



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
INGENIERÍA AMBIENTAL - RESIDUOS SÓLIDOS

**DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE METANO A
PARTIR DE LOS RESIDUOS DEL PROCESAMIENTO DEL
CACAO**

TESIS
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN INGENIERÍA**

PRESENTA
Ing. Fabiany de Jesús Morgado León

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Simón González Martínez - Instituto de Ingeniería, UNAM

COMITÉ TUTOR
Dr. Alfonso Durán Moreno - Facultad de Química, UNAM
Dr. Julián Carrillo Reyes - Instituto de Ingeniería - Juriquilla, UNAM
Dra. Lisbet Mailin López González - CEEPI-UNISS, Cuba

Ciudad de México, agosto de 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO DESIGNADO

Presidente: Dr. Julián Carrillo Reyes

Secretario: Dr. Alfonso Durán Moreno

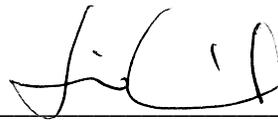
Primer vocal: Dra. Lisbet Mailin López González

Segundo vocal: Dr. Oscar González Barceló

Tercer vocal: Dr. Simón González Martínez

El trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental (LIA), en el Edificio 5 del Instituto de Ingeniería de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Tutor de tesis: Dr. Simón González Martínez



Firma

DEDICATORIA

A mi madre y mi abuela, las dos mujeres más importantes de mi vida, los pilares que sostienen
mi inspiración y mis ganas de salir adelante.

A toda mi familia, por el cariño, los consejos oportunos, la motivación, el apoyo
incondicional.

A mis amigos, “los de aquí y los de allá”, gracias por la paciencia, los momentos inolvidables,
las risas y los llantos.

A todos mis profesores, por la formación humana y académica que me han regalado a lo largo
de mi existencia.

A todos ellos y también a los que permanecen en anonimato, GRACIAS, este logro es más
suyo que mío, sin ustedes nunca hubiera llegado tan lejos.

AGRADECIMIENTOS

Al personal de la **Universidad Nacional Autónoma de México**, su **Instituto de Ingeniería** y su **Laboratorio de Ingeniería Ambiental**, que me dio la oportunidad de lograr una aspiración personal y de muchos. Sus consejos, palabras de aliento y facilidades otorgadas en meses tan difíciles como lo fue mi año de ingreso (2021).

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** de México, por el apoyo otorgado durante estos dos años, sin el cual mi estancia como extranjera en este país no habría sido posible.

Al **Programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica** de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM, proyecto IT101320, por el apoyo recibido para realizar mi trabajo de tesis.

Al **Dr. Simón González Martínez** por acogerme en su grupo de trabajo, las asesorías brindadas, la exigencia acertada, los conocimientos regalados en cada conversación. Hace falta un minuto de plática para conocer su excelencia como ser humano e investigador, y más de una vida para intentar replicarle. Este ser educa con tan solo su presencia. Espero haber estado a la altura.

Al **Dr. Oscar González Barceló** por estar presente a cada paso, en cada duda, por sus visitas oportunas al laboratorio durante la investigación, siempre dispuesto al apoyo con el trabajo. Educador de excelencia.

A los **doctores Alfonso Durán** y **Julián Carrillo** por sus observaciones, aportes vitales para el trabajo de investigación y comentarios que sin duda enriquecieron este documento. Un especial agradecimiento a la **Dra. Lisbet López**, que además de majestuosa y paciente guía académica, es la “madre laboral” que a todos les gustaría tener; su amor por la ingeniería y sus alumnos hace que nunca quieras alejarte.

Al **M.C. Francisco Rojo Callejas** de la Facultad de Química de la UNAM por permitirme trabajar en su laboratorio, facilitarme sus equipos y levantarme después de cada tropiezo técnico. Por todas las pláticas interesantes, su conocimiento, su sonrisa tranquilizante y calidad humana.

No por últimos son menos importantes, al Maestro Hamilton Mosquera, por compartir sus experiencias y conocimientos. Especial agradecimiento al Dr. Germán D. Jojoa, quien me ha acompañado todo este tiempo, este bien pudiera ser otros de sus logros, su segunda tesis de maestría.

RESUMEN

Una práctica común para el manejo y eliminación de desechos agrícolas en los países cálidos en desarrollo es la incineración al aire libre o simplemente la acumulación en el campo. Los desechos de la producción de cacao (cáscara, cascarilla y mucílago) han sido identificados por otros autores como sustratos con gran potencial de producción de biogás, calculado de manera teórica, en 922 L/kg_{SV} con un contenido de metano del 51 % (470 L_{CH₄}/kg_{SV}). La estrategia general en la mayoría de los estudios es la codigestión con alimentos o residuos orgánicos obteniendo menos de 200 L_{CH₄}/kg_{SV}. Considerando el manejo sustentable de los residuos de cacao, esta investigación propone analizar la cáscara de cacao proveniente de las regiones tropicales de México (Chiapas) y determinar la producción de metano en un proceso de digestión anaerobia en dos etapas: fermentación y metanización. El enfoque principal de esta investigación está en la fermentación porque, como se sugiere, la producción de metano puede mejorar cuando se hidroliza eficientemente la cáscara de cacao. Para dar cumplimiento a los objetivos, se operó un reactor en régimen semicontinuo a 35 °C y sin control de pH, para la fermentación de la cáscara de cacao durante 150 días variando la carga orgánica en el reactor. En una etapa subsecuente, para metanizar los productos de las fermentaciones, se operaron reactores discontinuos de 500 ml en un equipo AMPTS II para determinar la producción acumulada de metano. La caracterización de la cáscara mostró un sustrato ácido con pH de 5.3, con altos contenidos de humedad y compuestos lignocelulósicos. A pesar de que estos últimos son de difícil degradación, la cáscara cruda presentó una producción específica de metano de 100 NL/kg_{SV}. Durante la fermentación se produjeron ácidos láctico, acético, propiónico, butírico, valérico y trazas de heptanoico y hexanoico; además de etanol durante los primeros días. Se observaron desplazamientos metabólicos después de más de dos tiempos de retención de sólidos. La producción de metano aumentó con la disminución de la concentración de sustrato y se logró incrementar la producción específica de metano hasta un 110 % sobre la cáscara cruda. El modelo cinético de Michaelis y Menten describió con precisión la producción de metano, indicando la mayor afinidad enzima-sustrato para los fermentos bajo CO de 2.6 g_{DQO}/L·d. La fermentación controlada de la cáscara del cacao previa a la metanización posibilitó el aumento en la producción específica de metano.

ABSTRACT

A common practice for the management and disposal of agricultural wastes in hot developing countries is open burning or simply accumulation in the field. Residues from cocoa production (husk, shell, and mucilage) have been identified by other authors as substrates with great biogas production potential, theoretically calculated at 922 L/kg_{VS} with a methane content of 51 % (470 L_{CH₄}/kg_{VS}). The general strategy in most studies is codigestion with food or organic residues obtaining less than 200 L_{CH₄}/kg_{VS}. Considering the sustainable management of cocoa residues, this research proposes to analyze the cocoa husk from the tropical regions of Mexico (Chiapas) and determine the methane production in a two-stage anaerobic digestion process: fermentation and methanization. The focus of this research is on fermentation because, as suggested, methane production can be enhanced when the cocoa husk is efficiently hydrolyzed. To comply with the objectives, a semi-continuous reactor was operated at 35 °C and without pH control, for the fermentation of the cocoa husk for 150 days, varying the organic load in the reactor. In a subsequent stage, to methanize the fermentation products, 500 ml batch reactors were operated in AMPTS II equipment to determine the accumulated methane production. The characterization of the husk showed an acid substrate with a pH of 5.3, with high moisture content and lignocellulosic compounds. Although lignocellulosic compounds are difficult to degrade, the raw husk presented a specific methane production of 100 NL/kg_{VS}. During the fermentation lactic, acetic, propionic, butyric, valeric acids, and traces of heptanoic and hexanoic were produced; in addition, ethanol during the first days. Metabolic changes were observed after more than two solids retention times. Methane production increased with decreasing substrate concentration, and it was possible to increase specific methane production up to 110 % compared to raw husk. The Michaelis and Menten kinetic model accurately described methane production, indicating the highest enzyme-substrate affinity for ferments under CO of 2.6 g_{COD}/L·d. The controlled fermentation of the cocoa husk before methanation allowed to increase the specific methane production.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
Hipótesis	4
Objetivo general	4
Objetivos específicos	4
Alcances.....	4
CAPÍTULO 2. EL CACAO Y SUS RESIDUOS	5
2.1 Descripción general del fruto del cacao.....	5
2.1.1 Variedades de cacao	6
2.2 Producción de cacao	7
2.3 Generación y manejo de residuos por etapas.....	8
2.4 Características de los residuos de postcosecha	9
2.4.1 Mazorca o cáscara de cacao.....	10
2.4.2 Mucílago del cacao.....	15
2.4.3 Cascarilla del cacao	18
CAPÍTULO 3. DIGESTIÓN ANAEROBIA.....	20
3.1 Generalidades de la digestión anaerobia.....	20
3.1.1 Bioquímica de la digestión anaerobia.....	21
3.1.2 Microbiología de la digestión anaerobia	23
3.1.3 Termodinámica de la digestión anaerobia	26
3.2 Procesos anaerobios por etapas.....	28
3.3 Fermentación como primera etapa de digestión	29
3.3.1 Fermentación alcohólica.....	30
3.3.2 Fermentación ácida.....	31
3.3.3 Fermentación láctica.....	32
3.4 Metanización como segunda etapa de digestión.....	33
3.5 Digestión anaerobia de los residuos del cacao.....	35
3.5.1 Potenciales de metano de las mazorcas	37
3.5.2 Dificultades en la DA de las mazorcas de cacao	37
CAPÍTULO 4. METODOLOGÍA	39

4.1	Obtención, preparación y caracterización de los residuos del procesamiento agrícola del cacao	41
4.2	Fermentación de la cáscara de cacao bajo condiciones controladas	42
4.3	Producción de metano	43
4.4	Métodos analíticos	46
4.5	Modelación cinética	47
CAPÍTULO 5. RESULTADOS		49
5.1	Etapa I. Obtención, preparación y caracterización de los residuos del procesamiento agrícola del cacao	49
5.2	Etapa II. Fermentación de la cáscara de cacao bajo condiciones controladas	52
5.2.1	Fermentación con carga orgánica de 1.3 g _{DQO} /L·d	55
5.2.2	Fermentación con carga orgánica de 2.6 g _{DQO} /L·d	57
5.2.3	Fermentación con cargas orgánicas de 3.7 y 4.9 g _{DQO} /L·d	58
5.3	Etapa III. Producción de metano	62
5.3.1	Producción de metano de las cáscaras de las mazorcas de cacao	63
5.3.2	Producción de metano de las cáscaras fermentadas bajo diferentes cargas orgánicas	65
5.3.3	Producción específica de metano	71
5.3.4	Análisis cinético de la producción de metano	73
5.3.5	Metabolitos remanentes después de la metanización	75
5.3.6	Valores de pH inicial y final en la metanización	76
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES		78
CAPÍTULO 7. REFERENCIAS		80
ANEXOS		95

