



# OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE LA CÁSCARA DE CACAO (*THEOBROMA CACAO*) USANDO *TRICHODERMA REESEI* Y *TRICHODERMA GHANENSE* PARA LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.

OBTAINING BIOETHANOL FROM COCOA SHELLS (*THEOBROMA CACAO*) USING  
*TRICHODERMA REESEI* AND *TRICHODERMA GHANENSE* FOR ENZYMATIC  
HYDROLYSIS.

Joel Eduardo Vielma-Puente<sup>1</sup>, Tatiana Zamora Zamora<sup>\*2</sup>, Luis Lenin  
Galarza Romero<sup>3,4</sup>, Meribary Margarita Monsalve<sup>2</sup>, Joan Vera Villalobos<sup>1</sup>,  
Viviana Andrea Corrales Mendoza<sup>1</sup>, Fernanda Carolina Chacha Coyago<sup>1</sup>,  
Darling Balón Cortez<sup>2</sup>, Leticia Villacis Morán<sup>2</sup> y Rodrigo Fernando  
Espinoza Lozano<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Departamento de Ciencias Químicas y Ambientales, Laboratorio c-SinQui, Campus Gustavo Galindo, Km. 30.5 vía Perimetral, 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador. [<https://ror.org/04qenc566>]

<sup>2</sup>Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Químicas. Ciudadela Universitaria – Av. Delta s/n, Guayaquil 090514, Ecuador. [<https://ror.org/047kyg834>]

<sup>3</sup>Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Facultad de Ciencias de la Vida, Campus Gustavo Galindo, Km. 30.5 vía Perimetral, 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador. [<https://ror.org/04qenc566>]

<sup>4</sup>Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), Campus Gustavo Galindo, Km. 30.5 vía Perimetral, 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador. [<https://ror.org/04qenc566>]

\*Autor para correspondencia: [tatiana.zamoraz@ug.edu.ec](mailto:tatiana.zamoraz@ug.edu.ec)

Manuscrito recibido el 04 de abril de 2022. Aceptado, tras revisión el 02 de junio de 2022. Publicado el 1 de septiembre de 2025.

## Resumen

El uso de combustibles fósiles genera gases de efecto invernadero (GEI), uno de los principales causantes del calentamiento global, problemática de gran interés en las últimas décadas. El uso de biocombustibles de segunda generación se ha vislumbrado como alternativa para sustituir o disminuir el uso de combustibles fósiles. Por esta razón, el presente trabajo tiene como objetivo obtener bioetanol a partir de la cáscara de cacao (*Theobroma cacao*) del clon CCN-51 obtenido en la Provincia de Los Ríos, Ecuador, por medio de una serie de pasos que involucran: a) pretratamiento alcalino, b) hidrólisis enzimática usando dos especies de hongos endófitos de la misma cáscara de cacao (*Trichoderma reesei* y *Trichoderma ghanense*) a diferentes concentraciones y c) fermentación alcohólica usando levadura

*Saccharomyces cerevisiae*. La cantidad de bioetanol obtenida del proceso fue determinada por medio de un cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama (FID). Los resultados muestran una producción moderada de bioetanol que va desde 0,024% v/v a 0,254% v/v lo que indica que la cáscara de cacao (*Theobroma cacao*) del clon CCN-51 es una matriz potencial para la producción de bioetanol.

**Palabras clave:** *Theobroma cacao*, *Trichoderma*, biomasa, bioetanol, fermentación alcohólica.

---

### Abstract

The use of fossil fuels generates Greenhouse Gases (GHG), one of the main causes of global overheating, which has become a problem in recent decades. The use of second generation of biofuels has been perceived as an alternative to replace or reduce the use of fossil fuels; for this reason, the present work aims to obtain bioethanol from cocoa shell (*Theobroma cacao*) of the clone CCN-51 obtained in Los Rios Province, Ecuador, through a series of steps involving: a) alkaline pretreatment, b) enzymatic hydrolysis using two species of endophytic fungi from the same cocoa shell (*Trichoderma reesei* and *Trichoderma ghanense*) at different concentration and c) alcoholic fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* yeast. The amount of bioethanol obtained from the process was determined by gas chromatograph with a flame ionization detector (FID). The results show a moderate production of bioethanol ranging from 0.024% v/v to 0.254% v/v, which indicates that the cocoa shell (*Theobroma cacao*) of clone CCN-51 is a potential matrix to bioethanol production.

**Keywords:** *Theobroma cacao*, *Trichoderma*, biomass, bioethanol, alcoholic fermentation.

---

Forma sugerida de citar: Vielma-Puente, J.E., Zamora Zamora, T., Galarza Romero, L.L., Monsalve, M.M., Vera Villalobos, J., Corrales Mendoza, V.A., Chacha Coyago, F.C., Balón Cortez, D., Villacis Morán, L. y Espinoza Lozano, R.F. (2025). Obtención de bioetanol a partir de la cáscara de cacao (*Theobroma cacao*) usando *Trichoderma reesei* y *Trichoderma ghanense* para la hidrólisis enzimática. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*. Vol. 42(2):154-165. <https://doi.org/10.17163/lgr.n42.2025.10>.

---

### IDs Orcid:

Joel Eduardo Vielma Puente: <https://orcid.org/0000-0003-1158-0680>  
Tatiana Zamora Zamora: <https://orcid.org/0000-0003-1115-5879>  
Luis Lenin Galarza Romero: <https://orcid.org/0000-0002-2870-4080>  
Meribary Monsalve Paredes: <https://orcid.org/0000-0002-4883-806X>  
Joan Vera Villalobos: <https://orcid.org/0000-0002-7782-9664>  
Viviana Andrea Corrales Mendoza: <https://orcid.org/0000-0002-3718-9092>  
Fernanda Carolina Chacha Coyago: <https://orcid.org/0000-0001-6716-1069>  
Darling Balón Cortez: <https://orcid.org/0000-0002-0323-2427>  
Leticia Villacis Morán: <https://orcid.org/0000-0001-5941-8290>  
Rodrigo Fernando Espinoza Lozano: <https://orcid.org/0000-0002-2051-2682>

## 1 Introducción

Con el transcurrir del tiempo, la actividad humana y el desarrollo industrial han convertido a los combustibles fósiles como la principal fuente de energía. En su proceso de extracción y producción una cantidad considerable de países, incluyendo Ecuador, se han beneficiado económicamente, pero también se han desencadenado problemáticas que no solo afectan a esos países productores, sino a todo el mundo en general. Un ejemplo de ello son las emisiones de Gases de Efecto Invernadero (GEI), causantes en gran parte del sobrecalentamiento global.

