorca de cacao se pueden utilizar para ampliar y aumentar continuamente la verificación del modelo propuesto.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por Hugo Romero de la Universidad Técnica de Machala y Alexander Román, estudiante de Ingeniería de Sistemas de la Universidad de Lima.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adjin Tetteh, M., Asiedu, N., Dodoo Arhin, D., Karam, A., & Amaniampong, P. N. (2018). Thermochemical conversion and characterization of cocoa pod husks a potential agricultural waste from Ghana. *Industrial Crops and Products*, 119, 304-312. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.060>.
- Akhtar, N., Goyal, D., & Goyal, A. (2017). Characterization of microwave-alkali-acid pre-treated rice straw for optimization of ethanol production via simultaneous saccharification and fermentation (SSF). *Energy Conversion and Management*, 141, 133-144. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2016.06.081>.
- Alvarez-Barreto, J. F., Larrea, F., Pinos, M. C., Benalcázar, J., Oña, D., Andino, C., ... & Almeida-Streitwieser, D. (2021). Chemical pretreatments on residual cocoa pod shell biomass for bioethanol production. *Rev. Bionatura.*, 6, 1490-1500.
- Ang, T. Z., Salem, M., Kamarol, M., Das, H. S., Nazari, M. A., & Prabakaran, N. (2022). A comprehensive study of renewable energy sources: Classifications, challenges and suggestions. *Energy Strategy Reviews*, 43, 100939. <https://doi.org/10.1016/j.esr.2022.100939>
- Awolu, O., & Oyeyemi, S. O. (2015) Optimization of bioethanol production from cocoa (*Theobroma cacao*) bean shell. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(4), 506-514. <https://www.ijcmas.com/vol-4-4/Awolu,%20OlugbengaOlufemi%20and%20Oyeyemi,%20Sanjo%20Oyetuji.pdf>.
- Banerjee, S., Kaushik, S., & Tomar, R. S. (2019). Global scenario of biofuel production: Past, present and future. *Prospects of Renewable Bioprocessing in Future Energy Systems*, 499-518. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-14463-0\\_18](https://doi.org/10.1007/978-3-030-14463-0_18).
- Bonilla, H. R., Balón, C. M., Moreno, A. P., & Pesantez, F. R. (2019). Estudio cinético de la producción de bioetanol a partir de residuos agroindustriales de la cáscara de banano maduro. *Industrial data*, 22(1), 187-202. <https://doi.org/10.15381/idata.v22i1.16534>.
- Castro Giraldez, M., Tomás Egea, J. Á., Ortolá Ortolá, M., & Fito Suñer, P. J. (2018). Comparación de combustibles utilizados en quemadores industriales acoplados a un secador. *Universidad Politécnica de Valencia*. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/104147/Castro%3bTom%20c3%a1s%3bOrtol%20c3%a1%20-%20Comparaci%20c3%b3n%20de%20combustibles%20utilizados%20en%20quemadores%20industriales%20acoplados....pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Comité de Operación Económica del Sistema Interconectado Nacional (2019), *Informe de Diagnóstico de las Condiciones Operativas del SEIN, Periodo 2021-2030*. [http://www.coes.org.pe/portal/browser/download?url=Planificación%2FPlan de 50 Transmision%2FActualización Plan de Transmisión 2021 - 2030%2F02. Informe de Diagnóstico 2021-2030%2F 01. Informe%2FInforme COES-DP 01-2019\\_COMPLETO.pdf](http://www.coes.org.pe/portal/browser/download?url=Planificación%2FPlan de 50 Transmision%2FActualización Plan de Transmisión 2021 - 2030%2F02. Informe de Diagnóstico 2021-2030%2F 01. Informe%2FInforme COES-DP 01-2019_COMPLETO.pdf).

- Chohan, N. A., Aruwajoye, G. S., Sewsynker-Sukai, Y., & Kana, E. G. (2020). Valorisation of potato peel wastes for bioethanol production using simultaneous saccharification and fermentation: process optimization and kinetic assessment. *Renewable Energy*, 146, 1031-1040. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.07.042>.
- Dorogush, A. V., Ershov, V., & Gulin, A. (2018). CatBoost: gradient boosting with categorical features support. *arXiv preprint arXiv*, 1810, 11363. <https://arxiv.org/abs/1810.11363>.
- Falcón-Roque, E. J., Marcos Martín, F., Pascual Castaño, C., Domínguez-Daface, L. C., & Bastante Flores, F. J. (2017). Energy planning model with renewable energy using optimization multicriteria techniques for isolated rural communities: Cajamarca province, Peru. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, 9(6). <https://doi.org/10.1063/1.4989574>
- Gramajo, M. G. (2020). Seizing Requirements Engineering Issues through Machine learning: A Systematic Mapping Study. *IEEE Latin America Transactions*, 18(7), 1164-1184. <https://latamt.ieeer9.org/index.php/transactions/article/view/54>
- Haripriya, S., Esakki Vigneswaran, E., & Jayanthi, S. (2022). Battery management system to estimate battery aging using deep learning and machine learning algorithms. *Journal of Physics. Conference Series*, 2325(1), 012004. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/2325/1/012004>
- Jannah, A. M., & Asip, F. (2015). Bioethanol production from coconut fiber using alkaline pretreatment and acid hydrolysis method. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology*, 5(5), 320-322. <https://core.ac.uk/reader/296919080>.
- Jansen, M. L., Bracher, J. M., Papapetridis, I., Verhoeven, M. D., de Bruijn, H., de Waal, P. P., ... & Pronk, J. T. (2017). *Saccharomyces cerevisiae* strains for second-generation ethanol production: from academic exploration to industrial implementation. *FEMS yeast research*, 17(5), fox044.
- Jaramillo, I., & Sanchez, A. (2018). Identification of Mass Flow Dynamics in a Pretreatment Continuous Tubular Reactor. *Computer Aided Chemical Engineering*. *Elsevier*, 43, 151-156. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64235-6.50028-0>.
- Jugwanth, Y., Sewsynker, Y., & Kana E. G. (2020). Valorization of sugarcane bagasse for bioethanol production through simultaneous saccharification and fermentation: Optimization and kinetic studies. *Fuel*, 262, 116552. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.116552>.
- Kochtcheeva, L. V. (2016). Renewable energy: global challenges. *E-International Relations*, 27. <https://www.e-ir.info/2016/05/27/renewable-energy-global-challenges/>.
- Laconi, E. B., & Jayanegara, A. (2015). Improving nutritional quality of cocoa pod (*Theobroma cacao*) through chemical and biological treatments for ruminant feeding: in vitro and in vivo evaluation. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 28(3), 343-350. <https://doi.org/10.5713/ajas.13.0798>.