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1: Análisis de las características de la harina de cáscara de cacao (Güemes-Vera et al., 2020).....	11
Tabla 2.2: Composición química de la harina de la mazorca del cacao (Vriesmann <i>et al.</i> , 2011).	12
Tabla 2.3: Composición mineral de la harina de la mazorca del cacao (Vriesmann <i>et al.</i> , 2011).	13
Tabla 2.4: Composición de monosacáridos en la mazorca del cacao (Vriesmann <i>et al.</i> , 2011).	13
Tabla 2.5: Resumen de características fisicoquímicas y bromatológicas para la harina de la mazorca del cacao.....	14
Tabla 2.6: Características fisicoquímicas del mucílago del cacao (Anvoh <i>et al.</i> , 2009).....	16
Tabla 2.7: Composición fisicoquímica del mucílago del cacao (cacao <i>Arriba</i>) (Luna, 2018)..	17
Tabla 2.8: Características de la cascarilla de dos variedades de cacao (Vivanco <i>et al.</i> , 2018).	19
Tabla 2.9: Análisis proximal de la cascarilla de cacao según reportes de varios autores (base seca).	19
Tabla 3.1: Componentes del biogás en función del sustrato utilizado (Lorenzo & Obaya, 2005).	21
Tabla 3.2: Ejemplos de bacterias y arqueas en la digestión anaerobia (Lorenzo & Obaya, 2005).	24
Tabla 3.3: Energías libres de Gibbs para reacciones de la DA (Azbar <i>et al.</i> , 2001).....	27
Tabla 3.4: Energía libre de Gibbs para las reacciones metanogénicas más comunes (Hedderich & Whitman, 2013).....	34
Tabla 4.1: Técnicas analíticas para la caracterización de la cáscara de cacao, identificación de productos de la fermentación y método para cuantificación de producción de metano.....	46
Tabla 5.1: Caracterización fisicoquímica y bromatológica de la cáscara de cacao molida.....	51
Tabla 5.2: Volumen final de metano alcanzado por la cáscara cruda y fermentada bajo diferentes cargas orgánicas. (*) se tomaron 3 de 4 concentraciones para el cálculo de prod. esp. CH ₄	62
Tabla 5.3: Concentraciones de etanol, ácido láctico y ácidos grasos volátiles al terminar el periodo correspondiente a la CO en la fermentación. Entre paréntesis se indica el % que representan respecto al total de metabolitos producidos.	66
Tabla 5.4: Resultados de la linealización para producción específica de metano de la cáscara cruda y las cáscaras fermentadas. El % de aumento es con respecto a la cáscara cruda.....	71
Tabla 5.5: Parámetros cinéticos de las curvas de producción de metano de acuerdo con la linealización de Lineweaver y Burk.	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1: Planta de cacao. a) Flores b) Fruto (mazorca) c) Árbol de cacao	5
Figura 2.2: Elementos que componen el fruto de la planta de cacao.	6
Figura 2.3: Variedades de cacao.....	7
Figura 2.4: Diagrama general del procesamiento agrícola del cacao y residuos generados.	9
Figura 3.1: Esquema de reacciones de la DA (Gujer & Zehnder, 1983, modificado).	22
Figura 3.2: Fermentación alcohólica y desviación de fermentación alcohólica a glicero-pirúvica (Ciani <i>et al.</i> , 2013).....	30
Figura 3.3: Metanogénesis a partir de H ₂ /CO ₂ (A), metanol (B), acetato (C) (Hedderich & Whitman, 2013).....	34
Figura 4.1: Diagrama de metodología general.	40
Figura 4.2: Equipos para la trituration de la cáscara de cacao. a) extrusora Advance RH, b) molino Nixtamatic).....	41
Figura 4.3: Dos vistas del reactor con chaqueta de temperatura para fermentación de las cáscaras de cacao trituradas.	43
Figura 4.4: Frascos, agitadores y sistema de calentamiento para la metanización de la cáscara de cacao fermentada y sin fermentar.	44
Figura 4.5: Sistema automático de prueba de potencial de metano (AMPTS II).....	45
Figura 5.1: Componentes del fruto del cacao: a) mazorca entera, b) mazorca abierta, c) cáscara, d) granos y mucílago, y e) placenta.....	49
Figura 5.2: Preparación de la muestra: a) cáscaras cortadas en pedazos, b) y c) muestra extrudida, d) y e) muestra molida, y f) muestra homogenizada.	50
Figura 5.3: Fermentación de la cáscara de cacao: a) reactor operando en semicontinuo (3.8 L), b) método de extracción de muestra, y c) vista comparativa de la muestra extraída y la alimentación diaria	53
Figura 5.4: Comportamiento del fermentador bajo diferentes cargas orgánicas. a) sólidos totales y volátiles en influente y efluente. % hidrólisis b) DQO en influente y efluente c) metabolitos producidos y detectados en el efluente, expresados como DQO.....	54
Figura 5.5: Curvas de producción de metano para la cáscara de cacao cruda y fermentada bajo diferentes cargas orgánicas.....	63
Figura 5.6: Producción específica de metano para la cáscara cruda y los digestatos de fermentación a partir de diferentes masas de sustrato.	72
Figura 5.7: Comparación entre los valores experimentales y el modelo de Michaelis y Menten para la producción de metano a partir de la cáscara cruda y los digestatos fermentados.....	75
Figura 5.8: Valores de pH en cada reactor al final de la metanización.	76

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Los residuos se definen como los materiales o productos que se desechan ya sea en estado sólido, semisólido, líquido o gaseoso, contenidos en recipientes o depósitos, y que pueden ser susceptibles de ser valorados o requieren estar sujetos a tratamiento o disposición final con base en lo dispuesto en la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR) (DOF, 2003).

Los residuos agrícolas son generados en el entorno natural y lo integran un grupo heterogéneo de productos que es preciso separar para obtener el fruto, o el propio producto agrícola. Los residuos derivados de los procesos de producción de cultivos, que incluyen tanto residuos primarios (en forma de tallos, hojas, raíces, cáscaras, mazorcas, nueces) como residuos secundarios (derivados de actividades de procesamiento: paja, aserrín y desechos maderables), generalmente no son utilizados como alimento para humanos o como materia prima para la industria (Meza-Sepúlveda *et al.*, 2021).

La problemática inicia con el desarrollo de la sociedad moderna, por las cantidades de residuos generadas y su difícil asimilación natural debido a la calidad de estos, lo que dificulta su gestión (PRB, 2013; Crossette, 2011; Bogner, *et al.*, 2008). Factores como la sobrepoblación, actividades antrópicas y consumismo, ayudan a almacenarlos en grandes cantidades (Chávez & Rodríguez, 2016).

Entre las prácticas para reducir o eliminar los residuos agrícolas se ejerce la quema en el propio lugar de generación, acción particularmente común en los países en desarrollo. Esta quema de desechos da como resultado la pérdida de humedad en el suelo que conduce a menos humedad disponible para la siembra de la próxima cosecha, afectando negativamente la germinación (Andini *et al.*, 2018). La quema también afecta la fauna del suelo, particularmente la población de lombrices de tierra e insectos que reportan beneficios al sembrado. Además, esta práctica

genera gases de efecto invernadero (CO_2 , CO , CH_4 , N_2O , SO_2), aerosoles, material particulado, humo y compuestos orgánicos volátiles (Crutzen & Andreae, 1990). Las emisiones de humo pueden provocar amenazas para la salud como infecciones pulmonares, bronquitis crónica y asma (Kumar *et al.*, 2018). Otra práctica comúnmente utilizada por los agricultores es dejar sus residuos agrícolas en el campo. Aunque esta práctica parece inofensiva, la acumulación de desechos podría contener material vegetal infestado, conduciendo así a daños de la cosecha por diseminación de plagas y enfermedades (Devi *et al.*, 2017).

En la industria del cacao, la materia prima principal son los granos de cacao fermentados y secos. Durante su procesamiento, tres subproductos importantes se obtienen: mazorca o cáscara del cacao, mucílago o baba y, cascarilla o cáscara del grano. Estos subproductos, son generalmente arrojados en la plantación de cacao, donde se descomponen esparciendo el hongo *Phytophthora spp.*, que contamina la plantación sana, causando pérdidas de cultivos y, por lo tanto, un declive económico para los productores de cacao (Panak *et al.*, 2018). La inadecuada disposición genera además problemas ambientales por la producción de gases de efecto invernadero, olores desagradables, propagación de enfermedades (mazorca negra, moniliasis, etc.), acidificación del suelo, incremento del magnesio, proliferación de bacterias y reproducción de insectos (facilitada por el alto contenido de humedad tanto de la cáscara como del mucílago) (Villamizar *et al.*, 2017; Donkoh *et al.*, 1991; Barazarte *et al.*, 2018; Figueira *et al.*, 1993; Kalvatchev *et al.*, 1998). Los desechos de la mazorca constituyen, en promedio, 2.4 toneladas/hectárea/año. Al producir una tonelada de granos secos, se generan diez toneladas de cáscaras de cacao húmedas, lo que representa un grave problema para su disposición (Figueira *et al.*, 1993; Kalvatchev *et al.*, 1998).

Los aumentos en la producción y procesamiento de los granos de cacao han generado un aumento de residuos, lo que resulta en millones de toneladas de cáscaras teniendo que ser eliminadas cada año. En 2013, se produjeron 3 455 622 toneladas métricas de cáscaras de cacao, estimando una tasa anual de crecimiento de 3.1 % de 2014 a 2019 (WCF, 2019), constituyendo, su inadecuada disposición, un grave problema de contaminación ambiental (Villamizar *et al.*, 2017). En este contexto, el aprovechamiento de los subproductos del procesamiento del cacao podrían ampliar la diversidad de productos que se originan de un solo fruto, lo que implica un mayor beneficio económico para los productores y la reducción de residuos que repercuten negativamente en el medio ambiente (Figueira *et al.*, 1993).

La capacidad fermentativa de una biomasa es totalmente dependiente de su contenido de carbohidratos simples y/o azúcares fermentables. Dado el caso de que la biomasa contenga carbohidratos complejos o ricos en lignocelulosas es necesario un pretratamiento para hidrolizar esos compuestos y generar moléculas más sencillas capaces de ser fermentadas. Si lo que se quiere es producir etanol principalmente, es necesario tener en cuenta la cantidad de azúcares y almidón en el sustrato, pues los microorganismos que pueden realizar esta fermentación solo pueden utilizar como sustratos hexosas; no sucede así con las fermentaciones ácidas o lácticas que emplean como sustrato carbohidratos, lípidos y proteínas (Carrillo-Nieves *et al.*, 2019; Kandyliis *et al.*, 2016; Vea *et al.*, 2018).

Comúnmente, en la digestión anaerobia en dos etapas, con la separación física de los reactores de fermentación y de metanización, se pretenden proporcionar condiciones adecuadas para la fermentación y para la metanización, mejorando así las actividades metabólicas específicas e incrementando la producción de metano. Procesos con una sola etapa poseen la desventaja de que la tasa de carga orgánica (CO) está limitada por la capacidad de los organismos metanogénicos para tolerar la repentina disminución del pH que resulta de la rápida producción de ácidos durante la acidogénesis (De Baere, 2000). Al someter al sustrato a una primera etapa fermentativa se pretende maximizar el contenido de ácidos orgánicos de cadena corta y alcoholes (Zhou *et al.*, 2018). Además, Jenkins *et al.* (2008) plantean que la generación y consumo de ácidos grasos volátiles deben ir a la par para no generar una limitante en la producción de metano. Metabolitos como el acetato, propionato, butirato, lactato, etc., se pueden obtener en una primera etapa (proceso fermentativo) y de todos ellos se despliegan rutas metabólicas que llevan a la posterior generación de metano (Gujer y Zehnder, 1983).

En los últimos años, las fuentes preferidas de combustibles alternativos cambiaron de cultivos alimentarios (biocombustibles de primera generación) a residuos provenientes de cultivos agrícolas, que son de naturaleza lignocelulósica, por lo tanto, difíciles de desintegrarse, y más recientemente, a biocombustibles de tercera generación mediante procesos con algas (Allen *et al.*, 2016; IEA, 2010). El número creciente de estudios refiriendo a los residuos de la producción del cacao (cáscara, mucílago y cascarilla) con potencial para la producción de biogás, además de la urgente necesidad de detener la contaminación atmosférica, hace que se proponga esta investigación en la cual se evalúa el efecto de la fermentación de la cáscara de cacao como una

primera etapa en la producción de metano. Para ello, se plantean la siguiente hipótesis y, objetivos general y específicos:

Hipótesis

Una fermentación controlada de la cáscara del cacao permite una mejor hidrólisis del sustrato y como consecuencia una mayor producción de metano en una posterior etapa de metanización.

Objetivo general

Determinar la capacidad para producir metano por digestión anaerobia de los residuos del procesamiento del cacao después de una fermentación controlada.

Objetivos específicos

- Analizar los productos de la fermentación de residuos del cacao como primera etapa de la digestión anaerobia.
- Determinar el rendimiento experimental de metano de los residuos del procesamiento del cacao previamente fermentados.
- Determinar la cinética de metanización de los residuos fermentados utilizando el modelo de Michaelis y Menten.

Alcances

- El trabajo experimental se centra en la cáscara del cacao porque representa entre el 70 y el 80 % del peso total del fruto de cacao; es el residuo generado en mayor volumen.
- El sustrato de alimentación al reactor fermentativo es cáscara de cacao proveniente de la región tropical de Chiapas, México.
- La metanización emplea como inóculo, lodos anaerobios granulares provenientes de un reactor UASB de una planta de tratamiento de aguas residuales de una industria cervecera mexicana.
- Los experimentos tienen lugar a escala de laboratorio.

CAPÍTULO 2. EL CACAO Y SUS RESIDUOS

El cacao o cacaotero (Figura 2.1), cuyo nombre científico es *Theobroma cacao* L., es un árbol procedente de las regiones tropicales y subtropicales de Suramérica (Ferrão-Gonzales *et al.*, 2013). El cultivo de este árbol se realiza bajo la sombra de otras especies de árboles y en combinación con cultivos alimentarios en el mismo terreno (Ameyaw *et al.*, 2018). Además, requiere un clima tropical para su pleno desarrollo, con temperaturas altas, entre 18 y 32 °C, altitudes por debajo de los 400 metros y ambientes con elevada humedad (70-90 %) (Afoakwa, 2010). La producción de cacao es sensible a la precipitación y se ve afectada por la sequía; para lograr su máximo rendimiento requiere entre 1000 y 2500 mm de lluvia anualmente (Ameyaw *et al.*, 2018).