En las últimas décadas, la ciencia se ha enfocado en la búsqueda de formas de contrarrestar ese impacto ambiental, haciendo evidente una notable acogida a los biocombustibles de segunda generación (Wahono et al., 2014; Oliva et al., 2017). Esto se debe principalmente al hecho de que para su producción se utiliza biomasa lignocelulósica, cuyas fuentes de obtención pueden ser muy variadas, como por ejemplo desechos agroindustriales de cultivos de caña y maíz (Antizar-Ladislao and Turrión-Gomez, 2008) dando lugar al aprovechamiento de material vegetal que habitualmente es descartado (Khan et al., 2025), lo que conlleva a un doble beneficio desde el punto de vista ambiental: en primer lugar, se evita el descarte de material que se acumula en la superficie terrestre y para su eliminación se emplean procesos de combustión incompleta aún más contaminantes (Cury R et al., 2017; Orejuela-Escobar et al., 2021) y en segundo lugar el consumo de estos combustibles de segunda generación reduce considerablemente la proporción de GEI que son emitidos al medio ambiente (Morais et al., 2020).

Estudios preliminares sugieren que el aprovechamiento de residuos de cultivos agrícolas (tallos, hojas y cáscaras), cultivos no alimentarios, residuos forestales y desechos agroindustriales pudieran sostener el suministro requerido de bioetanol (Anwar et al., 2014). Ecuador, por ser un país rico en diversidad vegetal, está en la capacidad de generar material lignocelulósico que pueda ser aprovechado con ese fin.

Según registros durante los años 2007 a 2012, en el país se incrementó la exportación de grano tostado y cascarilla de cacao en un 184%, posicionando a Ecuador como uno de los mayores productores y

exportadores de cacao, llegando a alcanzar el cuarto lugar a nivel mundial (Teneda Llerena et al., 2019). Si se toma como referencia la Industria Chocolatera (Caviedes Rubio et al., 2024), ésta sólo utiliza para su producción los granos del cacao, lo que corresponde a un 30% del total del fruto, el otro 70% (cáscaras y pulpa mucilaginosas) es descartado (Sarmiento Hernández, 2019). Considerando la cantidad de residuos que se generan anualmente en Ecuador a partir de esta especie vegetal, se ha estimado que la producción de bioetanol empleando dicha biomasa se podría convertir en una vía alterna de generación de energía con gran aporte al consumo nacional de combustibles (Sigüencia Avila et al., 2020), pero hasta el momento no se ha logrado.

Adicionalmente, es importante señalar que la composición del material lignocelulósico depende de su origen (Anwar et al., 2014) y la cáscara de cacao no es la excepción, pues se reporta un bajo porcentaje de celulosa que varía según el tipo de cacao del que provenga, con una abundante cantidad de lignina y hemicelulosa, componentes que interfieren en la conversión de la celulosa a biocombustible (Sarmiento Hernández, 2019). Si a esto se suma la falta de información y/o concientización sobre la temática, se obtiene como resultado las principales razones por las que dichos residuos agroindustriales no son aprovechados adecuadamente.

La composición del material lignocelulósico afecta directamente las reacciones químicas y enzimáticas que permiten la producción de bioetanol (Winarsih and Siskawardani, 2020), por esto y lo mencionado previamente es necesario brindar alternativas que involucren el aprovechamiento de la biomasa con porcentajes de conversión adecuados para que el proceso sea rentable.

En función de ello, el material lignocelulósico debe ser pretratado y luego generar la hidrólisis enzimática, método que ha resultado ser eficaz, económico y específico para lograr azúcares fermentables en condiciones de reacción suave (Winarsih and Siskawardani, 2020). El proceso depende de factores como el pH, tiempo de fermentación, sustrato (biomasa), temperatura, actividad enzimática, entre otros (Anwar et al., 2014). Existe un gran número de microorganismos capaces de degradar la celulosa y entre ellos uno de los más comunes son los hon-

gos del género *Trichoderma* (Nasir Iqbal et al., 2011; Rosyida et al., 2015) siendo la especie *Thicoderma reesei* la más comercializada por su mayor aplicación a nivel industrial en la sacarificación de celulosa a azúcares simples para la producción de biocombustibles (Adav et al., 2012; Peculyte et al., 2014).

Este estudio se desarrolla con la finalidad de iniciar la búsqueda de condiciones que permitan obtener bioetanol a partir de la biomasa del cacao, tomando en cuenta las complicaciones que puede tener trabajar con este sustrato para así poder brindar alternativas que hagan el proceso más accesible y se logre un mejor aprovechamiento de esos residuos agroindustriales.

## 2 Materiales y Métodos

### 2.1 Recolección y tratamiento de la muestra

#### 2.1.1 Recolección de la muestra

Las cáscaras de cacao (*Theobroma cacao*) del clon CCN-51 se recolectaron en una hacienda particular en el cantón Buena Fe de la Provincia de Los Ríos-Ecuador en el mes de abril de 2020.

#### 2.1.2 Tratamiento de la muestra

##### Secado y Molienda

Las cáscaras de cacao fueron cortadas en trozos de aproximadamente 1 cm<sup>3</sup> y secadas al ambiente durante 7 días, posteriormente se trituró con un molino de platos marca Corona de tolva baja de manera manual y se separaron las partículas mediante una zaranda con un tamiz de malla #18 marca USA Standard Test Sieve de 1 mm de porosidad. Las partículas inferiores a 1 mm fueron separadas y almacenadas en un desecador.