- Marques, A. C., Fuinhas, J. A., & Pereira, D. A. (2018). Have fossil fuels been substituted by renewables? An empirical assessment for 10 European countries. *Energy policy*, 116, 257-265. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2018.02.021>.
- Osinermin. (2019). *Reporte Semestral de Monitoreo del Mercado de Hidrocarburos (informe nro.14)*. [https://www.osinermin.gob.pe/seccion/centro\\_documental/Institucional/Estudios\\_Economicos/Reportes\\_de\\_Mercado/Osinermin-RSMMH-I-2019.pdf](https://www.osinermin.gob.pe/seccion/centro_documental/Institucional/Estudios_Economicos/Reportes_de_Mercado/Osinermin-RSMMH-I-2019.pdf)
- Ramírez-Triana, C. A. (2017). Biofuels in the world and the Latin America (LAC) region. *Catálogo editorial*, 61-88. <https://journal.poligran.edu.co/index.php/libros/article/view/1991/1909>.
- Romero, E., Garcia-Lopez, Y. (2023). Techniques of Machine learning applied to reduce employee turnover in a company cleaning and disinfection. Proceedings of the 3rd Indian International Conference on Industrial Engineering and Operations Management New Delhi, India, November 2-4, 2023. ISSN / E-ISSN: 2169-8767. <https://index.ieomsocietcity.org>
- Shet, V. B., Bhat, M., Naik, M., Mascarenhas, L. N., Goveas, L. C., Rao, C. V., ... & Aparna, A. (2018). Acid hydrolysis optimization of cocoa pod shell using response surface methodology approach toward ethanol production. *Agriculture and Natural Resources*, 52(6), 581-587.
- Shorten, C., & Khoshgoftaar, T. M. (2019). A survey on image data augmentation for deep learning. *Journal of big data*, 6(1), 1-48. <https://doi.org/10.1186/s40537-019-0197-0>.
- Siddharth, M., & Hao, L. (2020). Noninvasive fracture characterization based on the classification of sonic wave travel times. *Elsevier*, 243 - 287. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817736-5.00009-0>
- Smuga-Kogut, M., Kogut, T., Markiewicz, R., & Słowik, A. (2021). Use of Machine Learning Methods for Predicting Amount of Bioethanol Obtained from Lignocellulosic Biomass with the Use of Ionic Liquids for Pretreatment. *Energies*, 14(1), 243. <https://doi.org/10.3390/en14010243>.
- Speiser, J. L., Miller, M. E., Tooze, J., & Ip, E. (2019). A comparison of random forest variable selection methods for classification prediction modeling. *Expert systems with applications*, 134, 93-101. <https://doi.org/10.1016/j.eswa.2019.05.028>.
- Sprenger, M., Schemm, S., Oechslin, R., & Jenkner, J. (2017). Nowcasting foehn wind events using the adaboost machine learning algorithm. *Weather and Forecasting*, 32(3), 1079-1099. <https://doi.org/10.1175/WAF-D-16-0208.1>.
- Torroba, A., Orozco Montoya, R. A., & Productivo, D. (2022). *Atlas de los biocombustibles líquidos 2021-2022*. (2ª ed). Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. <https://repositorio.iica.int/handle/11324/21328>.
- Torroba, A., & Brenes Porrás, C. (2022). *Estado de los biocombustibles líquidos en las Américas*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. <https://repositorio.iica.int/handle/11324/21279>.