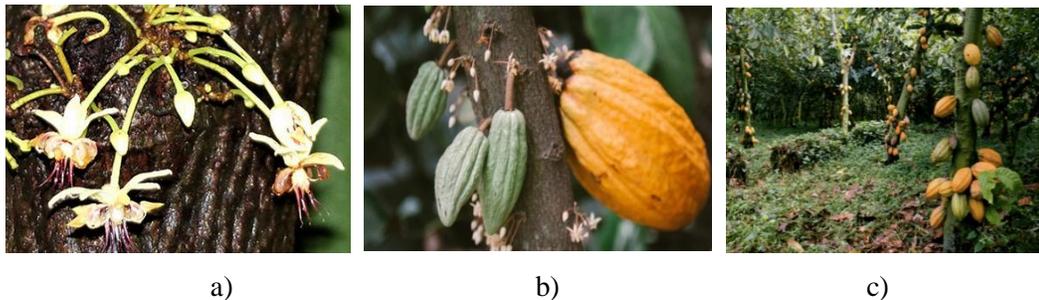


Figura 2.1: Planta de cacao. a) Flores b) Fruto (mazorca) c) Árbol de cacao

2.1 Descripción general del fruto del cacao

El cacao es una planta de entre 5 y 8 metros de altura (aunque puede crecer hasta 20 metros bajo sombra). El fruto del cacao (Figura 2.2), llamado comúnmente mazorca, con peso promedio entre 150 y 1000 g, crece en racimos pequeños. Su forma varía de esférica a elíptica muy alargada, presenta una superficie que va desde rugosa a lisa, y una coloración que varía entre el amarillo, naranja y morado cuando el fruto está maduro. En promedio, una mazorca de cacao

tiene 16.2 cm de largo y 7.88 cm de ancho. Tarda unos 157 días en llegar a la madurez, pero puede variar entre diferentes genotipos hasta 163 días o más (Meza-Sepúlveda *et al.*, 2021).



Figura 2.2: Elementos que componen el fruto de la planta de cacao.

El tamaño de la semilla o almendra de cacao puede variar entre 15 y 30 mm de longitud y de 5 a 15 mm de diámetro; y constituye la materia prima fundamental para la elaboración del chocolate y sus derivados. Además, se encuentra recubierta por una pulpa ácida-azucarada llamada mucílago, el cual contiene de 10 a 15 % de azúcar (Vallejo *et al.*, 2016), misma que es removida e hidrolizada por microorganismos durante el proceso de fermentación del grano.

Por cada 100 kg de cacao, aproximadamente se generan de 4 a 7 litros de mucílago líquido durante las primeras horas (Ortiz & Álvarez, 2015). El mucílago de cacao contiene en su composición química carbohidratos, sales minerales y vitamina C. En una mazorca se encuentran de 30 a 50 almendras unidas a un eje central llamado placenta.

2.1.1 Variedades de cacao

Tradicionalmente existen tres variedades principales de cacao: *criollo*, *trinitario* y *forastero* (Figura 2.3). Utilizando el mapa genético del cacao, las investigaciones más recientes indican que hay por lo menos diez familias principales de cacao (Motamayor *et al.*, 2008).

- El cacao *criollo* es la variedad primitiva, que crecía en América Central cuando llegaron los colonizadores españoles. Se considera una variedad de cacao “fino o de aroma” por lo que es muy apreciada para la obtención de polvo de cacao con el que se producen los chocolates de calidad, mucho más dulces y con menos amargos que el resto de las variedades (Smulders *et al.*, 2012). Representa, como mucho, el 10 % de la producción mundial.

- El cacao *forastero* es la variedad más abundante, representando aproximadamente el 90 % de la producción mundial. El grano tiene una cáscara gruesa, es resistente y poco aromático. Se cultiva fundamentalmente en África Occidental y Brasil (León-Villamizar *et al.*, 2016). Los mejores productores usan grano *forastero* en sus mezclas para dar cuerpo y amplitud al chocolate, pero la acidez, el equilibrio y la complejidad de los mejores chocolates proviene de la variedad criolla (Quintero & Díaz, 2004).
- El cacao *trinitario* procede de una variedad obtenida en la isla de Trinidad a base de cruzar las dos especies anteriores. Posee la robustez del cacao *forastero* y el delicado sabor del cacao *criollo* (Graziani de Fariñas *et al.*, 2002).



Figura 2.3: Variedades de cacao.

2.2 Producción de cacao

El cacao es uno de los principales productos consumidos a nivel mundial similar al café, aunque a diferencia de este, el cacao es producido en países en desarrollo, y consumido principalmente en países industrializados (CEDRSSA, 2020). El aumento en la demanda de este producto conlleva al incremento de su producción y del valor del cultivo para las economías locales y de la intensificación de la investigación en esta área (Sulaiman *et al.*, 2017).

En el período 2014/2015, la producción global se enmarcó en 4.2 millones de toneladas métricas (TM), con un valor en el mercado mundial de 12 billones de dólares. Los países productores de estas 4.2 millones de TM fueron: África Occidental (73 %), América Central y Sur (17 %) y Asia (10 %) (Sulaiman *et al.*, 2017). De acuerdo con el reporte de la Organización Internacional del Cacao (ICCO en inglés) en 2018, la producción estimada durante el período 2015/2016 fue de 3.9 millones de toneladas, lo que generó un aproximado de 16 millones de biomasa residual (Vásquez *et al.*, 2019). Como otras, esta biomasa residual tiene la particular característica de ser barata, abundante y renovable, por lo que resulta atractiva para procesos industriales.

Antes del 2005 México producía alrededor de 50 mil toneladas de cacao al año; a causa de moniliasis, un hongo que ataca desde dentro del fruto de cacao, la producción se redujo prácticamente a la mitad. Diversos organismos (gubernamentales, no gubernamentales, locales, etc.) han realizado muchos esfuerzos para rescatar la producción y mejorarla. De acuerdo con el sitio web de la Fundación Cacao México, organización fundada en 2010, se apoya el incremento de la producción de cacao en el país; para ello busca mejorar la calidad del fruto, optimando simultáneamente las condiciones de vida de los cultivadores.

México ocupa el decimoprimer lugar en producción a nivel mundial con más 28 mil toneladas, con una superficie para el cultivo de 117 000 hectáreas. Del volumen de producción nacional, Tabasco aporta el 66.9 %, Chiapas el 32.9 % y el resto es aportado por el Estado de Guerrero (CEDRSSA, 2020). En estos estados se concentra la producción, pero además se concentra la generación de residuos provenientes del procesamiento, ya que estos residuos se caracterizan por no ser aprovechados de manera sistemática o integral. Las causas de que no se aproveche pueden tener su origen en la escasa industrialización de estos procesos agrícolas, debido al arraigo ancestral de procedimientos artesanales.

2.3 Generación y manejo de residuos por etapas

De manera general, como refleja la Figura 2.4, la obtención de los granos de cacao comienza con la cosecha de los frutos del árbol de cacao. Las mazorcas maduras se identifican por el cambio de color en la cáscara exterior. Las podas realizadas, cuando son requeridas, pueden generar 20.24 toneladas de ramas/hectárea. Si se realiza además un control de malezas en una segunda etapa se pueden obtener 2.4 toneladas de malezas/hectárea (Mejía *et al.*, 2012). Al cortar y abrir la mazorca se extraen los granos, los que se encuentran recubiertos por la capa de pulpa mucilaginosa (denominado cacao en baba o simplemente mucílago) y sujetos a una estructura central conocida como placenta (INEN, 2006). La fermentación se inicia de manera natural inmediatamente después de sacar los granos de las mazorcas del cacao, es un proceso microbiológico espontáneo que ocurre tanto al interior (cotiledón) como exterior de la semilla (mucílago) (PROCOMER, 2019). El líquido separado en esta fermentación (mucílago) puede emplearse como materia prima en otros procesos por lo que es parcialmente colectado. En esta etapa se estima que se puede generar entre el 6 y 8 % en merma de granos (Mejía *et al.*, 2012).

A continuación, el cacao fermentado se seca hasta que la humedad no supere el 8 %, se ensaca y se transporta hacia su destino comercial. El tamizado de los granos secos puede presentar hasta un 10 % en merma de granos. Si se considera como etapa final la obtención del grano seco para la comercialización o exportación del material, se debe tener en cuenta que se producen aproximadamente 2 toneladas de granos secos/hectárea/año (Mejía *et al.*, 2012).

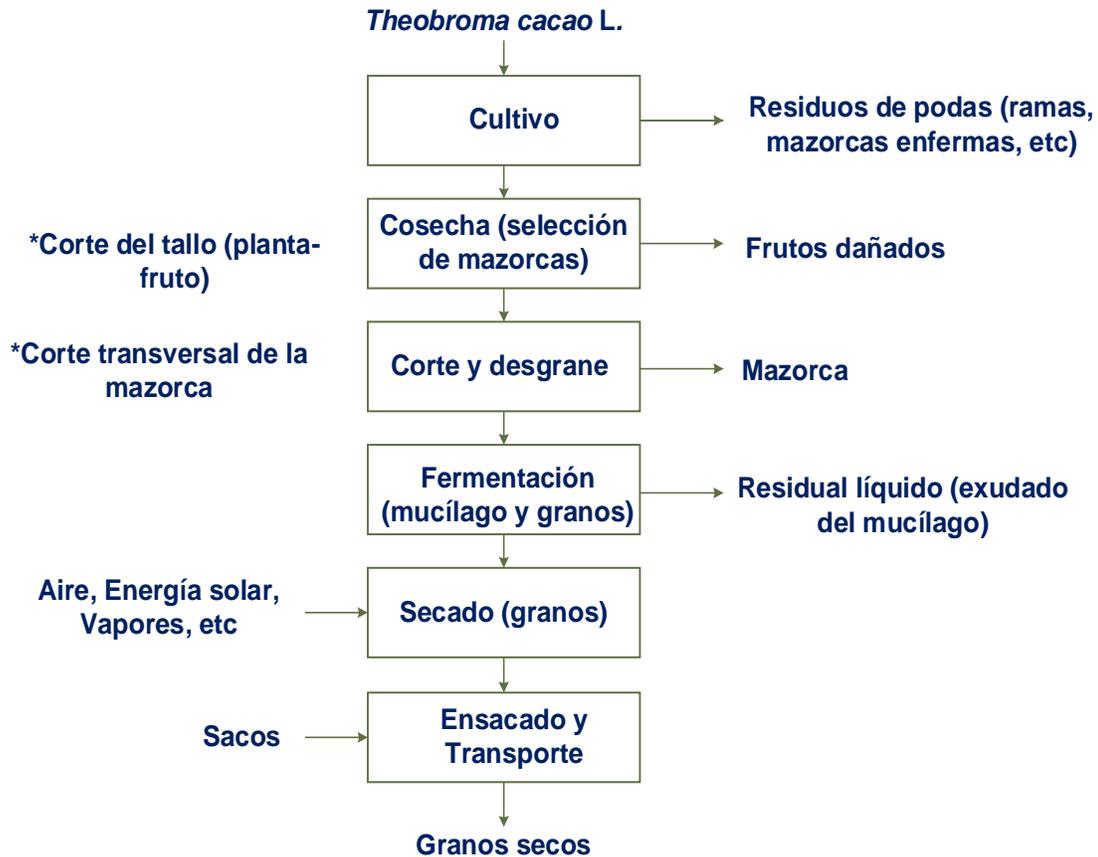


Figura 2.4: Diagrama general del procesamiento agrícola del cacao y residuos generados.

2.4 Características de los residuos de postcosecha

Los subproductos o residuos principales de la cosecha del cacao se originan durante su propia cadena de procesamiento agrícola; cuando se extraen los granos de la mazorca, se fermentan y se secan para su almacenamiento y transporte. Estos residuos de postcosecha poseen características muy distintas entre sí, como se exhibe a continuación.

2.4.1 Mazorca o cáscara de cacao

Del 90 % que corresponde a productos de desecho en la cosecha de cacao, la mazorca o cáscara de cacao puede llegar a representar hasta el 76 % del peso total de las mazorcas cosechadas (González & Jaimes, 2005; Barazarte *et al.*, 2008).

En el estudio realizado por Chafra *et al.* (2016) cuyo objetivo fue determinar la variabilidad de la composición bromatológica de las mazorcas de cacao entre cantones de la Amazonia, para su posterior empleo como sustrato en procesos biotecnológicos que modifican su valor nutricional, se tomaron frutos sanos y maduros, con peso promedio de $479\text{g} \pm 95$ por mazorca, a los que se extrajeron los granos. La cáscara residual se identificó y se almacenó en sacos para su traslado al laboratorio. Las muestras fueron molidas hasta alcanzar un tamaño de partícula de 0.5 a 1 cm, se secaron en estufa a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 h y luego se pulverizaron. El análisis de las relaciones estadísticas mediante análisis de componentes principales reveló que la varianza total es explicada en un 85 % por tres componentes: componente energético (fibra bruta, extracto etéreo y extracto libre de nitrógeno), componente mineral (materia seca y ceniza) y componente proteico. El componente energético muestra la mayor contribución a la varianza (39.4 %). La variabilidad en estos indicadores puede relacionarse con las condiciones climáticas y la radiación solar en las zonas de estudio. La variedad en el segundo componente analizado se relaciona con la pluviosidad y la calidad del suelo. El tercer componente, con 19 % de representatividad en la varianza, pudo haber sido afectado por la fertilización del cultivo. Se concluye que la composición bromatológica en las producciones de cacao se puede diferenciar a través de 3 elementos principalmente: extracto etéreo, extracto libre de nitrógeno y fibra bruta.

El estudio realizado por Güemes-Vera *et al.* (2020), tuvo como objetivo determinar las características morfométricas, el análisis químico proximal y la capacidad antioxidante en la harina de cáscara de la mazorca de cacao, para evaluar su viabilidad como materia prima. Los valores representan la media y la desviación estándar. El análisis químico proximal mostró un porcentaje de fibra cruda de 26.75 %, ceniza 8.41 %, humedad 6.26 %, proteína 5.27 %, grasa 0.69 % y un contenido de carbohidratos por diferencia de 52.61 % (Tabla 2.1). La harina de cáscara de la mazorca de cacao presentó un porcentaje de rendimiento del 29 %, esto significa que, de cada 100 kg de cáscara de mazorca de cacao, se obtienen 29 kg de harina. El estudio concluye que la harina de cáscara de mazorca de cacao aporta cenizas y fibra, además de mostrar

capacidad antioxidante, lo que la convierte en materia prima de procesos agroindustriales como la producción de alimentos para el ganado bovino.