##### Eliminación de extractos volátiles

Este proceso se realizó bajo el método de referencia NREL/TP-510-42619 (Sluiter et al., 2005), en el que 10,000 g de la muestra obtenida después del proceso de triturado y tamizado fueron sometidos a una extracción mediante un equipo Soxhlet en dos etapas, primero con 200 mL de agua destilada du-

rante 2 horas y posteriormente con 200 mL de etanol durante 2 horas adicionales.

### 2.2 Caracterización de la Biomasa

La caracterización se realizó siguiendo los procedimientos de la AOAC International, ASTM international, NREL y TAPPI, respectivamente. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

#### 2.2.1 Determinación del porcentaje de humedad

La determinación del porcentaje de humedad se llevó a cabo de acuerdo con la norma AOAC 934.01 (AOAC, 2012). Se pesaron 1,000 g de muestra y se colocaron en un crisol, este se llevó a una estufa precalentada a una temperatura de 105 °C y se dejó durante 3 horas. Transcurrido el tiempo se sacó el crisol y se introdujo en un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente, posteriormente se pesó el crisol con el material resultante y se registró el valor obtenido. El crisol se colocó nuevamente en la estufa por 1 hora, y se repitió el proceso hasta obtener el peso constante.

#### 2.2.2 Determinación del contenido de cenizas

La determinación del contenido de cenizas se llevó a cabo de acuerdo con la norma AOAC 942.05 (Thiex et al., 2012) mediante incineración a 550 °C. El crisol con la muestra obtenida luego de la determinación de humedad se introdujo en la mufla precalentada y se dejó por 5 horas, posteriormente se retiró el crisol de la mufla y se llevó a un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente, se pesó y registró el valor obtenido; seguidamente se introdujo nuevamente el crisol con la muestra en la mufla por 1 hora adicional y se repitió el proceso hasta obtener peso constante.

#### 2.2.3 Determinación de holocelulosa

Una muestra de 4,000 g se colocó en un matraz Erlenmeyer y se trató con 300 mL de agua destilada, 0,4 mL de ácido acético glacial y 2,000 g de clorito de sodio; luego el matraz se llevó a 75 °C en un equipo de baño María marca Memmert durante 1 hora. Este proceso se realizó 3 veces hasta obtener la muestra de coloración blanquecina. Seguidamente se aplicó baño de hielo a 10 °C, y se filtró al vacío con previa centrifugación a 3500 rpm durante 15 minutos. El producto filtrado y lavado se colocó en un

crisol y se llevó a secado en una estufa durante 4 horas a una temperatura de 105 °C; El producto seco se traspasó a un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente, se pesó y registró el valor, repitiéndose el proceso de secado hasta obtener peso constante. El peso final de holocelulosa en la muestra se obtuvo por diferencia de pesos entre el crisol con muestra tratada y el crisol seco y vacío (Nomanbhay et al., 2013).

#### 2.2.4 Determinación del contenido de celulosa

El contenido de celulosa de la biomasa se determinó según la norma ASTM D16-96-95(2019)e1 (ASTM International, 2019), colocándose 2,0000 g de muestra obtenida en la determinación del contenido de holocelulosa en un matraz Erlenmeyer con 10 mL de hidróxido de sodio al 17,5% (con reposo de 5 min), luego se agregó 5 mL de hidróxido de sodio al 17,5% (con reposo de 30 min), se añadió 30 mL de agua destilada (con reposo de 1 hora), se filtró al vacío y se realizaron tres lavados con una disolución de agua e hidróxido de sodio y luego con 30 mL de agua. Posteriormente se agregaron 5 mL de ácido acético al 10%; y se adicionaron 50 mL de agua destilada para lavar el residuo, con filtración al vacío finalmente. Luego se llevó la muestra a una estufa durante 12 horas a 105 °C, se sacó de la estufa y se llevó a un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente, se pesó y registró el valor, se repitió hasta obtener peso constante. Se obtuvo el peso final de la muestra por diferencia del peso del crisol con muestra tratada y del peso de crisoles secos y vacíos.

#### 2.2.5 Determinación del contenido de hemicelulosa

Se calculó por diferencia entre el contenido de holocelulosa y el de celulosa, siguiendo lo reportado por Loja Sánchez (2016).

#### 2.2.6 Determinación de Lignina

El análisis se realizó según el método TAPPI T-222 om-02 (TAPPI, 2002), fundamentado en la determinación de la lignina insoluble en ácido de la madera y en todos los grados de pulpas sin blanquear. Aproximadamente 1 gramo de muestra seca tratada de cáscara de cacao se colocó en un matraz, se añadió 15 mL de ácido sulfúrico al 72% y se agitó durante 1 hora a 400 rpm en un agitador mecánico marca ColeParmer. Se transfirió la muestra a un

balón de 250 mL con 125 mL de agua destilada para reflujar durante 4 horas, se filtró al vacío, se lavó con 500 mL de agua caliente y se secó en la estufa a 105 °C por 3 horas. El producto seco se llevó a un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente, se pesó y registró el valor, repitiéndose el proceso de secado hasta obtener peso constante.

### 2.3 Producción de Bioetanol

#### 2.3.1 Pretratamiento alcalino

El análisis fue realizado según lo reportado por Jannah and Asip (2015). La muestra obtenida del proceso indicado en el apartado de *Secado y Molienda* fue tratada con hidróxido de sodio 3% hasta que se alcanzó un pH de 11. La biomasa lignocelulósica se mantuvo sumergida con la base en una relación sólido/líquido 1:10 (100 gramos de muestra/1000 mL de NaOH al 3%) en reposo a 121 °C por 90 minutos (provocando el hinchamiento de la biomasa y haciéndola más accesible para enzimas y bacterias). Luego del pretratamiento, se filtró la muestra y se neutralizó el pH con lavados continuos de agua destilada y la adición de solución de HCl al 30% hasta que el agua del filtrado presentó un pH de 5; por último, se sometió a un secado a 60 °C durante 24 horas.

#### 2.3.2 Hidrólisis enzimática con el uso de los hongos endófitos *Trichoderma reesei* y *Trichoderma ghanense*

El método consistió en la hidrólisis mediante enzimas (celulasas) para transformar la celulosa de la cáscara de cacao en azúcares de bajo peso molecular, tomando como base el método NREL TP-510.42629 (Selig et al., 2008). Como agentes productores de estas enzimas se usaron dos hongos endófitos obtenidos de la colección de cultivos microbianos del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL): *Trichoderma reesei* y *Trichoderma ghanense*.