- Vallejos-Romero, D., Deudor-Fernandez, C., Garcia-Lopez, Y. (2022). Use of machine learning to predict profit in LPG distribution in metropolitan Lima. *DYNA New Technologies, Jan-Dec. 2022*, vol. 9, no. 1, [9P.]
- Xing, J., Wang, H., Luo, K., Wang, S., Bai, Y., & Fan, J. (2019). Predictive single-step kinetic model of biomass devolatilization for CFD applications: A comparison study of empirical correlations (EC), artificial neural networks (ANN) and random forest (RF). *Renewable Energy*, 136, 104-114. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.12.088>.
- Zabed, H., Sahu, J. N., Suely, A., Boyce, A. N., & Faruq, G. (2017). Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 71, 475-501. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.076>.
- Zentou, H., Rosli, N. S., Wen, C. H., Abdul Azeez, K., & Gomes, C. (2019). The viability of biofuels in developing countries: Successes, failures, and challenges. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 38(4), 173-182. [https://www.ijcce.ac.ir/article\\_35879\\_a06ce3ef12267266e4812b-be1a4d7a4d.pdf](https://www.ijcce.ac.ir/article_35879_a06ce3ef12267266e4812b-be1a4d7a4d.pdf).

# Obtención de un edulcorante funcional (celobiosa) a partir de *Gossypium hirsutum*, para uso de personas con hiperglicemia

Obtaining a functional sweetener (cellobiose) from *Gossypium hirsutum*, for use by people with hyperglycemia

**Geanina Machuca Loja**  
Universidad Estatal de Milagro  
geanijacqueline@gmail.com  
ORCID: 0000-0002-6798-9074

**Humberto Ayala Armijos**  
Universidad Técnica de Machala  
jayala@utmachala.edu.ec  
ORCID: 0000-0003-0148-4433

**Joaquín Sigüenza Toledo**  
Universidad Técnica de Machala  
jsiguenza@utmachala.edu.ec  
ORCID: 0000-0003-4115-8878;

**Carolina Beltran Balarezo**  
Universidad Técnica de Machala  
cbeltran@utmachala.edu.ec  
ORCID: 0000-0003-3525-1021 .

**Gabriela Armijos Cabrera**  
Universidad Técnica de Machala  
gvarmijos@utmachala.edu.ec  
ORCID: 0000-0001-8391-3048

Revista Científica de Biotecnología Vol.1 N°1

Versión electrónica

<https://investigacion.utmachala.edu.ec/revistas/index.php/biotecnologia>

## RESUMEN

La estructura cristalina y amorfa de la celulosa en el algodón es el principal obstáculo para la extracción de azúcares prebióticos mediante procesos enzimáticos. El objetivo de esta investigación fue reducir la cristalinidad de la celulosa del algodón (125  $\mu\text{m}$ ) aplicando pretratamientos hidrotermos y alcalinos e incrementando la producción de azúcares. Para incrementar la producción de azúcares fermentables, se preparó una solución al 4% de algodón molido y se sometió a un pretratamiento hidrotermal a 121°C por lapsos de tiempo (15, 30 y 45 minutos) y otro alcalino agregando hidróxido de sodio en tres concentraciones diferentes (0.5, 1 y 1.5%) y se agitó a 120 rpm por una hora, luego se ajustó a pH 4.8 y se adicionó 30 FPU de  $\beta$ -glucosidasa y se mantuvo agitado a 120 rpm por 144 horas. En los hidrolizados donde se aplicó pretratamiento hidrotérmico a 121°C por 45 minutos se logró 34.62  $\pm$  0.14% de hidrólisis de celulosa a celobiosa y 5.14%  $\pm$  0.03% de hidrólisis de celulosa a glucosa al cabo de 24 horas de proceso, y en los hidrolizados donde fue pretratada con hidróxido de sodio al 0,5%, la celulosa se hidrolizó a celobiosa en 10.5  $\pm$  0,04% y de celulosa a glucosa en 36,63  $\pm$  0,27%, y luego de 48 horas de proceso. Los experimentos pretratados hidrotérmicamente a 121 °C durante 45 minutos alcanzaron un mayor porcentaje de hidrólisis parcial de la celulosa y los pretratados con 1,5 % de NaOH alcanzaron un mayor porcentaje de hidrólisis total de la celulosa del algodón. Por lo tanto, la aplicación de pretratamiento hidrotermal a la celulosa del algodón (125  $\mu\text{m}$ ) aumenta en un 32.30% la hidrólisis parcial de la celulosa y el pretratamiento alcalino en un 6.07% de hidrólisis parcial con respecto al testigo, si existe diferencia significativa entre los dos pretratamientos aplicados para la producción de celobiosa.

**Palabras clave:** Algodón, celobiosa, hidrotermal,  $\beta$ -glucosidasa, celulosa.

## ABSTRACT

The crystalline and amorphous structure of cellulose in cotton is the main obstacle to the extraction of prebiotic sugars by enzymatic processes. The objective of this research was to reduce the crystallinity of cotton cellulose (125  $\mu\text{m}$ ) by applying hydrothermal and alkaline pretreatments and increasing the production of sugars. To increase the production of fermentable sugars, a 4% solution of ground cotton was prepared and subjected to a hydrothermal pretreatment at 121°C for periods of time (15, 30 and 45 minutes) and another alkaline by adding sodium hydroxide in three different concentrations (0.5, 1 and 1.5%) and was stirred at 120 rpm for one hour, then adjusted to pH 4.8 and 30 FPU of  $\beta$ -glucosidase was added and kept stirred at 120 rpm for 144 hours. In the hydrolysates where hydrothermal pretreatment was applied at 121°C for 45 minutes, 34.62  $\pm$  0.14% of cellulose hydrolysis to cellobiose and 5.14%  $\pm$  0.03% of cellulose to glucose hydrolysis was achieved after 24 hours of the process, and in the hydrolyzed where it was pretreated