Tabla 2.1: Análisis de las características de la harina de cáscara de cacao (Güemes-Vera *et al.*, 2020).

Análisis	Harina de cáscara de cacao (%)
<i>Humedad</i>	6.26 ± 0.12
<i>Cenizas</i>	8.41 ± 0.06
<i>Grasas</i>	0.69 ± 0.02
<i>Proteínas</i>	5.27 ± 0.06
<i>Fibra cruda</i>	26.75 ± 0.21
<i>Carbohidratos</i>	52.61 ± 0.02

Para observar el desempeño de las ovejas, en términos de nutrición, alimentadas por hojas y cáscara del fruto del cacao fermentado, Fridarti *et al.* (2017) llevan a cabo un estudio cuyo resultado indica que las hojas y la cáscara del fruto fermentado del cacao puede reemplazar el 50 % del forraje y aumentan el desempeño de las ovejas. Los resultados del análisis muestran que la cáscara de cacao contiene 28 % de materia seca, 40 % de fibras gruesas, 8 % de proteína cruda y 51 % de nutrientes digestibles totales. En la cáscara del fruto del cacao, el contenido de humedad varía entre el 84 y 86 %; la grasa cruda de 0.74 a 1.23 %; de 0.9 a 1.07 % la proteína cruda; los azúcares reductores del 0.8 al 0.97 %; la cafeína del 0.04 a 0.12 %; las fibras gruesas del 0.52 al 4.68 % y las cenizas del 0.55 al 1.57 %.

En su estudio Vriesmann *et al.* (2011), analiza la composición de las cáscaras de las mazorcas de cacao y la harina obtenida a partir estas. Las fracciones etiquetadas como 50W y BW produjeron 7.5 y 12.6 % de pectinas, respectivamente. Los análisis químicos y espectroscópicos mostraron que ambas fracciones contenían altos contenido de acetilo (grado de acetilación: 29.0 y 19.2 %, respectivamente) y se componen de homogalacturonanos de bajo metoxilo (grado de esterificación: 37 y 42.3 %, respectivamente) con inserciones de ramnogalacturonano que llevan cadenas laterales que contienen principalmente galactosa. Las mazorcas enteras de cacao mostraron un peso promedio de 475 g, que es similar a las descripciones en la literatura (aproximadamente 500 g) (Lachenaud *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2004). Las semillas y pulpa ocuparon 122 g en promedio, y las cáscaras de la mazorca del cacao tenían un peso medio de 356 g. Así, cada mazorca de cacao estaba compuesta por aproximadamente 74 % de cáscaras frescas (p/p), que es similar a los valores reportados de 75 a 76 % por Whistler *et al.* (1956) y

Donkoh *et al.* (1991). El contenido de humedad de las cáscaras de las mazorcas de cacao era de aproximadamente 90 %.

La harina de la cáscara de mazorca presentó un contenido bajo en lípidos (1.5 %), alto en cenizas (6.7 %) y proteínas (8.6 %) y, un contenido total de fibra dietética del 36.6 %; valores similares a los publicados por Donkoh *et al.* (1991) y Aregheore (2002) (Tabla 2.2). La cantidad de fenoles solubles que se encuentran en la harina de cáscara de mazorca es de 4.6 %, lo cual es superior al producto obtenido a partir de las cáscaras del grano del cacao (1.32 %) (Lecumberri *et al.*, 2007).

Tabla 2.2: Composición química de la harina de la mazorca del cacao (Vriesmann *et al.*, 2011).

Componentes	Contenido (g/100 g)
<i>Humedad</i>	8.5±0.06
<i>Cenizas</i>	6.7±0.02
<i>Proteínas</i>	8.6±0.09
<i>Lípidos</i>	1.5±0.13
<i>Carbohidratos totales</i>	32.3±1.8
<i>Carbohidratos de baja masa molar</i>	19.2±0.2
<i>Azúcares reductoras</i>	10.4±0.7
<i>Lignina</i>	21.4±0.6
<i>Fibra insoluble</i>	27±0.01
<i>Fibra soluble</i>	9.6±0.01
<i>Fibra total</i>	36.6±0.01

La harina de cáscara de mazorca de cacao también contiene una gran variedad de minerales (Tabla 2.3). Los componentes cualitativos son los mismos que los reportados en estudios de Donkoh *et al.* (1991) y Aregheore (2002). Un predominio del potasio (K) fue observado, seguido del calcio (Ca) y magnesio (Mg), con proporciones intermedias de sodio (Na), hierro (Fe), manganeso (Mn) y zinc (Zn) y cantidades menores de cobre (Cu) y selenio (Se). Las variaciones identificadas en relación con el contenido de minerales pueden ser explicadas por los orígenes geográficos de las muestras y las técnicas empleadas en la medición de estos minerales.

Como se muestra en la Tabla 2.4, la composición de monosacáridos fue, de mayor a menor: glucosa, ácido urónico, xilosa, arabinosa, galactosa, ramnosa, manosa y fucosa; lo que sugiere un predominio de celulosa. La elevada cantidad de xilosa y arabinosa sugieren la presencia de xilanos. Según la composición de monosacáridos, otras hemicelulosas como xiloglucanos,

mananos, galactomananos o (galacto) y glucananos también pueden ser encontradas en la harina de la mazorca. Estos resultados concuerdan con los datos que indican que la fibra dietética de la harina de mazorca se compone principalmente de fibra insoluble. Proporciones significativas de ácido urónico y pequeñas cantidades de ramnosa son consistentes con la presencia de pectinas en la fibra dietética soluble.

Tabla 2.3: Composición mineral de la harina de la mazorca del cacao (Vriesmann *et al.*, 2011).

Elemento	(mg/kg)
<i>Ca</i>	2.54±113.1
<i>Fe</i>	58±1.1
<i>K</i>	27.68±519.7
<i>Mg</i>	1109±0.1
<i>Na</i>	105±6
<i>Cu</i>	6.18±0.02
<i>Mn</i>	35.72±0.03
<i>Se</i>	0.01±0.006
<i>Zn</i>	39.74±0.06

Tabla 2.4: Composición de monosacáridos en la mazorca del cacao (Vriesmann *et al.*, 2011).

Monosacáridos	% masa seca
<i>Ramnosa</i>	1.9±0.2
<i>Fucosa</i>	0.2±0.01
<i>Arabinosa</i>	3.7±0.54
<i>Xilosa</i>	6.4±0.79
<i>Manosa</i>	1.6±0.11
<i>Galactosa</i>	3.2±0.29
<i>Glucosa</i>	8.6±0.44
<i>Ácido urónico</i>	6.7±0.49
<i>Azúcares totales</i>	32.3±1.8

Los estudios revisados señalan a este subproducto como una fuente prometedora de compuestos funcionales fenólicos y fibras, incluidas las pectinas, que brindan beneficios para la salud cuando se consumen como parte de la dieta. Además, estas pectinas pueden ser estudiadas para aplicaciones biológicas, farmacológicas y alimentarias. Luego de la extracción de estos componentes, el material lignocelulósico, podría ensayarse para la producción de productos químicos e industriales (Reddy & Yang, 2005).

Tabla 2.5: Resumen de características fisicoquímicas y bromatológicas para la harina de la mazorca del cacao.

Parámetros	Mínimo	Máximo	Promedio	Referencias
Humedad (%)	6.67	16.1	10.19	(Orjuela <i>et al.</i> , 2019; Syamsiro <i>et al.</i> , 2011; Titiloye <i>et al.</i> , 2013; Forero-Núñez <i>et al.</i> , 2015; Villamizar <i>et al.</i> , 2017; Nguyen <i>et al.</i> , 2017; Castillo <i>et al.</i> , 2018)
Material volátil (%ST)	49.9	68.49	59.39	(Orjuela <i>et al.</i> , 2019; Syamsiro <i>et al.</i> , 2011; Titiloye <i>et al.</i> , 2013; Forero-Núñez <i>et al.</i> , 2015)
Cenizas (%ST)	6.7	13.5	10.92	(Orjuela <i>et al.</i> , 2019; Syamsiro <i>et al.</i> , 2011; Titiloye <i>et al.</i> , 2013; Forero-Núñez <i>et al.</i> , 2015; Villamizar <i>et al.</i> , 2017; Nguyen <i>et al.</i> , 2017; Castillo <i>et al.</i> , 2018; Njoku <i>et al.</i> , 2011; Daud <i>et al.</i> , 2014; Vásquez <i>et al.</i> , 2019)
Carbón fijo (%ST)	10.43	20.5	16.42	(Orjuela <i>et al.</i> , 2019; Syamsiro <i>et al.</i> , 2011; Titiloye <i>et al.</i> , 2013; Forero-Núñez <i>et al.</i> , 2015)
Proteína cruda	4.21	14.63	8.55	(Villamizar <i>et al.</i> , 2017; Castillo <i>et al.</i> , 2018; Vásquez <i>et al.</i> , 2019; Alemawor <i>et al.</i> , 2009; Daniyan <i>et al.</i> , 2014)
Grasas (%ST)	0.12	1.5	0.48	(Villamizar <i>et al.</i> , 2017; Nguyen <i>et al.</i> , 2017; Castillo <i>et al.</i> , 2018; Vásquez <i>et al.</i> , 2019)
Fibra (%ST)	3.1	136.6	43.65	(Villamizar <i>et al.</i> , 2017; Nguyen <i>et al.</i> , 2017; Castillo <i>et al.</i> , 2018; Alemawor <i>et al.</i> , 2009; Daniyan <i>et al.</i> , 2014; Adeyeye <i>et al.</i> , 2019)
Almidón (mg/100 g)	ND	ND	2.2	(Alemawor <i>et al.</i> , 2009)
Carbohidratos (%)	ND	ND	74.93	(Villamizar <i>et al.</i> , 2017; Vásquez <i>et al.</i> , 2019)
Glucosa (mg/100 g)	ND	ND	1.16	(Daniyan <i>et al.</i> , 2014)
Sacarosa (mg/100 g)	ND	ND	0.18	(Daniyan <i>et al.</i> , 2014)
Azúcares totales (%)	ND	ND	45.42	(Castillo <i>et al.</i> , 2018)
Fenoles totales (g/kg muestra)	ND	ND	21.41	(Castillo <i>et al.</i> , 2018)
Taninos (mg/100 g)	0.12	5.20	0.12	(Vásquez <i>et al.</i> , 2019; Adeyeye <i>et al.</i> , 2019)
Teobromina (mg/100 g)	0.2	0.679	0.41	(Syamsiro <i>et al.</i> , 2011; Nguyen <i>et al.</i> , 2017; Vásquez <i>et al.</i> , 2019; Adeyeye <i>et al.</i> , 2019)
Hemicelulosa (mg/100 g)	ND	ND	37	(Daud <i>et al.</i> , 2014)
Celulosa (mg/100 g)	26.1	35.4	33.02	(Daud <i>et al.</i> , 2014; Alemawor <i>et al.</i> , 2009; García & Torres, 2003)
Lignina (mg/100 g)	14.7	21.6	23.75	(Daud <i>et al.</i> , 2014; Alemawor <i>et al.</i> , 2009; García & Torres, 2003)
Pectina (mg/100 g)	ND	ND	3.71	(Daniyan <i>et al.</i> , 2014)
pH	ND	ND	6.25	(Castillo <i>et al.</i> , 2018)
Acidez titulable (% ST)	ND	ND	0.38	(Castillo <i>et al.</i> , 2018)

ND: no disponible; acidez como ácido nítrico

La Tabla 2.5 presenta los rangos y promedios calculados para varios parámetros fisicoquímicos de la harina de la cáscara del cacao. En general, esta tiene un buen contenido de fibras (43 %) y azúcares (45 %) pero bajo contenido de grasas (0.48 %). También tiene un alto contenido de polifenoles (21 %) y bajo en alcaloides (teobromina y cafeína) con menos de 0.4 mg/100 g. En cuanto a los componentes lignocelulósicos, contiene 37, 33, 23 y 3 % de hemicelulosa, celulosa, lignina y pectina, respectivamente.

2.4.2 Mucílago del cacao

En la actualidad no existe mucha información científica sobre la composición del mucílago del cacao y sus potenciales usos en la industria. La pulpa mucilaginoso que rodea la semilla de cacao está compuesta por células esponjosas parenquimatosas, que contienen células de savia ricas en azúcares (10-13 %), pentosas (2 %), ácido cítrico (1-2 %) y sales, además un 1 % de pectina (Kalvatchev *et al.*, 1998; Yépez *et al.*, 2015). Según Márquez & Zalazar, (2015), el mucílago del cacao está compuesto por 80 % de agua, del 10 al 15 % de sacarosa, glucosa y fructuosa, hasta 0.5 % de ácidos no volátiles (en su mayor parte cítricos) y, cantidades pequeñas de almidón, ácidos volátiles y sales.