Para su uso se llevaron previamente a cabo las siguientes etapas: Resiembra de los hongos *Trichoderma reesei* y *ghanense*: A partir de la cepa, se realizaron 3 réplicas en cajas de Petri con medio PDA, incubando a 26 °C durante 7 días hasta que se obtuvo una alta esporulación. Lavado de esporas: Se

colocaron 10 mL de suero fisiológico en un tubo y dentro del mismo se realizó la adición de 0,5 mm de los hongos *Trichoderma reesei* y *Trichoderma ghanense*, realizando la remoción mecánica de las esporas. Se ajustó la suspensión a una concentración de  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^9$  esporas/mL, mediante el recuento en la cámara de Neubauer. Preparación del sustrato y aplicación del inóculo fúngico: Se utilizaron 50 g de sustrato de cáscara de cacao para todas las muestras, luego se procedió a esterilizar las muestras por 15 minutos a 120 °C, y se aseguró el secado del producto a 60 °C por 24 horas. Para brindar las condiciones necesarias al sustrato, se ajustó la humedad del medio al 75 % añadiendo 35 mL de agua destilada esterilizada a cada matraz, finalmente se colocaron 10 mL de la disolución de los hongos *Trichoderma reesei* y *Trichoderma ghanense* en las concentraciones de  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^9$  esporas/mL, se dejó reposar las muestras a 25 °C por 10 días.

### 2.3.3 Fermentación alcohólica

Para el proceso de fermentación se utilizó levadura de tipo *Saccharomyces cerevisiae*, eficaz para la producción de alcohol debido a su gran capacidad fermentativa (Van Zyl et al., 2007). Primero se realizó el proceso de activación de la levadura; para esto se pesaron 0,5 g de azúcar y 15 g de levadura, se agregaron en 75 mL de agua destilada previamente esterilizada y enfriada hasta alcanzar una temperatura de 28 °C y se dejó reposar por 20 minutos. Una vez activada la levadura, se agregó agua destilada estéril hasta llegar a 250 mL, se procedió a incorporar en los biorreactores con cinco escenarios diferentes: escenario 1, el biorreactor contenía 50 g de muestra de cáscara de cacao obtenida del pretratamiento alcalino; escenarios 2 y 3, el biorreactor que contenía los 50 g de muestra de cáscara de cacao obtenida después del pretratamiento alcalino y posterior hidrólisis enzimática con *Trichoderma reesei* con una concentración de esporas de  $1 \times 10^7$  esporas/mL para el escenario 2 y  $1 \times 10^9$  esporas/mL para el escenario 3; escenarios 4 y 5, el biorreactor contenía 50 g de muestra de cáscara de cacao obtenida después del pretratamiento alcalino y posterior a la hidrólisis enzimática con *Trichoderma ghanense* con una concentración de esporas de  $1 \times 10^7$  esporas/mL para el escenario 4 y  $1 \times 10^9$  esporas/mL para el escenario 5. Seguidamente se selló el biorreactor para evitar la interacción con el ambiente (proceso anaeróbico); además se permitió el desfo-

gue de CO<sub>2</sub> mediante una manguera de purga que está acoplada al tapón, el terminal de esta manguera se sumerge en un vaso de agua destilada para recolectar dicho gas durante el proceso.

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

## 2.4 Cuantificación de Bioetanol

Para la cuantificación del etanol producido, se utilizó un cromatógrafo de gases marca Termo Scientific acoplado a un detector de ionización de llama. El análisis cuantitativo del etanol producido se expresó en mg % AA, para obtener el rendimiento en mL de etanol por cada gramo de muestra ocupada de cáscara de cacao. De forma preliminar, se elaboró una curva de calibración con etanol absoluto que sirvió para comparar la muestra obtenida y así determinar la concentración de etanol presente (Mansur et al., 2022). Las condiciones analíticas fueron optimizadas, como se recoge en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones cromatográficas

Equipo	Cromatógrafo de gases (GC) marca Termo Fisher, modelo TRACE GC 1300 series
Gas de arrastre	Helio
Flujo	2 mL/min
Volumen de inyección	1 $\mu$ L
Inyección en modo	Split
Temperatura del inyector	180 °C
Columna	J&W Scientific DB-FFAP 60 m $\times$ 0,250 mm (ID) $\times$ 0,25 $\mu$ m
Fase estacionaria	Ácido de polietilenglicol modificado
Temperatura del horno	180 °C
Detector	Ionización de llama (FID)
Temperatura del detector	250 °C

### 3 Resultados y Discusión

#### 3.1 Caracterización de la biomasa

El análisis de la cáscara de cacao (*Theobroma cacao*) clon CCN-51 se realizó para determinar los parámetros de mayor importancia en la obtención de etanol, siendo estos: humedad, ceniza, holocelulosa, celulosa, hemicelulosa y lignina; luego se establecieron las condiciones óptimas del pretratamiento, hidrólisis enzimática y proceso fermentativo, cuyos valores dan selección a los procesos efectivos para una correcta fermentación etanólica.

El porcentaje de humedad obtenido fue de 11,16% como se aprecia en la Tabla 2; este valor es superior al reportado por Vivanco Carpio et al. (2018), el cual presenta un valor promedio de 8,74% para cacao nacional y 6,43% para cacao CCN-51 obtenidos de la provincia de El Oro. Esta diferencia se puede atribuir a las condiciones climáticas propias del sector montañoso de cultivo en el cantón Buena Fe, provincia de Los Ríos, las cuales mantienen un suelo húmifero apto para el crecimiento de diversos cultivos, además del contacto con la humedad del ambiente durante el transporte de la cascarilla de cacao hasta el laboratorio.