with 0.5% sodium hydroxide, the cellulose was hydrolyzed to cellobiose in  $10.5 \pm 0.04\%$  and from cellulose to glucose in  $36.63 \pm 0.27\%$ , and after 48 hours of processing. The experiments pretreated hydrothermally at  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 45 minutes reached a higher percentage of partial hydrolysis of the cellulose and those pretreated with 1.5% NaOH reached a higher percentage of total hydrolysis of the cotton cellulose. Therefore, the application of hydrothermal pretreatment to cotton cellulose ( $125\text{ }\mu\text{m}$ ) increases the partial hydrolysis of the cellulose by 32.30% and the alkaline pretreatment by 6.07% of partial hydrolysis with respect to the control, if there is a significant difference between the two pretreatments applied for cellobiose production.

**Keywords:** Cotton, cellobiose, hydrothermal,  $\beta$ -glucosidase, cellulose.

## INTRODUCCIÓN

El algodón es una de las fibras naturales más aclamadas del género *Gossypium* compuesta por celulosa con unidades estructurales de 1,4-d-glucopiranosas, su composición es: celulosa 94%, proteínas 1.3%, pectina 0.9%, sales minerales 1.2%, ácidos orgánicos 0.8% y otros 1.8% (Hauser, 2015).

Las unidades de anhidroglucosa están unidas como beta-celobiosa; por lo tanto, la anhidro-beta-celobiosa es la unidad repetitiva de la cadena polimérica. El número de unidades repetidas unidas para formar el polímero de celulosa se denomina "grado de polimerización" (Adler et al., 2022).

La conversión enzimática de biomasa celulósica rica en celulosa a celobiosa gana atención debido a las aplicaciones prebióticas emergentes como alimentos funcionales (Chen et al., 2021).

La celobiosa es un edulcorante funcional sin calorías y un potencial aditivo saludable para alimentos y piensos. Este disacárido consta de dos moléculas de glucosa unidas por un enlace  $\beta$ -(1-4)-glucosídico, se diferencia de la maltosa por su configuración en el enlace glucosídico que puede ser  $\alpha$  o  $\beta$  (Parisutham et al., 2017).

Los celo-oligacaridos (COS) son oligómeros con un grado de polimerización (GP) entre 3 y 10 y consisten en unidades de glucosilo conectadas por enlaces  $\beta$ -(1-4)-glucosídicos. El disacárido celobiosa y el COS con un GP de 3 a 6 son solubles en agua, pero no pueden ser digeridos por humanos (Ávila et al., 2021).

Los procesos para la síntesis enzimática de celobiosa a partir de celulosa requiere de pretratamientos alcalinos usando hidróxido de sodio para ablandar e inchar la molécula de celulosa, luego se debe ajustar el pH a 4.8 para la adición de las enzimas celulasas y mantener la temperatura a  $50^{\circ}\text{C}$  con agitación de 900 rpm y de esta manera ocurra la despolimerización incompleta de celulosa a celobiosa (Siccama et al., 2022). Las exoglucanasas hidrolizan los extremos de la cadena reductora o no reductora para producir celobiosa (Méndez-Líter et al., 2017).

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la obtención de celobiosa a partir de la celulosa presente en el algodón mediante hidrólisis enzimática utilizando  $\beta$ -glucosidasa producida por *Trichoderma reesei* ATCC 2692.

## METODOLOGÍA

### Materiales

El algodón objeto de estudio fueron recogidas en el cantón Huaquillas, parroquia Chacras, provincia de El Oro, Ecuador, se secaron y trituro hasta un tamaño de partícula de  $\leq 125 \mu\text{m}$ . Para la hidrólisis enzimática se utilizó enzima comercial Celluclast® 1.5L (188 FPU) de Sigma-Aldrich (Alemania), hidróxido de sodio de Sigma-Aldrich (St Louis, USA), celobiosa (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg - Alemania).

### Métodos

#### Composición química del algodón

La determinación de celulosa presente en el algodón fue realizada según la metodología del Laboratorio Nacional de Energía Renovable (NREL) (Sluiter et al., 2012), las cenizas por termo gravimetría (Eliche et al., 2017) utilizando el espectrómetro Bruker-AXS modelo S4 Pioneer.

#### Cristalinidad de la celulosa del algodón

La cristalinidad relativa de la celulosa del algodón cruda y molida ( $\leq 125 \mu\text{m}$ ), fueron analizadas por difracción de rayos. El análisis se realizó en un Espectrómetro de fluorescencia de rayos X (XRF) Bruker - AXS, modelo S4 Pioneer. La intensidad de difracción de la radiación  $\text{Cu K}\alpha$  (longitud de onda de 0.154 nm, bajo condiciones de 40 kV y 40 mA) se midió con un rango de exploración entre  $5^\circ$  y  $50^\circ$  ( $2\theta$ ) (Lou et al., 2013).

La cristalinidad relativa se la cálculo empleando la siguiente ecuación (Oliveira et al., 2017).

$$RC (\%) = \frac{A_c}{A_c - A_a} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde  $A_c$  es el área cristalina y  $A_a$  es el área amorfa en el área de los difractogramas de rayos X.