Antes de la ruptura de la mazorca de cacao la pulpa es estéril, pero la presencia de azúcar y la adecuada acidez (pH 3.5), proporcionan excelentes condiciones para que diversos microorganismos se desarrollen, por lo que en ocasiones los granos pueden perder parte de esta capa mucilaginoso sin haber sido abierta la mazorca. Parte de este mucílago o pulpa es necesaria para la producción de alcohol y ácido acético en la fermentación de las almendras; del 5 al 7 % drena como exudado.

Durante el proceso de fermentación la pulpa provee al sustrato con varios microorganismos que son esenciales para el desarrollo de los precursores del sabor del chocolate. Aunque la pulpa es necesaria para la fermentación, esta se encuentra en exceso por lo que debe ser removida generando un exudado. Kalvatchev *et al.* (1998) y Arteaga (2017) establecen una relación de pulpa y semilla fresca donde aproximadamente 40 litros de pulpa se obtienen a partir de 800 kg de semilla fresca.

Los resultados de Anvoh *et al.* (2009) indican que el mucílago tiene un alto valor nutricional debido al alto contenido de grasas, carbohidratos, proteína cruda, minerales y vitaminas. Los autores ofrecen un resumen de las propiedades fisicoquímicas de mucílago del *Theobroma*

cacao L.; estos parámetros demuestran que el mucílago es muy ácido (Tabla 2.6). La acidez se debe al bajo valor de pH 3.75 y la alta acidez titulable de 170 ± 6.28 meq/L. El ácido cítrico fue el ácido orgánico identificado más predominante con un valor promedio de 9.14 ± 0.64 mg/L; los contenidos de ácido málico y acético fueron de 3.6 ± 0.5 mg/L y 2.28 ± 0.7 mg/L, respectivamente. El residuo presentó muy bajo contenido de ácido oxálico (1.27 ± 0.72 mg/L), ácido láctico (1.23 ± 0.01 mg/L) y ácido fumárico (0.02 ± 0.01 mg/L).

Tabla 2.6: Características fisicoquímicas del mucílago del cacao (Anvoh *et al.*, 2009).

Parámetros	Promedios
<i>Humedad (%)</i>	85.3±8.60
<i>Sólidos solubles totales (°Brix)</i>	16.17±0.74
<i>Glucosa (g/L)</i>	214.24±6.42
<i>Sacarosa (g/L)</i>	21.31±3.21
<i>pH</i>	3.75±0.81
<i>Acidez titulable (meq/L)</i>	170±6.28
<i>Ácido cítrico (mg/L)</i>	9.14±0.64
<i>Ácido málico (mg/L)</i>	3.6±0.50
<i>Ácido acético (mg/L)</i>	2.28±0.70
<i>Ácido oxálico (mg/L)</i>	1.27±0.72
<i>Ácido láctico (mg/L)</i>	1.23±0.01
<i>Vitamina C (mg/L)</i>	18.3±7.50
<i>Ceniza (%)</i>	3.76±0.84
<i>Fósforo total (mg/L)</i>	62.47±3.43
<i>Calcio (mg/L)</i>	171.5±34.01
<i>Magnesio (mg/L)</i>	82.5±0.81
<i>Sodio (mg/L)</i>	30.5±3.77
<i>Potasio (mg/L)</i>	950±16.32
<i>Grasa (%)</i>	3.54±0.2
<i>Proteínas totales (g/L)</i>	7.2±0.21

Un estudio realizado por Luna (2018), que busca la obtención de etanol a partir del mucílago del cacao de la variedad fino de aroma *Arriba* mediante fermentación alcohólica, ofrece la siguiente composición fisicoquímica para su mucílago (Tabla 2.7).

Datos similares reportan Grazzo (2015) y Anvoh *et al.* (2009); también los valores de cenizas (%), sólidos totales (%) son similares a la investigación de Luzuriaga (2012). Sin embargo, en la investigación de Vallejo *et al.* (2016), difieren los porcentajes de acidez y grados Brix. Los valores obtenidos por Vallejo *et al.* (2016) pueden justificarse si se tienen en cuenta factores

como: el lugar de siembra, el tratamiento de suelo, el manejo de cosecha y poscosecha, y/o el estado de madurez del fruto.

Tabla 2.7: Composición fisicoquímica del mucílago del cacao (cacao *Arriba*) (Luna, 2018).

Parámetros	Promedios
<i>Humedad (%)</i>	81.18±0.04
<i>Sólidos solubles totales (°Brix)</i>	18.11±0.02
<i>pH</i>	3.76±0.03
<i>Cenizas (%)</i>	0.27±0.15
<i>Acidez (%)</i>	1.77±0.02
<i>Azúcares Reductores (%)</i>	20.85±0.05
<i>Ácido Cítrico (%)</i>	0.88 ±0.05

En la cuantificación de los azúcares fermentables del mucílago de cacao, los valores hallados por Luna (2018) fueron: glucosa (62.52 g/L), fructuosa (63.47 ± 0.05 g/L), sacarosa (45.89 ± 0.05 g/L), celobiosa (1.52 ± 0.05 g/L). Sin embargo, otras investigaciones reportan un contenido mayor de la sacarosa en relación con la concentración de glucosa y fructosa (Romero & Zambrano, 2012). En el estudio de Thi *et al.* (2016) se reportan valores del 10 al 15 % de azúcar (60 % sacarosa y 39 % entre glucosa y fructosa); estos resultados posiblemente fueron influenciados por el contenido de agua del suelo y el estado de maduración de la mazorca de cacao.

Luna (2018) en su determinación de la composición elemental del mucílago de cacao obtuvo 0.83 % de nitrógeno (N), 45.92 % de carbono (C), 5.39 % de hidrógeno (H) y menos del 0.05 % de azufre (S). Estudios como los de Mejía & Arguello (2000) y Grazzo (2015) corroboran los valores antes mencionados de composición de nitrógeno y carbono. El estudio de Luna (2018) concluye que el mucílago de cacao *Arriba* es un sustrato idóneo para la fermentación alcohólica, utilizando *Saccharomyces cerevisiae*, debido a su composición fisicoquímica y contenido de nitrógeno total.

La producción de etanol es directamente proporcional a la cantidad de azúcares presentes en el mucílago de cacao. Durante la fermentación existe una disminución gradual de la concentración de los azúcares reductores disponibles y un incremento de producción de etanol. Se puede estimar que a partir de 20.85 ± 0.05 % de azúcares reductores podrían generarse, mediante fermentación alcohólica, 11.62 % de etanol (Luna, 2018).

2.4.3 Cascarilla del cacao

La cascarilla del cacao rodea al grano y es obtenida, después de la fermentación de este, a partir del descascarillado en el procesamiento industrial del fruto. La cascarilla representa alrededor del 12 % del peso del grano (Sangronis *et al.*, 2014). Presenta un olor y color similar al del chocolate, es un subproducto crujiente y fibroso (Vásquez *et al.*, 2017). La harina de cascarilla de cacao puede sustituir a la harina de trigo y/o de avena en la elaboración de galletas comerciales, tortas y suplementos dietéticos debido a los contenidos presentes de fibras, grasas, proteínas, etc. (Vásquez *et al.*, 2017). La cantidad de compuestos fenólicos presentes aportan a este sustrato importantes propiedades antioxidantes, lo que reafirma su aplicabilidad en la industria alimentaria (Okiyama *et al.*, 2017).

Un estudio realizado por Vivanco *et al.* (2018) en Ecuador, analiza dos variedades de cacao, la variedad conocida como cacao *Arriba* (Nacional) y la variedad *Híbrido* (CCN-51). La Tabla 2.8 muestra los contenidos de humedad, cenizas, fibra dietética, grasas, proteínas, carbohidratos y acidez titulable de la cascarilla de estas dos variedades. Los autores consideran que el contenido de cenizas, de alrededor del 5 % para ambas variedades, anuncia la presencia de minerales en la cascarilla. El contenido de proteínas para ambas variedades es similar (8 %), sin embargo, resulta superior al valor reportado por Quiñones & Dercy (2015) e inferior en relación con Sangronis *et al.* (2014) (Tabla 2.9). Vivanco *et al.* (2018) también obtienen valores superiores para las grasas presentes en el sustrato y, valores inferiores si se analizan los carbohidratos, cenizas y contenidos de humedad. No fue posible hacer una comparación justa entre la Tabla 2.8 y la Tabla 2.9, pues los autores no emplean como sustrato la misma variedad de cacao e incluso algunos utilizan mezclas de cascarillas de *criollo* y *forastero* o, mezclas de cascarilla y cáscara (Martínez *et al.*, 2012). Los valores mostrados son evidencia de que se pueden presentar muchas divergencias aun cuando las técnicas para el análisis son similares, ya que las características siempre dependerán de la variedad, origen y preparación a la que son sometidas las muestras.

Tabla 2.8: Características de la cascarilla de dos variedades de cacao (Vivanco *et al.*, 2018).

Parámetros (base seca)	Nacional	CCN-51
<i>Humedad (%)</i>	8.74 / 0.05	6.43 / 0.05
<i>Cenizas (%)</i>	5.14 / 0.12	5.54 / 0.11
<i>Fibra dietética (%)</i>	41.96 / 0.85	40.14 / 0.23
<i>Grasas (%)</i>	2.25 / 0.18	1.56 / 0.27
<i>Proteínas (%)</i>	8.75 / 0.49	8.48 / 0.59
<i>Carbohidratos (%)</i>	35.24 / 0.11	26.38 / 0.13
<i>Acidez titulable (%)</i>	0.14 / 0.05	0.11 / 0.02

De acuerdo con los resultados de Lecumberri *et al.* (2007), los niveles de azúcares solubles son despreciables, lo cual representa una ventaja para la cascarilla, considerando su reducido valor calórico. El contenido de fibras constituye más del 50 % del material total (Okiyama *et al.*, 2017). Lecumberri *et al.* (2007), al evaluar la cáscara de cacao, observaron que, del total de fibra dietética determinada, solo el 10 % consistía en fibra dietética soluble, por lo que los autores sugieren que este sustrato puede ser utilizado en la preparación de alimentos bajos en calorías y ricos en fibra. En la Tabla 2.9 las mayores diferencias son observadas en el contenido de carbohidratos, esto se debe principalmente a que en el trabajo de Martínez *et al.* (2012), las muestras estuvieron constituidas por mezclas de cascarilla y cáscara de cacao. Las grasas presentes en la cascarilla tienen un valor relativamente bajo en comparación con los granos de cacao, donde la grasa constituye más del 50% del peso seco. Además, las grasas pueden llegar a presentar un alto nivel de acidez, como resultado de las altas temperaturas a la que se someten los granos durante el tostado (Okiyama *et al.*, 2017). Los porcentajes de humedad varían en dependencia del secado del grano y el posterior proceso de descascarillado.

Tabla 2.9: Análisis proximal de la cascarilla de cacao según reportes de varios autores (base seca).

Parámetros	Sangronis <i>et al.</i>, 2014	Soto, 2012	Cardona <i>et al.</i>, 2002	Lecumberri <i>et al.</i>, 2007	Martínez <i>et al.</i>, 2012
<i>Humedad (%)</i>	3.46-5.08	4.31	6	ND	7.7
<i>Cenizas (%)</i>	7.51-8.09	7.81	7.9	11.4	7
<i>Fibra dietética (%)</i>	ND	ND	44	60.5	ND
<i>Grasas (%)</i>	1.09-1.38	1.23	4.4	6.6	2.02
<i>Proteínas (%)</i>	18.54-19.69	18.91	15.6	16.7	15
<i>Carbohidratos (%)</i>	70.85-72.82	72.05	ND	ND	17.8

ND: no disponible

CAPÍTULO 3. DIGESTIÓN ANAEROBIA

3.1 Generalidades de la digestión anaerobia

La digestión anaerobia (DA) es un proceso de descomposición de materiales orgánicos y biodegradables complejos bajo condiciones controladas y en ausencia de oxígeno (Khalid *et al.*, 2011). La DA se desarrolla bajo temperaturas convenientes para las bacterias anaerobias y facultativas, mesófilas o termófilas naturales, y especies de arqueas. Estos microorganismos convierten el material orgánico, mediante reacciones bioquímicas complejas en productos gaseosos (biogás) y en un digestato que es una mezcla de productos minerales y compuestos orgánicos de difícil degradación (IDAE, 2007).

La DA posibilita la degradación de la fracción orgánica biodegradable presente en los residuos sólidos. El biogás resultante varía en función del sustrato y los microorganismos, pero, a grandes rasgos, es una mezcla conformada por metano (CH_4) en una proporción que oscila entre 40 y 70 %, dióxido de carbono (CO_2) del 25-30 % y pequeñas proporciones de otros gases como hidrógeno (H_2), nitrógeno (N_2), oxígeno (O_2) y sulfuro de hidrógeno (H_2S). En la Tabla 3.1 se muestran los principales componentes del biogás identificados para distintos residuos. Los compuestos encontrados en mayor proporción, independientemente del tipo de sustrato, son el metano y el dióxido de carbono. El hidrógeno usualmente se presenta en menor concentración, pero existen mecanismos para producir este gas en mayor cantidad. Los residuos agrícolas como el cacao presentan una considerable concentración de metano en el biogás, de ahí su importancia en esta investigación.

Los productos de la digestión tienen un alto aprovechamiento energético y el residuo final (digestato) presenta una alta tasa de destrucción de microorganismos patógenos (higienización), que reúne condiciones para ser utilizado como mejorador de suelos y biofertilizante (Mata-Álvarez *et al.*, 2000). Por ello, la DA presenta un balance energético positivo posibilitando tanto

la prevención de la contaminación del aire (gases de efecto invernadero) como la recuperación sostenible de la energía por la degradación controlada de los residuos orgánicos (Aguilera, 2018).