El porcentaje promedio de cenizas en la biomasa lignocelulósica evaluada fue del 10,70%, cuyo valor es similar al reportado por Villamizar Jaimes et al. (2021) en cáscara de cacao colombiano de la misma variedad con un valor estimado de 10,77% y 11,39%, según tratamiento natural o en estufa. Por su parte, Vivanco Carpio et al. (2018) evidencian un valor promedio de 5,54% en cascarilla de cacao CCN-51 de origen ecuatoriano, mientras que registra 5,14% en cacao nacional. Castillo et al. (2018) reportan 8,59% en esta variedad de cacao de origen venezolano.

Los valores de cenizas reportados en diversos estudios pueden estar influenciados por factores climáticos y edafológicos. Así lo demuestra Chafra et al. (2016) en un trabajo realizado en diferentes provincias amazónicas sobre la cáscara de cacao CCN-51, en el cual se evidencia el impacto que poseen ciertas variables como la calidad del suelo, niveles de composición mineral y la saturación de humedad. De este modo, se puede considerar que la presente matriz en estudio estaría influenciada

por los minerales propios del suelo montañoso.

Los resultados de la Tabla 2 hacen referencia a los valores promedio encontrados para celulosa (26,08%) y hemicelulosa (5,38%), ambos con un coeficiente de variación menor al 2%. Torres (2016) presenta valores similares con promedio de 24,02% de celulosa en la misma matriz, mientras que para la hemicelulosa presentaron un promedio del 2,23% pero con una precisión del 31,44% observándose una aleatoriedad de resultados. En este caso, la divergencia del contenido de hemicelulosa obedece a la metodología aplicada con ajuste de pH mediante ácido sulfúrico, compuesto inorgánico que puede degradar a este polisacárido (Torres, 2016). Así mismo, Loayza (2020) confirma la obtención de 29,09% para celulosa y 2,97% para hemicelulosa, mediante un tratamiento ácido sobre la biomasa.

**Tabla 2.** Contenido de humedad, cenizas, holocelulosa, celulosa, hemicelulosa y lignina de la cáscara de cacao.

Parámetro	$\bar{X}$	$\sigma$	$C_v$
Humedad	11,16%	0,05	0,54%
Cenizas	10,70%	0,34	2,71%
Holocelulosa	31,80%	0,25	0,79%
Celulosa	26,24	0,25	0,09%
Hemicelulosa	5,38	0,09	1,66%
Lignina	28,52%	0,75	2,62%

La lignina total de una biomasa está conformada por la lignina insoluble en ácido y en menor proporción por la lignina soluble en ácido; siendo la primera la de mejor identificación por su principal abundancia en la biomasa lignocelulósica y aplicación de métodos gravimétricos. Si bien es cierto, la referencia bibliográfica refleja que la lignina es el compuesto mayoritario presente en la biomasa de cacao, tal como se corrobora en los análisis obtenidos por Encalada and Jácome (2018) con un valor promedio de 25,81%, y por Vásquez (2010) con un rango de concentración de 14,6% a 26,38%. Esta información se complementa con estudios que reportan otros investigadores con valores de lignina total superiores al 40%, como es el caso de Benalcázar (2018), obteniendo 46,61%, o por Torres (2016), que de acuerdo con una serie de análisis realizados reportó valores de 33,43 a 45,39%.

El presente estudio se enfoca en la determinación de la lignina ácida no soluble, teniendo en cuenta que es el polímero de mayor proporción dentro de la biomasa de interés y considerando que la

lignina soluble se pierde durante el proceso de extracción de compuestos volátiles. El valor promedio obtenido fue 28,52%, tal como se ve reflejado en la Tabla 2, con un coeficiente de variación correspondiente al 2,62%, el cual certifica la precisión de los resultados obtenidos.

### 3.2 Producción y cuantificación de bioetanol

Durante el pretratamiento de la biomasa con hidróxido de sodio al 3% se evidenciaron cambios físicos debido a la remoción de la lignina. Uno de los cambios observados fue el hinchamiento de la biomasa y un cambio de color del marrón típico de la cáscara de cacao seca a un color negro luego del pretratamiento alcalino, debido al rompimiento de los enlaces esterés del material vegetal para la eliminación de la lignina y su color rojizo. Posteriormente con ajuste del pH también se observaron cambios en el color de la biomasa, pasando de negro a café claro.

La hidrólisis enzimática fue realizada con dos hongos diferentes *Trichoderma reesei* y *Trichoderma ghanense*, y las concentraciones de las esporas utilizadas fue de  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^9$  esporas/mL para ambos hongos y después de 10 días a temperatura ambiente en contacto con la biomasa dentro del reactor se logró observar el desarrollo de una coloración verdosa sobre la superficie de la biomasa y de manera más abundante en las paredes del reactor, lo que indica el crecimiento del hongo antagonista. Además, se observó el hinchamiento de la biomasa propio de la conversión de celulosa y hemicelulosa en azúcares fermentables.

Posterior al proceso de hidrólisis enzimática se procedió a la fermentación alcohólica usando levadura de tipo *Saccharomyces cerevisiae* durante 4 días. Durante este periodo se observó un fuerte burbujeo en el desfogue del biorreactor, lo que indica la emisión de CO<sub>2</sub>, subproducto de la fermentación alcohólica; además, se observó un hinchamiento de la biomasa tratada y el crecimiento abundante de levadura en la superficie del biorreactor. Al destapar el biorreactor también se apreció un olor fuerte característico de los procesos de fermentación.

Previo al análisis de los productos fermentados, se realizó la curva de calibración con cinco puntos de concentración preparados a partir del estándar

de etanol, estos fueron 0,1; 0,3; 0,5; 0,7 y 0,9% (v/v) obteniéndose un coeficiente de correlación satisfactorio (R: 0,9931). Para la interpretación de los cromatogramas resultantes se utilizó la información obtenida a partir del pico de elución de etanol, con base en sus áreas y tiempos de retención.

Sobre el análisis de las muestras, los resultados logrados demuestran que el Escenario 1, sin la aplicación de una hidrólisis enzimática, generó el mayor contenido de etanol en el orden de 0,25% v/v a diferencia del Escenario 2 que obtuvo porcentajes menores al 0,1% v/v, y del Escenario 3 que generó valores inferiores al 0,15% v/v, y del Escenario 4 que mostró porcentajes menores al 0,22% y del Escenario 5 que presentó porcentajes menores al 0,15% como se muestra en la Tabla 3.