#### Pretratamiento de la celulosa del algodón

Para aumentar la superficie de contacto, reducir la cristalinidad relativa y disminuir la hidrorrepelencia de la celulosa del algodón, se trituro a tamaño de partícula de  $\leq 125 \mu\text{m}$ . Luego para ablandar a la celulosa, se preparó una solución de celulosa de algodón al 3% (m/v) y se aplicó dos pretratamientos:



hidrótermico a 121°C por tres lapsos de tiempo (15, 30 y 45 minutos) e hidróxido de sodio en tres concentraciones diferentes (0.5, 1 y 1.5%) y se agito a 300 rpm durante una hora (Huang et al., 2018).

### Cuantificación de celobiosa

Para cuantificar la celobiosa, resultantes de la hidrólisis enzimática parcial de la celulosa del algodón previamente pretratadas hidrotermicamente a 121°C por tres lapsos de tiempo diferentes (15, 30 y 45 minutos) y alcalino con NaOH en tres concentraciones diferentes (0.5, 1 y 1.5%), se tomaron muestras en un tubo eppendorf de 1.5 mL y centrifugaron a 10000 rpm por 5 minutos, luego filtraron utilizando un filtro jeringa de 0.22 µm y se almacenaron en viales para el análisis por HPLC. A continuación, se analizaron los patrones de calibración y las muestras con un HPLC (Agilent 1100, Alemania) equipado con un detector de índice de refracción (G-1362A XR RI). Se empleó una columna SUPERCOGEL C-610H. La temperatura de la columna se fijó a 50°C, para la fase móvil se utilizó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a concentración 5 mM a un caudal de 0,6 mL / min y un tiempo de corrida de 35 minutos (Sluiter et al., 2012).

### Hidrólisis enzimática parcial de la celulosa

Después del pretratamiento hidrótermico y alcalino, la hidrólisis enzimática parcial de la celulosa de algodón (125 µm) se llevó a cabo en viales de 120 mL para lo cual se prepara una solución de celulosa al 4% (p/v), se ajustó el pH (4.8) en las muestras pretratadas con álcalis se añadió ácido clorhídrico al 20% (v/v), luego se adiciono la enzima Celluclast 1.5L (β- glucosidasa) a 30 FPU/g carbohidratos y se colocaron en un agitador orbital a 50°C y 300 rpm durante 72 horas ( Kumar et al., 2019). Se tomaron muestras cada 24 horas, se centrifugaron durante 5 minutos a 10000 rpm usando una mini centrífuga ELMI-Sky Line y se filtraron en filtro de jeringa de 0.22 µm (Millipore, Bedford, MA). La producción de celobiosa se cuantifico por HPLC.

El rendimiento porcentual de celobiosa se lo calculo mediante la fórmula que a continuación se detalla (Resch et al., 2015).

$$\% \text{ de conversión} = \frac{\left(\frac{\text{mg azúcar}}{\text{ml}}\right) \times 1.4 \text{ ml} \times H}{\left(\frac{\text{mg polisacáridos}}{\text{g biomasa}}\right) \times 0.014 \text{ g biomasa}} \times 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde

H = factor de hidrólisis específico para cada combinación polisacárido/azúcar

mg/ml de azúcar es de análisis de HPLC

g de polisacárido / g de biomasa proviene del análisis de composición.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Composición proximal del algodón

Conocer la composición química del algodón es un requisito esencial para saber la cantidad de celulosa disponible para hidrolizarse a celobiosa y glucosa. A continuación, en la tabla 1 se muestra la composición proximal de esta biomasa.

Tabla 1. Análisis composicional y próximo del algodón

Componentes	%	±
<b>Celulosa</b>	93,03	0,31
<b>Pectina</b>	1,04	0,43
<b>Proteínas</b>	1,5	0,308
<b>Cenizas</b>	1,41	0,46
<b>Humedad</b>	3,02	0,161

La celulosa del algodón es el principal componente hidrolizable, por lo cual se dispone de 93% para la obtención celobiosa. Investigaciones similares sobre la caracterización del algodón reportan concentraciones 73% de celulosa, proteína 1.3% y pectina 1,2% en base seca (Rashid & Dutta, 2020).

### Cristalinidad relativa del algodón

La fracción cristalina de la celulosa es la mayor resistencia que tiene este compuesto al hidrólisis enzimática. Los difractogramas de rayos X por altura de pico realizados al algodón crudo y molido (125 µm) se muestran en la Fig. 1. El algodón crudo mostro picos a  $2\theta = 22.2^\circ$  y  $16.7^\circ$  y el algodón molido mostro los picos a  $2\theta = 21.9^\circ$  y  $17.4^\circ$ , ángulos de difracción característicos de este tipo de biomasa. El algodón crudo presento 27% más de cristalinidad relativa que el algodón molido ( $\leq 125 \mu\text{m}$ ). La literatura reporta que a tamaños de partícula  $\leq 250 \mu\text{m}$ , la cristalinidad de la biomasa se reduce alrededor del 50% y la liberación de celobiosa y glucosa aumenta entre el 24 - 36% (Rashid & Dutta, 2020).