Tabla 3.1: Componentes del biogás en función del sustrato utilizado (Lorenzo & Obaya, 2005).

Componente	Residuos agrícolas	Lodos de depuradora	Residuos industriales	Gas de vertedero
<i>Metano</i>	50-80 %	50-80 %	50-70 %	45-65 %
<i>Dióxido de carbono</i>	20-50 %	20-50 %	30-50 %	34-55 %
<i>Agua</i>	Saturado	Saturado	Saturado	Saturado
<i>Hidrógeno</i>	0-2 %	0-5 %	0-2 %	0-1 %
<i>Sulfuro de hidrógeno</i>	100-700 ppm	0-1 %	0-8 %	0.5-100 ppm
<i>Amoníaco</i>	Trazas	Trazas	Trazas	Trazas
<i>Monóxido de carbono</i>	0-1 %	0-1 %	0-1 %	Trazas
<i>Nitrógeno</i>	0-1 %	0-3 %	0-1 %	0-20 %
<i>Oxígeno</i>	0-1 %	0-1 %	0-1 %	0-5 %
<i>Compuestos orgánicos</i>	Trazas	Trazas	Trazas	5ppm (terpenos, ésteres.)

3.1.1 Bioquímica de la digestión anaerobia

Se puede concentrar el proceso de DA en cuatro etapas bioquímicas: 1) hidrólisis de las moléculas orgánicas complejas a monómeros solubles; 2) acidogénesis o fermentación, donde los monómeros solubles de la hidrólisis son transformados en alcoholes y ácidos grasos volátiles (ácidos acético, propiónico, butírico, etc.), ácido láctico, junto con dióxido de carbono e hidrógeno; 3) la acetogénesis es cuando los ácidos de cadena corta y alcoholes producidos previamente se convierten en acetato; y 4) metanogénesis, donde diferentes arqueas pueden usar acetato, dióxido de carbono e hidrógeno para producir metano como uno de los productos finales (Gujer & Zehnder, 1983) (Figura 3.1).

Hidrólisis

Es la primera etapa de la DA, donde los polímeros complejos presentes en la materia orgánica (carbohidratos, proteínas y lípidos) son hidrolizados a moléculas más simples (polipéptidos, aminoácidos, ácidos grasos volátiles de cadena larga y azúcares) por la acción de enzimas extracelulares (Li *et al.*, 2011). Las moléculas son simplemente demasiado grandes para ser directamente absorbidas y utilizadas por los microorganismos como sustrato/fuente de alimento (Adekunle & Okolie, 2015). Las enzimas que intervienen dependen del sustrato a degradar. De

acuerdo con Shah *et al.* (2014), la tasa de hidrólisis depende de factores como: la naturaleza, el tamaño y la concentración del sustrato, los microorganismos presentes, la temperatura y el pH.

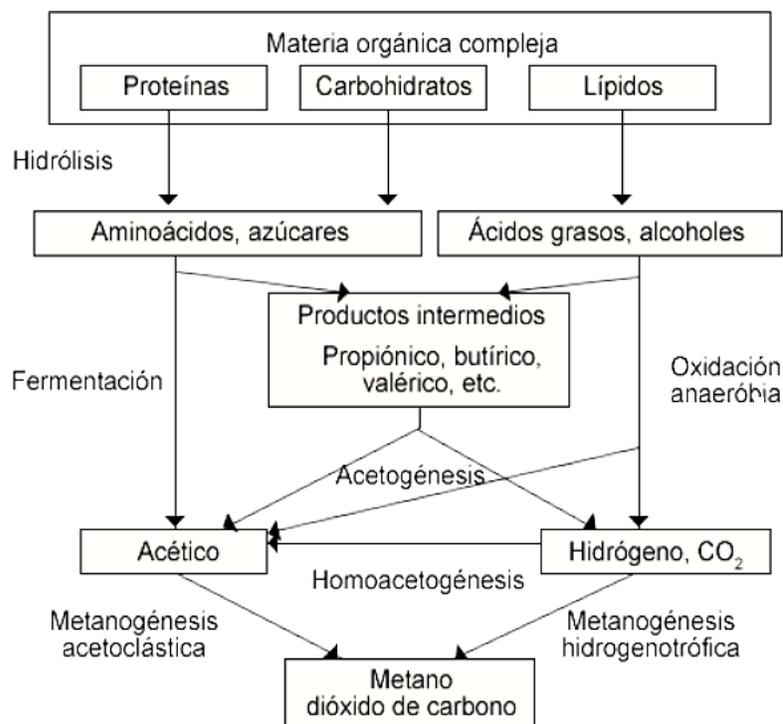


Figura 3.1: Esquema de reacciones de la DA (Gujer & Zehnder, 1983, modificado).

La hidrólisis se considera una etapa limitante ya que los compuestos orgánicos simples obtenidos al final de esta serán los encargados de aportar la energía y/o el carbono a los diferentes grupos de microorganismos que desarrollan las siguientes etapas (Mata-Álvarez *et al.*, 2000). Además, esta etapa condiciona la velocidad global del proceso, mayormente cuando se tratan residuos con elevado contenido de sólidos (Khalid *et al.*, 2011; Schnurer & Jarvis, 2010).

Acidogénesis

Esta etapa es también conocida como fermentación. Los productos obtenidos de la etapa anterior son convertidos principalmente a ácidos grasos volátiles, ácidos grasos de cadena larga, alcoholes, aldehídos, hidrógeno y dióxido de carbono (Shah *et al.*, 2014). Esta conversión la realizan bacterias anaerobias y facultativas.

La acidogénesis se considera una etapa rápida en el proceso de DA pues los microorganismos presentes tienen una elevada tasa de crecimiento; la población acidogénica representa alrededor del 90 % en peso de la comunidad microbiana (Khanal, 2008).

Acetogénesis

Los ácidos y alcoholes producidos durante la acidogénesis son convertidos a acetato, hidrógeno y dióxido de carbono por microorganismos que emplean como sustrato los ácidos orgánicos de cadena más larga y otros compuestos que no pueden ser usados directamente por las arqueas metanogénicas. De estas arqueas depende la degradación de los ácidos grasos y alcoholes, teniéndose que llevar a cabo una relación sintrófica entre organismos productores y consumidores de hidrógeno (Henze *et al.*, 2008)

Los productos de esta etapa son utilizados en la producción de biogás por las arqueas metanógenas y, deben permanecer en determinadas cantidades pues un exceso de hidrógeno inhibirá la producción de metano, incrementando la concentración de ácido propiónico y butírico, acidificando el reactor y disminuyendo el pH.

Metanogénesis

En esta etapa, las arqueas metanogénicas utilizan como alimento los productos resultantes de las etapas anteriores, completando el proceso mediante la formación de metano. Se establecen dos grupos en función del sustrato principal que metabolizan: metanogénicos acetoclásticos e hidrogenotróficos. En la metanogénesis acetoclástica el precursor es el ácido acético y aporta la mayor proporción de metano (70 %) (Khanal, 2008). La metanogénesis hidrogenotrófica emplea hidrógeno como donador de electrones y dióxido de carbono como aceptor de electrones. Por otro lado, las bacterias consumidoras de hidrógeno evitan su acumulación en el sistema y evitan el aumento de su presión parcial, la cual es una causa de inhibición (Mata-Álvarez, 2002). La metanogénesis es un paso crítico en la digestión anaerobia, ya que es la reacción bioquímica más lenta del proceso (Al Seadi *et al.*, 2008).

3.1.2 Microbiología de la digestión anaerobia

En la descomposición anaerobia de los residuos, algunos microorganismos trabajan juntos para llevar a cabo la conversión de complejos orgánicos. Los microorganismos que llevan a cabo las biorreacciones de degradación difieren mucho en cuanto a fisiología, cinética de crecimiento,

necesidades nutricionales, etc. En este proceso participan principalmente dos grupos de microorganismos, los productores de ácidos (fermentadores) y los formadores de metano (metanógenos) (Tabla 3.2). En el primer grupo se ubican las bacterias fermentadoras, acetogénicas (productoras obligadas de hidrógeno) y las homoacetogénicas (consumidoras de hidrógeno). El segundo grupo de microorganismos lo conforman las arqueas metanogénicas acetoclásticas e hidrogenotróficas. Estos dos grupos de microorganismos podrían separarse físicamente con la intención de aprovechar sus diferencias en la cinética de crecimiento (Adekunle & Okolie, 2015).

Tabla 3.2: Ejemplos de bacterias y arqueas en la digestión anaerobia (Lorenzo & Obaya, 2005).

Bacterias aisladas en un reactor anaerobio		
Fase fermentativa	Fase metanogénica	
<u>Facultativos</u>	<u>Anaerobios</u>	<u>Anaerobios</u>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Methanobacterium</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Methanococcus</i>
<i>Actinomyces</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Methanospirillum</i>
<i>Vibrio</i>	<i>Sphaerophorus</i>	<i>Methanobrevibacter</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Fusobacterium</i>	<i>Methanomicrobium</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Veillonella</i>	
<i>Micrococcus</i>	<i>Peptococcus</i>	
<i>Pseudomonas</i>	<i>Desulfovibrio</i>	
<i>Alcaligenes</i>		
<i>Sarcina</i>		
<i>Aerobacter</i>		

Bacterias acidogénicas

Estas bacterias pueden ser facultativas y/o anaerobias. Aquellas que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* han sido identificadas como fermentadoras activas (Manyi-Loh *et al.*, 2013). Algunas especies encontradas en digestores anaerobios transforman los aminoácidos en ácidos grasos, acetato y amoníaco. Otras especies convierten los azúcares en productos intermedios de fermentación (Stronach *et al.*, 1986). La ruta preferida por las bacterias acidogénicas es la producción de ácido acético, pues proporciona el mayor rendimiento energético para el crecimiento. Sin embargo, a medida que aumenta la presión parcial de hidrógeno, el proceso que permite la conversión de piruvato en acetato se vuelve energéticamente desfavorable. Por lo tanto, las rutas metabólicas cambian para producir AGV

más reducidos que el ácido acético, como el ácido propiónico y el butírico. El piruvato es a menudo el intermediario fundamental que se puede convertir en acetato, propionato, butirato, lactato, propanol, butanol, hidrógeno y dióxido de carbono (Nagarajan *et al.*, 2022).

Bacterias acetogénicas productoras de hidrógeno

Estas bacterias crecen en asociación sintrófica con los organismos metanogénicos hidrogenotróficos. Como se comentó con anterioridad, la acetogénesis se ve favorecida cuando los metanógenos o microorganismos sulfato-reductores, consumen hidrógeno, manteniendo baja la presión parcial de hidrógeno en el sistema a través de la transferencia de hidrógeno entre especies. La liberación de hidrógeno molecular durante la acetogénesis de ácidos grasos o de otros metabolitos reducidos puede ocurrir solo cuando no se acumula hidrógeno, por razones termodinámicas. En el rumen y en los digestores de lodos de depuradora, la concentración de hidrógeno puede disminuir mediante la formación de acetato a partir de dióxido de carbono e hidrógeno (Jördening & Winter, 2005).

Bacterias homoacetogénicas

Son microorganismos anaerobios de vital importancia para la formación de acetato a partir de hidrógeno y dióxido de carbono. Este producto final es un importante precursor de la generación de metano. Podemos encontrar en este proceso tanto bacterias autótrofas como heterótrofas. Las autótrofas para producir acetato emplean una mezcla de hidrógeno, dióxido de carbono y en algunos casos monóxido de carbono. Las segundas usan sustratos orgánicos como formiato y metanol (Jördening & Winter, 2005). En ausencia de aceptores de electrones inorgánicos distintos del carbonato, las arqueas metanogénicas y estas bacterias homoacetogénicas son los organismos principales consumidores de hidrógeno. El resultado de esta competencia por el hidrógeno influye en el flujo de carbono y electrones de manera que se produce metano o acetato, respectivamente (Kotsyurbenko *et al.*, 2001).

Arqueas acetoclásticas e hidrogenotróficas

El comportamiento de estos microorganismos ha sido investigado ampliamente durante el tratamiento anaerobio monofásico convencional y procesos de dos etapas para el tratamiento de sustratos solubles simples, mayormente sintéticos, aunque también en aguas residuales industriales de composición compleja. Sin embargo, cuando se trata sobre metanogénesis

anaerobia de biomasa sólida particulada para la producción de biogás, la literatura es escasa (Demirel & Scherer, 2008).

Metanogénicas acetoclásticas

Contribuyen con la mayor parte del metano generado (60-70 %) en el proceso de DA (Henze *et al.*, 2008). Los metanógenos acetoclásticos pueden competir con las bacterias oxidantes del acetato. Las bacterias oxidantes de acetato son capaces de convertir el acetato en $H_2 + CO_2$ o también pueden usar la reacción inversa para producir acetato. A altas concentraciones de hidrógeno, por ejemplo ≥ 500 Pa, se favorece la acetogénesis (o la metanogénesis a partir de $H_2 + CO_2$) y, a bajas concentraciones, por ejemplo ≤ 40 Pa), ocurre la oxidación del acetato (Schink, 1994).