De acuerdo con los valores obtenidos en el Escenario 1, estos son comparables con el estudio realizado por Benalcázar (2018), donde se obtuvo una concentración de etanol de 0,57% v/v empleando un tratamiento de hidrólisis alcalina en condiciones similares al presente estudio, lo cual permite demostrar que el método es útil en la cáscara de cacao debido a su capacidad de romper los enlaces que unen a las cadenas de lignina y la hemicelulosa. Sin embargo, el rendimiento no es lo suficientemente alto en el tratamiento biológico.

La composición de la biomasa lignocelulósica es diferente para cada tipo de sustrato, de esta forma, la cantidad presente de celulosa y hemicelulosa permite determinar la conversión de azúcares a etanol, tal como lo demuestra Casabar et al. (2019), en su estudio sobre la producción de bioetanol a partir de la cáscara de piña, donde se destaca que a medida que disminuye el azúcar reductor, aumenta la producción de bioetanol. Esto se debe principalmente a los azúcares fermentables obtenidos luego del desdoblamiento de celulosa y hemicelulosa, ya que estos monosacáridos son utilizados en el proceso fermentativo por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para su conversión en etanol.

La matriz de cáscara de cacao empleada en este trabajo reporta un 26,24% de celulosa y solo un 5,38% de hemicelulosa, pudiendo limitar este último la transformación a azúcares reductores. En este caso, la disposición de hemicelulosa para el proceso fermentativo puede verse afectada por el pretra-

tamiento de hidrólisis aplicado, ya que este separa las uniones estructurales entre la lignina y los carbohidratos, generando la degradación de la hemicelulosa y la solubilización de la lignina, disminu-

yendo gradualmente el contenido del polímero para su conversión a azúcares, tal como lo corrobora Sánchez Riaño et al. (2010) en los diferentes tipos de pretratamientos químicos aplicados a la biomasa.

**Tabla 3.** Resultados de la producción de bioetanol

Escenario	Muestra	Tiempo de retención	% v/v de etanol
Escenario 1: pretratamiento alcalino	Blanco 1	4,187	0,267
	Blanco 2	4,183	0,133
	Blanco 3	4,190	0,362
			$\bar{X} = 0,254$
Escenario 2: pretratamiento alcalino + <i>T. reesei</i> $1 \times 10^7$ esporas/mL	E2M1	4,185	0,083
	E2M2	4,183	0,145
	E2M3	4,183	0,026
			$\bar{X} = 0,084$
Escenario 3: pretratamiento alcalino + <i>T. reesei</i> $1 \times 10^9$ esporas/mL	E3M1	4,185	0,029
	E3M2	4,183	0,045
	E3M3	4,183	0,000
			$\bar{X} = 0,024$
Escenario 4: pretratamiento alcalino + <i>T.</i> <i>ghanense</i> $1 \times 10^7$ esporas/mL	E4M1	4,183	0,1256
	E4M2	4,185	0,2251
	E4M3	4,183	0,0559
			$\bar{X} = 0,1355$
Escenario 5: pretratamiento alcalino + <i>T.</i> <i>ghanense</i> $1 \times 10^9$ esporas/mL	E5M1	4,185	0,1444
	E5M2	4,185	0,1057
	E5M3	4,187	0,0686
			$\bar{X} = 0,1062$

En función de los antecedentes, se destaca al Escenario 1 como el de mejor rendimiento para la producción de bioetanol de acuerdo con las variables ensayadas, el cual estuvo limitado por dos factores, el tipo de pretratamiento utilizado, tal como se ha descrito previamente, y el contenido de lignina presente en el sustrato, ya que este polímero limita el desdoblamiento de la celulosa y la hemicelulosa durante los procesos de hidrólisis aplicados (Ko et al., 2015). De acuerdo a la literatura revisada, la aplicación de una hidrólisis enzimática con el hongo *Trichoderma spp.* podría generar una mayor cantidad de azúcares reductores a partir de sus enzimas celulasas. En ese sentido, López et al. (2014), demostraron que la cáscara de banano generó hasta

un 5,18% v/v de etanol con la intervención de la especie mencionada, considerándose que posee un 23% tanto para celulosa como para hemicelulosa, respectivamente.

Sin embargo, los escenarios del presente estudio tratados con *Trichoderma reesei* generaron un bajo rendimiento etanólico de 0,084% v/v y 0,024% v/v y con *Trichoderma ghanense* 0,1355% v/v y 0,1062% v/v, evidenciando que la composición de la biomasa marca una diferencia sobre la acción del hongo, atribuyéndose el efecto en función del contenido limitado de hemicelulosa. Así mismo los resultados de los Escenarios del 2 al 5 permiten inferir que el bajo rendimiento se debe también a la incidencia

de otros dos factores, el tiempo de duración de la hidrólisis y la concentración del microorganismo empleado. Estas dos variables interactúan de manera simultánea, ya que en un tiempo determinado el hongo ya no tendrá más celulosa por degradar y empezará a consumir la glucosa generada para su supervivencia.

De igual forma, los factores que tuvieron incidencia en la producción de etanol fueron la composición de la biomasa, el tipo de pretratamiento y la concentración del microorganismo empleado. En este contexto, se demuestra una hipótesis negativa en relación con la incidencia del hongo sobre el residuo lignocelulósico de cacao, debido al bajo rendimiento que posee la aplicación de un hongo fitopatógeno en el proceso de obtención de etanol.

Por otra parte, al comparar los porcentajes de alcohol producido en los escenarios que involucran los hongos *Trichoderma reesei* y *Trichoderma ghanense*, este último presentó mayor porcentaje de rendimiento.

## 4 Conclusiones

Este estudio ha permitido disponer de una matriz caracterizada por su composición lignocelulósica con un alto contenido de lignina y un bajo contenido de hemicelulosa, evidenciando correspondencia con los datos reportados por otros autores en una misma variedad de cáscara de cacao. A efectos de su aprovechamiento como biomasa, la cáscara de cacao resulta un sustrato de interés en los procesos de conversión para la obtención de etanol.