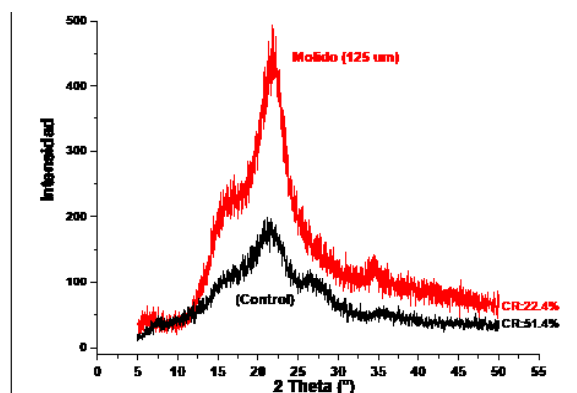


Figura. 1. Porcentaje de cristalinidad relativa: (A) algodón crudo y (B) molida (125 µm)

La cristalinidad relativa del algodón molido (125  $\mu\text{m}$ ) disminuyó con respecto al algodón crudo en un 29% y se eliminó la hidrorrepelencia del algodón crudo. Investigaciones realizadas con este material indican que al reducir el tamaño de partícula ( $< 400 \mu\text{m}$ ), se reduce la cristalinidad de la celulosa y aumentan los porcentajes de hidrólisis (Lopes et al., 2022).

### Hidrólisis enzimática del algodón

#### Hidrólisis parcial de celulosa

La hidrólisis completa de la celulosa es uno de los principales obstáculos de la tecnología de la biomasa, cuando este homopolisacárido forma parte de matrices complejas, gran parte de él se hidroliza a celodextrinas (celobiosa). La celobiosa es un disacárido que se obtiene de la hidrólisis parcial de la celulosa utilizando  $\beta$ -glucosidasas. A continuación, en la figura 2 se muestran las concentraciones de celobiosa y glucosa obtenidas de la hidrólisis del algodón molido (125  $\mu\text{m}$ ).

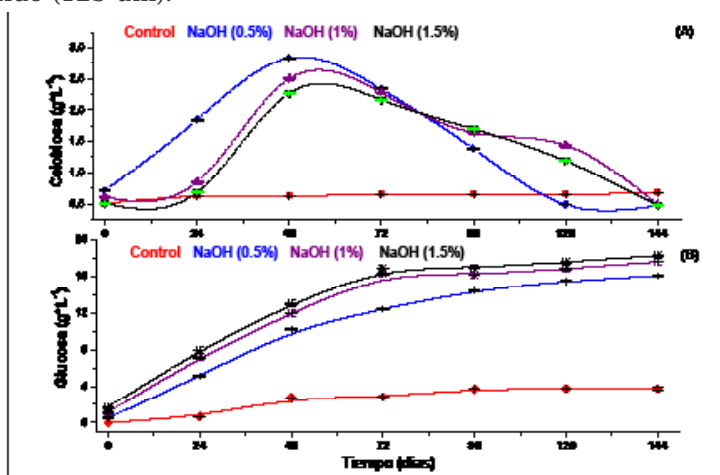


Figura 2. Formación de celobiosa y glucosa durante la hidrólisis enzimática del algodón

La aplicación de hidróxido de sodio (0.5%) como pretratamiento de ablandamiento de la celulosa produjo a las 48 horas de hidrólisis enzimática mayor concentración de celobiosa y menor cantidad de glucosa, y a mayor concentración de hidróxido de sodio (1.5%) menor cantidad de celobiosa y mayor concentración de glucosa, lo cual indica que el pretratamiento alcalino favorece la hidrólisis enzimática de celulosa a glucosa. El 10,14% de la celulosa se hidrolizó parcialmente a celobiosa y el 46,63% a glucosa, obteniéndose un 56,77% de hidrólisis total de la celulosa presente en el algodón.

Estudios de hidrólisis enzimática de fibra de coco reportan 72 g/L de glucosa utilizando una carga enzimática de 20 FPU de Cellic Ctec 2 (Wu, Hildebrand, Kasuga, Xiong, & Fan, 2013; Lebaz, Cockx, Spérandio, Liné, & Morchain, 2016), y 78,9% de hidrólisis de celulosa a glucosa (Nogueira et al., 2021).

En las muestras donde se aplicó pretratamiento hidrotérmico, se logró obtener mayores concentraciones de celobiosa, lo cual indica que solo se logró hinchar la celulosa mas no romperla. A continuación, en la figura 3 se muestran las concentraciones de celobiosa y glucosas obtenidos en las muestras pretratadas hidrotérmicamente.

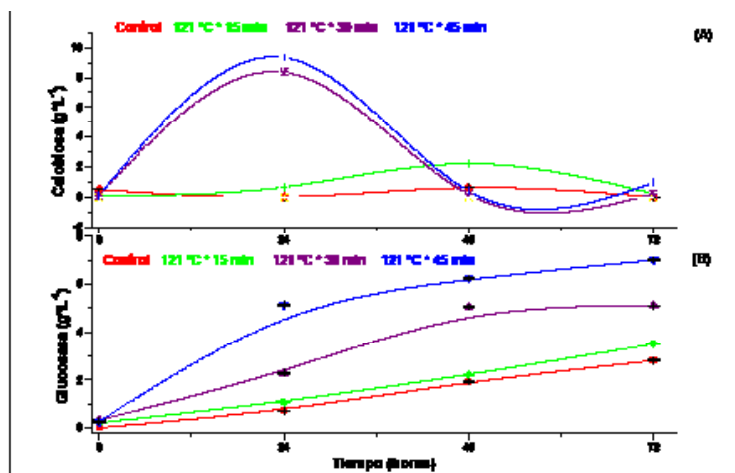


Figura 3. Formación de celobiosa y glucosa durante la hidrólisis enzimática del algodón pretratado hidrotérmicamente