Metanogénicas hidrogenotróficas

Consumen el hidrógeno y el dióxido de carbono y tienen un tiempo de duplicación que varía de 4 a 12 horas. Estas arqueas utilizan el hidrógeno como aceptor de electrones para la formación de metano; mientras varias arqueas que usan hidrógeno pueden también emplear formiato como donante de electrones para la reducción de dióxido de carbono y metano (Boone, 1993).

3.1.3 Termodinámica de la digestión anaerobia

Las relaciones entre los microorganismos en la DA son complejas y cada interacción es esencial para el bienestar de todo el proceso (Hinds, 2015). Un ejemplo de esta complejidad microbiana se representa en las relaciones sintróficas entre microorganismos, en la cual un organismo es dependiente de la actividad del otro. La asociación entre las bacterias acetogénicas productoras de hidrógeno y las arqueas metanogénicas hidrogenotróficas, descritas anteriormente, establecen dicha relación sintrófica (Gerardi, 2003). Usualmente, resulta difícil alcanzar este equilibrio, lo que conduce al bajo rendimiento en la producción de metano (Demirel & Yenigün, 2002).

La termodinámica juega un papel importante en la degradación de varios compuestos orgánicos. Todas las reacciones de oxidación-reducción se pueden describir en términos termodinámicos con sus respectivos valores de variación de energía libre de Gibbs (Tabla 3.3) (Azbar *et al.*, 2001). La reacción global es favorable solo si el cambio neto de energía libre tiene un valor negativo, de lo contrario la reacción no se considera favorable en condiciones estándar, y se

requerirá energía adicional para que las reacciones se produzcan (Henze et al., 2008). Para un sistema como el del presente trabajo, donde la temperatura y presión son constantes, la energía libre de Gibbs se puede determinar además en función de los cambios de entalpía y entropía. Los compuestos grandes suelen ser más difíciles de degradarse que los compuestos pequeños, la facilidad de degradación puede estar relacionada con la ruta metabólica que sigue el sustrato en cuestión. Los valores de la Tabla 3.3 muestran el cambio de energía libre de Gibbs para intermediarios (propionato, acetato, butirato, lactato y etanol) partiendo de glucosa. Las reacciones representadas indican que estos intermediarios producidos se convierten en ácido acético para finalmente producir metano. El mayor cambio de energía libre lo presenta la conversión de glucosa en propionato, si es comparado con el resto de los intermediarios. Aunque contradictoriamente, el propionato presenta la mayor dificultad en la conversión posterior a acetato e hidrógeno. Además, la conversión de propionato es más sensible a la presión parcial, mientras que la conversión de butirato, etanol y lactato son más tolerantes a aumentos de presión parcial de hidrógeno. La acumulación de hidrógeno disuelto hace que las reacciones acetogénicas sean termodinámicamente desfavorables provocando la acumulación de AGV, una posterior disminución del pH y finalmente inhibición de la metanogénesis. Asimismo, la Tabla 3.3 muestra que las reacciones acetogénicas termodinámicamente desfavorables; no se desarrollarán bajo condiciones estándares.

Tabla 3.3: Energías libres de Gibbs para reacciones de la DA (Azbar *et al.*, 2001).

Reacción	ΔG (kJ/mol)
<i>Reacción global</i>	
$C_6H_{12}O_6 + 3H_2O \rightarrow 3CH_4 + 3HCO_3^- + 3H^+$	-404
<i>Acetato como intermediario</i>	
$C_6H_{12}O_6 + 4H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + 2HCO_3^- + 4H^+ + 4H_2$	-206
$2CH_3COO^- + 2H_2O \rightarrow 2CH_4 + 2HCO_3^-$	-62
<i>Etanol como intermediario</i>	
$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 2C_2H_5COH + 2HCO_3^- + 2H^+$	-226
$2C_2H_5COH + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + 2H^+ + 4H_2$	+19
$C_2H_5COH + H_2O \rightarrow CH_3COO^- + 2H_2 + H^+$	+9.6
<i>Lactato como intermediario</i>	
$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3CHCOO^- + 2H^+$	-198
$2CH_3CHCOO^- \rightarrow 2CH_3COO^- + 2HCO_3^- + 2H^+ + 4H_2$	-8.4
$3CH_3CHCOO^- \rightarrow 2CH_3CH_2COO^- + CH_3COO^- + HCO_3^- + H^+$	-165
$2CH_3CHCOO^- + 2H_2O \rightarrow 2CH_3CH_2CH_2COO^- + 2HCO_3^- + 2H_2$	-56

<i>Butirato como intermediario</i>	
$C_6H_{12}O_6 + 2H_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COO^- + 2HCO_3^- + 3H^+ + 2H_2$	-255
$CH_3CH_2CH_2COO^- + 2H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + H^+ + 2H_2$	+48
<i>Propionato como intermediario</i>	
$C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \rightarrow 2CH_3CH_2COO^- + 2H_2O + 2H^+$	-358
$2CH_3CH_2COO^- + 6H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + 2HCO_3^- + 2H^+ + 6H_2$	+152
<i>Metanol como intermediario</i>	
$8CH_3OH + 4HCO_3^- \rightarrow 6CH_3COO^- + 2H^+ + 12H_2O$	
<i>Metanización directa</i>	
$4CH_3OH \rightarrow 3CH_4 + HCO_3^- + H^+ + H_2O$	
<i>Metanización por acetato</i>	
$2CH_3COO^- + 2H_2O \rightarrow 2CH_4 + 2HCO_3^-$	-62
<i>Metanización por hidrógeno</i>	
$4H_2 + HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_4 + 3H_2O$	-136

3.2 Procesos anaerobios por etapas

El sistema más simplificado es la digestión anaerobia en una sola etapa, donde se busca que los cuatro procesos biológicos consecutivos de hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis, ocurran en un único reactor (Aslanzadeh *et al.*, 2014).

Sin embargo, las características de crecimiento microbiano difieren dentro de estas etapas de la digestión. En un sistema convencional de digestión se hace muy complejo mantener el equilibrio del crecimiento microbiano durante un proceso con una carga orgánica elevada (Aslanzadeh *et al.*, 2014). La hidrólisis y la acidogénesis son desarrolladas por organismos anaerobios facultativos con un tiempo de duplicación mínimo corto de 30 min y un pH óptimo de entre 5.5 y 6.5 (Ramos-Suárez *et al.*, 2015; Mao *et al.*, 2015). Mientras que los microorganismos que realizan los pasos siguientes de acetogénesis y metanogénesis son estrictos anaerobios con un tiempo de duplicación mínimo largo (varios días) y un pH óptimo de entre 7 y 8 (Van *et al.*, 2019; Ramos-Suárez *et al.*, 2015). Además, estos microorganismos estrictos anaerobios son sensibles frente a la producción de ácidos grasos volátiles durante la acidogénesis (etapa previa).

Por las razones anteriores surge la propuesta de desarrollar una DA multietapas, específicamente de dos etapas, la cual separa el primer paso (hidrólisis/acidogénesis) del segundo paso (acetogénesis/metanogénesis), en dos reactores diferentes para optimizar cada paso en la digestión. Al implementar esta configuración en el proceso de DA, el sistema logra una operación más estable, puede aceptar una carga orgánica (CO) superior y ofrecer una elevada

resistencia frente a sustancias tóxicas e inhibitorias (Van *et al.*, 2019; Aslanzadeh *et al.*, 2014; Trzcinski & David, 2017). Sin embargo, la tecnología actual para DA en dos etapas demanda elevados costos de inversión y operación, por lo que aún son preferidos a escala industrial los sistemas convencionales (David, 2017). Las comparaciones son necesarias entre ambas configuraciones del proceso de DA pues guían el camino hacia el futuro desarrollo tecnológico.

En el estudio de Aslanzadeh *et al.* (2014) se desarrolló la DA con residuos alimentarios y fracción orgánica de los residuos sólidos municipales (FORSU). Según sus resultados, un sistema convencional de digestión (un único reactor), no podía manejar una CO de más de 2 a 3 gvs/L·d. Mientras que un sistema de dos etapas con un rango superior de entre 8 y 12 gvs/L·d y un tiempo de retención más bajo, funcionaba correctamente. Xiao *et al.* (2018) observaron en su investigación que el rendimiento del sistema convencional fue menor comparado con el sistema de dos etapas, aunque los valores son distantes por menos de 100 ml/ g_VSañadido. No fueron encontradas diferencias notables en la valorización energética global entre ambas configuraciones para los residuos de mercado, en el trabajo de Schievano *et al.* (2012). Sin embargo, eran considerablemente diferentes las comunidades microbianas bacterianas y arqueales en ambos sistemas. Además, se observó una mayor cantidad de bacterias en el sistema convencional. El estudio de Pham Van *et al.* (2020) concluye que fue mucho más elevada la proporción de conversión de carbono en el sistema de dos etapas, además la cinética de la metanogénesis también fue más rápida. El sistema de digestión convencional produjo un contenido de metano inferior. En el sistema de dos etapas se hidrolizó una gran cantidad de carbono al inicio, pero no se pudo convertir en biogás, ocasionando una pérdida de energía significativa. Otras investigaciones como las de Massey & Pohland (1978), Ghosh & Klass (1978), Cohen *et al.* (1980) y Anderson *et al.* (1994) demostraron un mejor rendimiento con la implementación de fases en comparación con un proceso de una sola etapa.

3.3 Fermentación como primera etapa de digestión

Con el objetivo de proporcionar condiciones ambientales óptimas para cada grupo de microorganismos Pohland & Ghosh (1971) describieron un procedimiento para separar la etapa acidogénica de la etapa metanogénica usando dos reactores. En este procedimiento, la primera etapa enfrenta la formación de ácidos grasos volátiles, mientras que la conversión de estos ácidos grasos volátiles a metano y dióxido de carbono tiene lugar en la segunda fase (Ueno *et*

al., 2007; Azbar & Speece, 2001). A continuación, fraccionaremos el estudio de la fermentación y la metanización, pues nuestra investigación se fundamenta en el hecho de que una digestión anaerobia en dos etapas aportará un mayor beneficio a la DA de residuos del cacao.

3.3.1 Fermentación alcohólica

Este es el tipo de fermentación más antiguo y conocido pues fue ampliamente empleado como estrategia para la conservación de alimentos. La fermentación de alimentos tiene cuatro propósitos principales: el desarrollo de una diversidad de sabores, aromas y texturas; la conservación mediante el desarrollo de ácido láctico, alcohol y ácido acético; el enriquecimiento biológico de los alimentos con proteínas, aminoácidos esenciales, y vitaminas; y la eliminación de “antinutrientes” (Buratti & Benedetti, 2016).

La fermentación alcohólica es un proceso biológico que se desarrolla en ausencia de oxígeno e involucra varios procesos importantes de transformación, estabilización y conservación de sustratos ricos en azúcar (frutas, jugos de frutas y vegetales) (Ciani *et al.*, 2013) para obtener como productos finales etanol, dióxido de carbono y moléculas de ATP que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico (Vincent *et al.*, 2006) (Figura 3.2). Se lleva a cabo por levaduras y algunos hongos y bacterias.

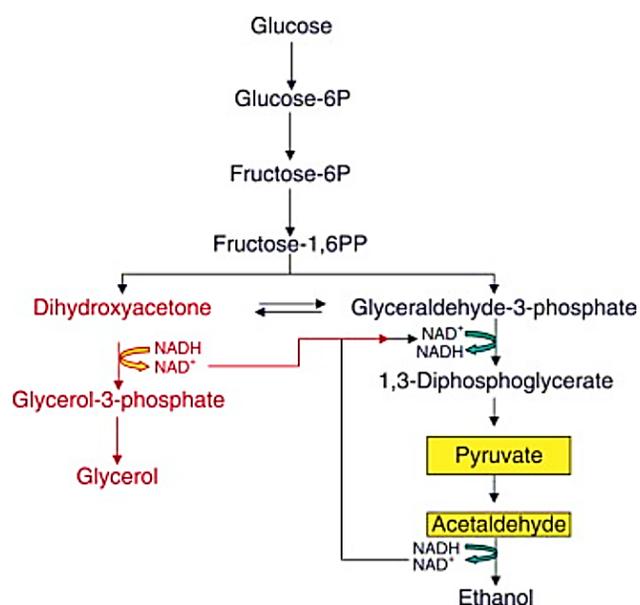


Figura 3.2: Fermentación alcohólica y desviación de fermentación alcohólica a glicero-pirúvica (Ciani *et al.*, 2013).

Por ejemplo, para el caso de las levaduras, en ausencia de oxígeno, esta fermentación ocurre en el citosol de la levadura (Sablayrolles, 2009; Stanbury *et al.*, 2013). La fermentación alcohólica

comienza con la descomposición de los azúcares por las levaduras para formar moléculas de piruvato, lo que también se conoce como glucólisis. La glucólisis de una molécula de glucosa produce dos moléculas de ácido pirúvico. Luego, las dos moléculas de ácido pirúvico se reducen a dos moléculas de etanol y dos de dióxido de carbono (Huang *et al.*, 2015). En condiciones anaerobias, el piruvato se puede transformar en etanol, donde primero se convierte en una molécula intermedia llamada acetaldehído que luego libera dióxido de carbono, y el acetaldehído se convierte en etanol. En la fermentación alcohólica, el aceptor de electrones NAD^+ se reduce para formar NADH. El intercambio de electrones que ocurre en el proceso ayuda a generar ATP (Malakar *et al.*, 2020).