Las diferentes variables ensayadas durante el proceso fermentativo de este estudio comparativo han permitido establecer que las condiciones óptimas para la mayor obtención de bioetanol se dieron a partir de un pretratamiento alcalino, a temperatura ambiente sobre la base de 50 g de biomasa, durante un periodo de 3 días, reconociendo al Escenario 1 como el de mejor rendimiento etanólico con un porcentaje del 0,25 %v/v. La cáscara de cacao requeriría de un mayor contenido de hemicelulosa, que en conjunto con la celulosa genere una adecuada concentración de azúcares reductores, permitiendo que la aplicación de una hidrólisis enzimática con los hongos *Trichoderma reesei* y *Trichoderma ghanense*

augmente significativamente el rendimiento etanólico.

## Contribución de los autores

V.P.J.E.: Conceptualización, metodología, recursos, supervisión, revisión y edición de escritura. T.Z.Z.: Conceptualización, metodología, administración de proyecto, visualización y escritura de borrador original. L.L.G.R.: Metodología y recursos. M.M.M.: Metodología, supervisión validación, revisión y edición de escritura. J.V.V.: Investigación y recursos. V.A.C.M.: Investigación, análisis formal y validación. F.C.C.C.: Investigación, análisis formal y validación. D.B.C.: Investigación, análisis formal y validación. L.V.M.: Investigación, análisis formal y validación. R.F.E.L.: Investigación y recursos.

## Referencias

- Adav, S. S., Tze Chao, L., and Kwan Sze, S. (2012). Quantitative secretomic analysis of *Trichoderma reesei* strains reveals enzymatic composition for lignocellulosic biomass degradation. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11(7):1–15. Online: <https://n9.cl/rd8o96>.
- Antizar-Ladislao, B. and Turrion-Gomez, J. L. (2008). Second-generation biofuels and local bioenergy systems. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2(5):455–469. Online: <https://n9.cl/1zd89>.
- Anwar, Z., Gulfranz, M., and Irshad, M. (2014). Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7(2):163–173. Online: <https://n9.cl/mlpp59>.
- AOAC (2012). *AOAC International, Official Method 934.01*. Online: <https://n9.cl/kcu58>.
- ASTM International (2019). *Astm d1696-95(2019)e1: Standard Test Method for solubility of cellulose in sodium hydroxide*. Technical report, American Society for Testing and Materials. Online: <https://n9.cl/g375h>.
- Benalcázar, J. (2018). Evaluación de diferentes pretratamientos químicos a la biomasa de la cáscara de cacao para procesos de fermentación alcohólica. Tesis de grado, Universidad San Francisco de Quito. Online: <https://n9.cl/rrebswk>.
- Casabar, J., Unpaprom, Y., and Ramaraj, R. (2019). Fermentation of pineapple fruit peel wastes for bioethanol production. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 9:761–765. Online: <https://n9.cl/2ir9w>.

- Castillo, E., Alvarez, C., and Contreras, Y. (2018). Caracterización fisicoquímica de la cáscara del fruto de un clon de cacao (*Theobroma cacao* L.) cosechados en Cauca, estado Miranda, Venezuela. *Revista de Investigación*, 48(95):154–167. Online: <https://n9.cl/uap1c>.
- Caviedes Rubio, D. I., Parra García, F. E., and Andrade Vargas, C. K. (2024). Ecological, economic and social impacts of the Colombian cocoa sector. *La Granja*, 40(2):50–64. Online: <https://n9.cl/tvh35>.
- Chafla, A., Rodriguez, Z., Boucourt, R., and Torres, V. (2016). Bromatological characterization of cocoa shell (*Theobroma cacao*), from seven cantons of the Amazonia, Ecuador. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 50(2):245–252. Online: <https://n9.cl/goi4m>.
- Cury R, K., Aguas M, Y., Martinez M, A., Olivero V, R., and Chams Ch, L. (2017). Residuos agroindustriales su impacto, manejo y aprovechamiento. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 9(Suppl. 1):122–132. Online: <https://n9.cl/ydvj>.
- Encalada, J. and Jácome, P. (2018). Determinación de parámetros cinéticos en la devolatilización de biomasa residual de cacao ecuatoriano. Tesis de grado, Universidad Central del Ecuador. Online: <https://n9.cl/3lhtyn>.
- Jannah, A. M. and 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. Online: <https://n9.cl/hilrln>.
- Khan, S., Ali, M., Mustafa, A., and Iqbal, A. (2025). Urban photobioreactor for CO<sub>2</sub> sequestration and microalgal biomass production. *La Granja*, 41(1):100–117. Online: <https://n9.cl/t47z8>.
- Ko, J. K., Um, Y., Park, Y. C., Seo, J. H., and Kim, K. H. (2015). Compounds inhibiting the bioconversion of hydrothermally pretreated lignocellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99:4201–4212. Online: <https://n9.cl/s5rsd>.
- Loayza, K. (2020). Determinación de las condiciones óptimas de fermentación para la obtención de bioetanol a partir del hidrolizado ácido de la corteza de cacao (*Theobroma cacao*) proveniente de la industria cacaotera del Ecuador. Tesis de grado, Universidad Politécnica Salesiana. Online: <https://n9.cl/rk6wl>.
- Loja Sánchez, C. P. (2016). Optimización de los residuos de cascarilla de arroz mediante pretratamiento por hidrólisis ácida para la obtención de azúcares reductores. Tesis de grado, Universidad de Cuenca. Online: <https://n9.cl/0njsl>.
- López, J., Cuarán, J., Arenas, L., and Flórez, L. (2014). Usos potenciales de la cáscara de banano: elaboración de un bioplástico. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, 1(1):7–21. Online: <https://n9.cl/nvya3>.
- Mansur, A. R., Oh, J., Lee, H. S., and Oh, S. Y. (2022). Determination of ethanol in foods and beverages by magnetic stirring-assisted aqueous extraction coupled with GC-FID: A validated method for halal verification. *Food Chemistry*, 366:130526. Online: <https://n9.cl/lisy6u>.
- Morais, W., Pacheco, T., Correa, P., Martins, A., Mata, T., and Caetano, N. (2020). Acid pretreatment of sugarcane biomass to obtain hemicellulosic hydrolysate rich in fermentable sugar. *Energy Reports*, 6(Suppl. 8):18–23. Online: <https://n9.cl/v5ves>.
- Nasir Iqbal, H., Ahmed, I., Zia, M., and Irfan, M. (2011). Purification and characterization of the kinetic parameters of cellulase produced from wheat straw by *Trichoderma viride* under ssf and its detergent compatibility. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2(3):149–156. Online: <https://n9.cl/d31ao>.
- Nomanbhay, S., Hussain, R., and Palanisamy, K. (2013). Microwave-assisted alkaline pretreatment and microwave assisted enzymatic saccharification of oil palm empty fruit bunch fiber for enhanced fermentable sugar yield. *Journal of Sustainable Bioenergy Systems*, 3(1):7–17. Online: <https://n9.cl/699ly>.
- Oliva, J. M., Negro, M. J., Manzanares, P., Ballesteros, I., Chamorro, M. ., Sáez, F., Ballesteros, M., and Moreno, A. D. (2017). A sequential steam explosion and reactive extrusion pretreatment for lignocellulosic biomass conversion within a fermentation-based biorefinery perspective. *Fermentation*, 3(2):1–15. Online: <https://n9.cl/ddzoa>.
- Orejuela-Escobar, L. M., Landázuri, A. C., and Goodell, B. (2021). Second generation biorefining in Ecuador: Circular bioeconomy, zero waste technology, environment and sustainable development: The nexus. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, 6(2):83–107. Online: <https://n9.cl/5qisge>.
- Peculyte, A., Anasontzis, G., Karlström, K., Larsson, P. T., and Olsson, L. (2014). Morphology and enzyme production of *Trichoderma reesei* Rut C-30 are affected by the physical and structural characteristics of cellulosic substrates. *Fungal Genetics and Biology*, 72:64–72. Online: <https://n9.cl/1e0l6>.
- Rosyida, V., Indrianingsih, A., Maryana, R., and Wahono, S. (2015). Effect of temperature and fermentation time of crude cellulase production by *Trichoderma Reesei*