La aplicación de temperatura (121°C \* 45 min) como pretratamiento de ablandamiento de la celulosa produjo a las 24 horas de hidrólisis enzimática mayor concentración de celobiosa y menor cantidad de glucosa, y a menor tiempo de pretratamiento hidrotérmico (121°C \* 15 min), menor cantidad de celobiosa y menor concentración de glucosa, lo cual indica que el pretratamiento hidrotérmico favorece la hidrólisis enzimática de celulosa a celobiosa. El 34.62% de la celulosa se hidrolizo parcialmente a celobiosa y el 18.42% a glucosa, obteniéndose un 51,89% de hidrólisis total de la celulosa presente en el algodón. Estudios sobre biomasa lignocelulosica utilizando beta glucosidasa es posible obtener porcentajes de hidrolisis significativos de celobiosa (Parisutham et al., 2017)

### Porcentajes de hidrolisis del algodón a celobiosa y glucosa

La hidrólisis total de la celulosa ha sido una característica clave de la despolimerización de biomasa celulósica, debido a la recalcitrancia y cristalinidad de la celulosa, lo cual limita el uso de enzimas hidrolíticas (celodextrinasa y celobiohidrolasa y  $\beta$ -glucosidasa). A continuación, en la figura 4 se muestran los porcentajes de hidrólisis parcial de la celulosa para obtener celobiosa y glucosa a partir del algodón molido (125  $\mu$ m).

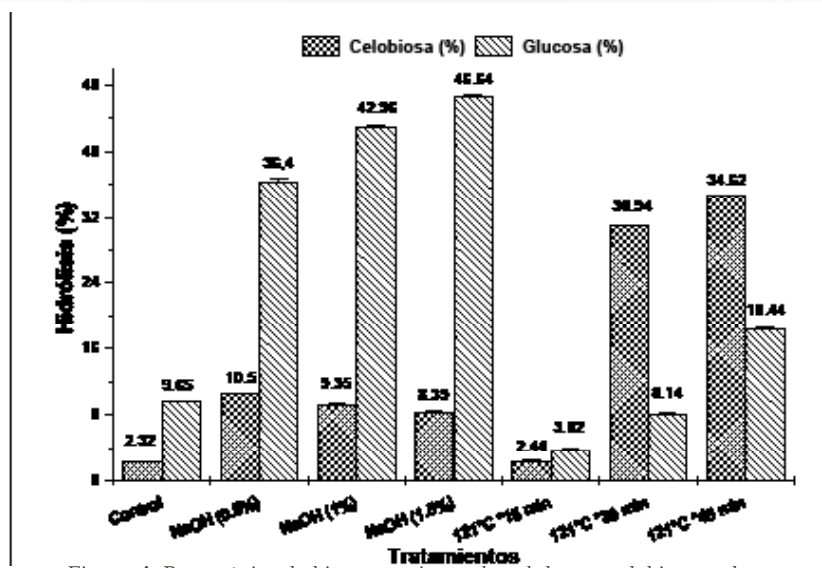


Figura 4. Porcentajes de bioconversiones de celulosa a celobiosa y glucosa

La bioconversión de celulosa a celobiosa en los pretratamientos hidrotérmicos (121°C \* 45 min) fue 34,62% en 24 horas de hidrólisis enzimática y la conversión de celulosa a glucosa fue de 18,64%, mientras que en las muestras pretratadas con hidróxido de sodio al 0,5%, la concentración de celobiosa fue 10,5% en 48 horas de hidrólisis enzimática, lo cual indica que a mayor concentración de álcalis mayor hidrólisis total de la celulosa. Estudios de hidrólisis enzimática de algodón blanco molido aplicando Celluclast y Cellic® CTec2 han logrado convertir un 32% de celulosa a celobiosa (Austad, 2018).

## CONCLUSIONES

La caracterización química del algodón nos indica que disponemos de un 93% celulosa para ser utilizada como sustrato para la enzima  $\beta$ - glucosidasa. El análisis de difracción de rayos X demostró que la reducción de tamaño de partícula ( $\leq 125 \mu\text{m}$ ), ayuda a reducir hasta un 43,57% de cristalinidad relativa del algodón molido con respecto al algodón crudo.