- on straw substrate. *Energy Procedia*, 65:368–371. Online: <https://n9.cl/33llu>.
- Sarmiento Hernández, J. S. (2019). Evaluación del uso de la cáscara de cacao como sustituto parcial de la matriz polimérica en la obtención de espumas de poliuretano. Tesis de grado, Fundación Universidad de América. Online: <https://n9.cl/g86wuw>.
- Selig, M., Weiss, N., and Ji, Y. (2008). Enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass, NREL/TP-510-42629. Technical report, National Renewable Energy Laboratory (NREL). Online: <https://n9.cl/mfyv6>.
- Sigüencia Avila, J. M., Delgado Noboa, J. W., Posso, F., and Sanchez Quezada, J. P. (2020). Estimación del potencial de producción de bioetanol a partir de los residuos de la corteza del cacao en Ecuador. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 21(3):1–20. Online: <https://n9.cl/8urepk>.
- Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., and Templeton, D. (2005). Determination of extractives in biomass, NREL TP-510-42619. Technical report, National Renewable Energy Laboratory (NREL). Online: <https://n9.cl/sh4rv>.
- Sánchez Riaño, A. M., Gutiérrez Morales, A. I., Muñoz Hernández, J. A., and Rivera Barrero, C. A. (2010). Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. *Revista Tumbaga*, 1(5):61–91. Online: <https://n9.cl/g736is>.
- TAPPI (2002). Acid-insoluble lignin in wood and pulp. T 222 om-02. Technical report, Technical Association of the Pulp and Paper Industry.
- Teneda Llerena, W. F., Guamán Guevara, M. D., and Oyaque Mora, S. M. (2019). Exploración de la intención de consumo de la cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* l.) como infusión: caso Tungurahua-Ecuador. *Cuadernos de Contabilidad*, 20(50):1–14. Online: <https://n9.cl/5gsqg>.
- Thiex, N., Novotny, L., and Crawford, A. (2012). Determination of ash in animal feed: AOAC Official Method 942.05 Revisited. *Journal of AOAC international*, 95(5):1392–1397. Online: <https://n9.cl/6v757>.
- Torres, Y. (2016). Caracterización de biomasa lignocelulósica (*Theobroma cacao* l.) para uso en la obtención de etanol por vía fermentativa. Tesis de grado, Universidad Santo Tomás.
- Van Zyl, W., Lynd, L., Den Haan, R., and McBride, J. (2007). *Consolidated Bioprocessing for Bioethanol Production Using Saccharomyces cerevisiae*, volume 108. Springer. 205–235. Online: <https://n9.cl/u3jibg>.
- Villamizar Jaimes, Y. L., Rodríguez Guerrero, J. S., and León Castrillo, L. C. (2021). Caracterización fisicoquímica, microbiológica y funcional de harina de cáscara de cacao (*Theobroma cacao* l.) variedad ccn-51. *Cuaderno Activa*, 9(9):65–75. Online: <https://n9.cl/uznkwo>.
- Vivanco Carpio, E., Matute Castro, L., and Campo Fernández, M. (2018). Caracterización físico-química de la cascarilla de *Theobroma cacao* L., variedades nacional y CCN-51. In *Conference Proceedings UTMACH*, volume 2, pages 213–222. Online: <https://n9.cl/fizwm9e>.
- Vásquez, J. (2010). Caracterización microbiológica y producción de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* en cultivo artesanal. Tesis de grado, Pontificia Universidad Javeriana. Online: <https://n9.cl/z9w6j>.
- Wahono, S., Darsih, C., Rosyida, V., Maryana, R., and Pratiwi, D. (2014). Optimization of cellulose enzyme in the simultaneous saccharification and fermentation of sugarcane bagasse on the second-generation bioethanol production technology. *Energy Procedia*, 47:268–272. Online: <https://n9.cl/h7x0m>.
- Winarsih, S. and Siskawardani, D. D. (2020). Hydrolysis of corncobs using a mixture of crude enzymes from *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* for bioethanol production. *Energy Reports*, 6(Suppl. 8):256–262. Online: <https://n9.cl/09eb4>.