La aplicación del pretratamiento hidrotérmico (121°C por 45 minutos) al algodón molido a tamaño de partícula de 125  $\mu\text{m}$ , favorece la hidrólisis parcial de la celulosa, y se logra obtener un 34,62% de celobiosa, mientras que la aplicación de hidróxido de sodio a concentración de 0,5% se logra obtener un 10,5% de celobiosa, lo cual indica que la mayor parte de la celulosa se hidroliza totalmente a glucosa, lo que indica a mayor concentración de hidróxido de sodio, menor concentración de celobiosa y mayor concentración de glucosa.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler, A., Kumaniaev, I., Karacic, A., Baddigam, K. R., Hanes, R. J., Subbotina, E., Bartling, A. W., Huertas-Alonso, A. J., Moreno, A., Håkansson, H., Mathew, A. P., Beckham, G. T., & Samec, J. S. M. (2022). Lignin-first biorefining of Nordic poplar to produce cellulose fibers could displace cotton production on agricultural lands. *Joule*, 6(8), 1845-1858. <https://doi.org/10.1016/j.joule.2022.06.021>
- Austad, A. (2018). Enzymatic Conversion of Cotton Textiles. *Master's thesis, Norwegian University of Life Sciences, Ås*.
- Ávila, P. F., Silva, M. F., Martins, M., & Goldbeck, R. (2021). Cello-oligosaccharides production from lignocellulosic biomass and their emerging prebiotic applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(5), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03041-2>
- Chen, P., Shrotri, A., & Fukuoka, A. (2021). Synthesis of cello-oligosaccharides by depolymerization of cellulose: A review. *Applied Catalysis A: General*, 621(April), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2021.118177>
- Eliche, D., Felipe, M. A., Lopez, J. A., & Infantes, A. (2017). Characterization and evaluation of rice husk ash and wood ash in sustainable clay matrix bricks. *Ceramics International*, 43(1), 463-475. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.09.181>
- Huang, G., Peng, W., Yang, S., & Yang, C. (2018). Delignification kinetic modeling of NH<sub>4</sub>OH-KOH-AQ pulping for bagasse. *Industrial Crops and Products*, 123(April), 740-745. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.040>
- Kumar, A., Park, G. D., Patel, S. K. S., Kondaveeti, S., Otari, S., Anwar, M. Z., Kalia, V. C., Singh, Y., Kim, S. C., Cho, B. K., Sohn, J. H., Kim, D. R., Kang, Y. C., & Lee, J. K. (2019). SiO<sub>2</sub> microparticles with carbon nanotube-derived mesopores as an efficient support for enzyme immobilization. *Chemical Engineering Journal*, 359(October 2018), 1252-1264. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.11.052>
- Lopes, C. da S., Rigoli, I. C., Rovere, C. A. D., Rocha, C. L. F. d., & Souza, C. A. C. d. (2022). Electrodeposition and the properties of a Zn-Cotton nanocrystal composite coating. *Journal of Materials Research and Technology*, 17, 852-864. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2022.01.016>
- Lou, H., Wang, M., Lai, H., Lin, X., Zhou, M., Yang, D., & Qiu, X. (2013). Reducing non-productive adsorption of cellulase and enhancing enzymatic hydrolysis of lignocelluloses by noncovalent modification of lignin with lignosulfonate. *Bioresource Technology*, 146, 478-484. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.115>
- Méndez-Líter, J. A., Gil-Muñoz, J., Nieto-Domínguez, M., Barriuso, J., De Eugenio, L. I., & Martínez, M. J. (2017). A novel, highly efficient  $\beta$ -glucosidase with a cellulose-binding domain: Characterization and properties of native and recombinant proteins. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0946-2>

- Nogueira, C. da C., Padilha, C. E. de A., & Santos, E. S. dos. (2021). Boosting second-generation ethanol titers from green coconut fiber by using high-concentration polyethylene glycol. *Industrial Crops and Products*, 166(January), 113494. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113494>
- Oliveira, J. P. de, Bruni, G. P., Lima, K. O., Halal, S. L. M. El, Rosa, G. S. da, Dias, A. R. G., & Zavareze, E. da R. (2017). Cellulose fibers extracted from rice and oat husks and their application in hydrogel. *Food Chemistry*, 221, 153-160. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.048>
- Parisutham, V., Chandran, S. P., Mukhopadhyay, A., Lee, S. K., & Keasling, J. D. (2017). Intracellular cellobiose metabolism and its applications in lignocellulose-based biorefineries. *Bioresource Technology*, 239, 496-506. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.001>
- Proto, M., Supino, S., & Malandrino, O. (2000). Cotton: A flow cycle to exploit. *Industrial Crops and Products*, 11(2-3), 173-178. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(99\)00060-6](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(99)00060-6)
- Rashid, S., & Dutta, H. (2020). Characterization of nanocellulose extracted from short, medium and long grain rice husks. *Industrial Crops and Products*, 154(May), 112627. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112627>
- Resch, M. G., Baker, J. O., & Nrel, S. R. D. (2015). Low Solids Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass Low Solids Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass Laboratory Analytical Procedure (LAP). *Nrel, February*.
- Siccama, J. W., Oudejans, R., Zhang, L., Kabel, M. A., & Schutyser, M. A. I. (2022). Steering the formation of cellobiose and oligosaccharides during enzymatic hydrolysis of asparagus fibre. *Lwt*, 160(November 2021), 113273. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113273>
- Sluiter, a., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., & Crocker, D. (2012). NREL/TP-510-42618 analytical procedure - Determination of structural carbohydrates and lignin in Biomass. *Laboratory Analytical Procedure (LAP), April 2008*, 17. <https://doi.org/NREL/TP-510-42618>
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., & Crocker, D. (2012). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP) (NREL/TP-510-42618). *National Renewable Energy Laboratory (NREL), April 2008*, 17. <https://doi.org/NREL/TP-510-42618>
- Wu, W., Hildebrand, A., Kasuga, T., Xiong, X., & Fan, Z. (2013). Enzyme and Microbial Technology Direct cellobiose production from cellulose using sextuple beta -glucosidase gene deletion *Neurospora crassa* mutants. *Enzyme and Microbial Technology*, 52(3), 184-189. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2012.12.010>