3.3.2 Fermentación ácida

En secciones anteriores se conoció que el ácido acético es el metabolito directo de la metanización, por lo que las fermentaciones de este tipo son muy estudiadas con relación al efecto que tienen sobre el rendimiento del proceso metanogénico. Sin embargo, las fermentaciones ácidas comprenden los ácidos con un carbono (C1) hasta ácidos con C10 y sus formas -iso, por lo que comprenden al ácido acético, pero además a los ácidos propiónico, butírico, valérico, etc. (Strazzera *et al.*, 2018; Chang *et al.*, 2010).

Las fermentaciones ácidas tienen una ventaja sobre la fermentación etanólica cuando se presenta una fermentación con un sustrato no esterilizado donde existirá competencia por sustrato (Yin *et al.*, 2016). Por lo que la ruta metabólica que pueda tener un reactor dependerá de las condiciones de operación que se garanticen. La generación de ácidos grasos volátiles puede lograrse en escenarios con valores de pH de entre 5 y 8, pero dominarán las fermentaciones etanólicas o lácticas cuando se alcancen valores de pH de entre 4 y 6 (Atasoy *et al.*, 2019; Murali *et al.*, 2017; Yin *et al.*, 2016).

Al ácido acético se le ha nombrado como “uno de los productos químicos más importantes del mundo” debido a su uso generalizado en la fabricación de polímeros y solventes. Según las previsiones del mercado, para 2020 se estimaron ingresos superiores a los 12.2 billones de dólares. Existe también una demanda sobre el ácido butírico, ya que es utilizado en industrias cosméticas, alimentarias y farmacéuticas. El ácido butírico junto con otros AGV además puede emplearse como precursor de combustibles y productos químicos (Jones *et al.*, 2015). Adicionalmente, el ácido butírico ha sido utilizado en el tratamiento de hemoglobinopatías,

cáncer y enfermedades gastrointestinales, en anestésicos y antioxidantes debido a sus efectos anticancerígenos induciendo diferencias morfológicas y bioquímicas en una variedad de células (Dwidar *et al.*, 2012).

Generalmente una primera etapa fermentativa suele maximizar la producción de acetato y butirato, pues el acetato es metabolito directo para la metanización y el butirato en la acetogénesis se divide en dos moléculas de acetato, para ello un pH de alrededor de 6 permite que entre el 60 y 85 % de los metabolitos sean acetato y butirato (Atasoy *et al.*, 2019; García-Aguirre *et al.*, 2017; Zou *et al.*, 2019). Debido a que en la etapa posterior de metanización el propionato actúa como inhibidor, la generación de ácido propiónico se evita durante la etapa fermentativa. Al operar reactores con valores de pH de 7 y 8, se logran altas producciones de propionato y acetato, representando entre 60-80 % del total de metabolitos producidos (Edwiges *et al.*, 2020; Han *et al.*, 2020; Bhatia & Yang, 2017).

3.3.3 Fermentación láctica

La fermentación láctica se puede sintetizar por métodos químicos y catálisis enzimática (Maki-Arvela *et al.*, 2014). Este tipo de fermentación, comúnmente conocida como lacto-fermentación, es uno de los métodos más comunes y fáciles de conservación en el hogar.

Las bacterias del ácido láctico como *Lactobacillus spp.*, *Lactococos*, *Streptococcus thermophilus* y *Leuconostocs* son ejemplos de bacterias que tienen la capacidad de convertir azúcares en ácido láctico. *Lactobacillus spp* son las cepas ampliamente usadas en lugar de las levaduras, cianobacterias y otros microorganismos, ya que existen ampliamente en la naturaleza, se desarrollan y reproducen velozmente (Ilmén *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2015; Wee *et al.*, 2006). El ácido láctico se produce por vía de la glucólisis en condiciones anaerobias, y este compuesto se puede producir mediante rutas metabólicas a partir de las hexosas y pentosas presentes en las bacterias lácticas. El rendimiento de la producción de este ácido depende del pH (3.5 a 9.6), la temperatura (5–45 °C), la presencia de nutrientes (como aminoácidos, péptidos, nucleótidos y vitaminas) y las cepas de bacterias lácticas empleadas (Abedi & Hashemi, 2020).

En los trabajos de Tan *et al.* (2017) y Wang *et al.* (2014) se muestra la producción de ácido láctico por algunos microorganismos procariontes, al igual que por algunos hongos y microalgas eucarióticos. Un problema asociado al uso de bacterias para la producción de ácido láctico es su baja sensibilidad al pH, lo que conduce al uso de grandes cantidades de agentes neutralizantes,

incluyendo CaCO_3 (van Maris *et al.*, 2004). Al comparar el uso de las levaduras frente a las bacterias, las levaduras pueden tolerar un pH bajo, por lo que no existe necesidad de agentes neutralizantes. Una desventaja importante de usar las levaduras de tipo “salvaje” es que la producción de ácido láctico como producto principal se reduce. Sin embargo, las levaduras pueden ser modificadas para evadir este inconveniente (Abedi & Hashemi, 2020).

Los residuos de alimentos son un excelente sustrato para la producción de ácido láctico pues contienen gran cantidad de polisacáridos. En los estudios de Gu *et al.* (2018), Liang *et al.* (2016), Peinemann *et al.* (2019) y Panesar & Kaur (2015) se observa cómo se reducen los costos de producción al emplear residuos alimentarios, residuos agrícolas y otras materias primas poco costosas como sustratos para la producción de este ácido.

Este ácido inhibe el crecimiento de bacterias de otras especies potencialmente dañinas para los procesos u organismos. También crea condiciones favorables para la actividad de la levadura, una propiedad que se utiliza en la producción de vino y cerveza. La reacción química se describe como la siguiente: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow 2\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3 + 2\text{CO}_2 + 2\text{ATP}$ Glucosa (ácido láctico + dióxido de carbono + energía) (Malo & Urquhart, 2016).

3.4 Metanización como segunda etapa de digestión

La metanogénesis es un metabolismo anaerobio responsable de la generación de más del 90 % del metano que se forma hoy en la Tierra, con implicaciones importantes para la producción de combustibles y el calentamiento global (Costa & Leigh, 2014). Se conocen tres rutas metabólicas principales (Ferry & Kastead, 2007; Conrad, 2009): hidrogenotrófica (A), metilotrófica (B) y acetoclástica (C), cada una resulta en la formación de un grupo metil (Figura 3.3). La enzima metil-coenzima-M reductasa (Mcr) es la única presente en todos los tipos de metanogénesis (Thauer *et al.*, 2008; Hedderich & Whitman, 2013; Liu & Whitman, 2008). La reducción de dióxido de carbono por hidrógeno es la reacción más favorable energéticamente hablando, la menos favorable es la fermentación de acetato (Tabla 3.4).

La metanogénesis hidrogenotrófica es la vía más común (Thauer *et al.*, 2008) y quizás represente la forma ancestral de producción de metano (Baptiste *et al.*, 2005). Las arqueas metanógenas que se agrupan en la clase I (*Methanopyrales*, *Methanococcales*, *Methanobacteriales*) y clase II (*Methanomicrobiales*, *Methanocellales*, *Methanosarcinales*, con excepción de *Methanomassiliicoccales*) son hidrogenotróficas. Estas arqueas reducen dióxido de carbono a

metano en seis pasos a través de la vía reductora de acetyl-CoA o WLP (Wood–Ljungdahl Pathway, en inglés), el cual es uno de los procesos más importantes para la generación de energía y la fijación de carbono (Berg *et al.*, 2010).

Tabla 3.4: Energía libre de Gibbs para las reacciones metanogénicas más comunes (Hedderich & Whitman, 2013).

Reacción	ΔG (kJ/mol de CH ₄)
<i>Tipo 1</i>	
$CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$	-130
$4HCOOH \rightarrow CH_4 + 3CO_2 + 2H_2O$	-120
$CO_2 + 4(isopropanol) \rightarrow CH_4 + 4(acetona) + 2H_2O$	-37
<i>Tipo 2</i>	
$CH_3OH + H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$	-113
$4CH_3OH \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2H_2O$	-103
$4CH_3NH_3Cl + 2H_2O \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 4NH_4Cl$	-74
$2(CH_3)_2S + 2H_2O \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2H_2S$	-49
<i>Tipo 3</i>	
$CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2$	-33

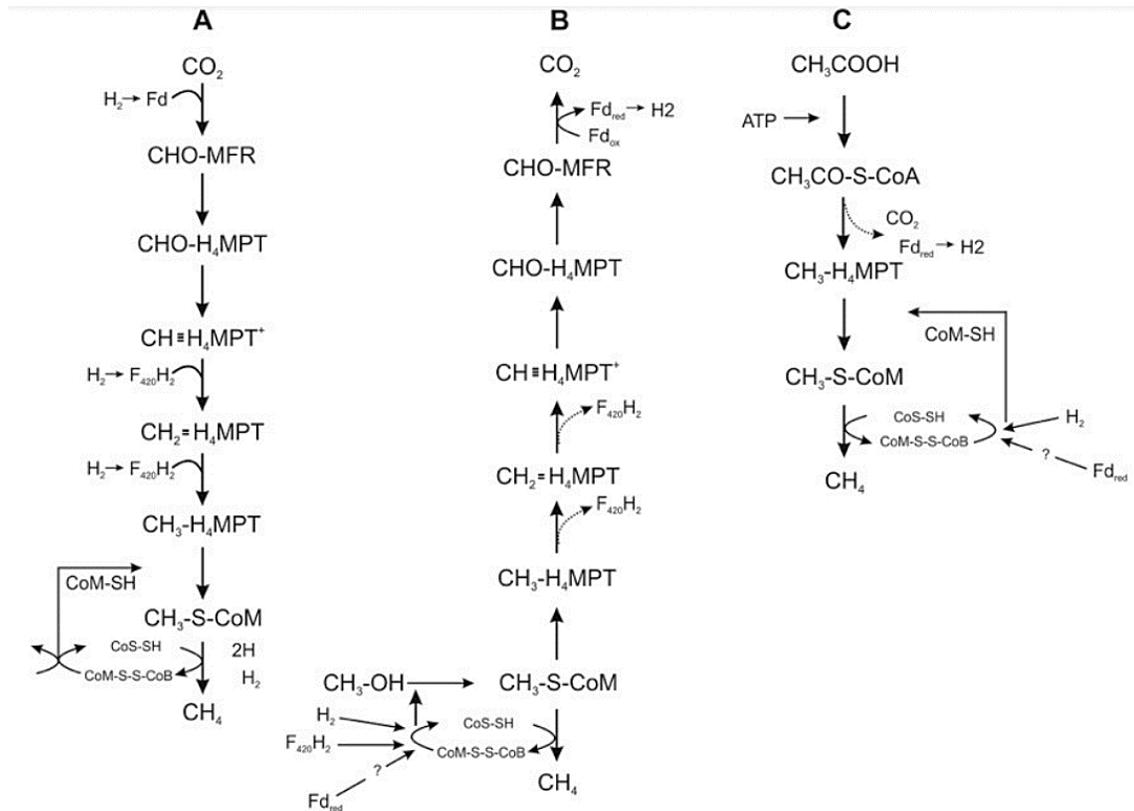


Figura 3.3: Metanogénesis a partir de H₂/CO₂ (A), metanol (B), acetato (C) (Hedderich & Whitman, 2013).

Otras arqueas hidrogenotróficas usan el formiato como donador de electrones, donde cuatro moléculas de formiato se oxidan a dióxido de carbono antes de que una molécula de dióxido de carbono sea reducida a metano. Para conservar energía, los hidrogenotróficos acoplan la vía WLP a la metanogénesis. Este acoplamiento lo establece la coenzima M-metiltransferasa (Mtr), que transfiere el grupo metilo de la ruta metabólica WLP a la coenzima M. Mtr usa la energía libre de la transferencia de metilo para establecer un fuerza motriz- Na^+ a través de la membrana. Luego la metil-coenzima M reductasa se reduce a metano, empleando la coenzima B como donador de electrones (Schlegel & Müller, 2013). Los *Bathyarchaeota*, *Verstraetearchaeota* y *Methano-massiliicoccales* son, junto con algunos *Methanobacteriales* y *Metanosarcinales*, metanógenos metilotróficos. En esta ruta los compuestos de un carbono metilados, incluidos el metanol, las metil-aminas y los sulfuros de metilo se activan primero mediante metiltransferasas específicas (Lang *et al.*, 2015). Para la reducción de los grupos metilo a metano los electrones se obtienen de la oxidación de grupos metilos adicionales a dióxido de carbono (contrario a la ruta anterior descrita). En la metanogénesis acetoclástica el enlace C-C del acetato se rompe para generar un grupo metilo y uno carbonilo. El primer grupo, se reduce a metano mediante electrones resultantes de la oxidación del segundo grupo a dióxido de carbono. En una reacción catalizada por una cinasa acetato y fosfotransacetilasa *Methanosarcina* sp. Convierte en acetil-CoA al acetato, para ser activado antes del rompimiento del enlace C-C (Lessner, 2009).

La metanización generalmente funciona en un rango de temperatura de 35 a 70 °C y presiones de 1 a 15 bar. Una buena metanización depende de las concentraciones relativas de etanol, ácido acético y ácido láctico. La producción de metano es mejor cuando se provocan fermentaciones selectivas a etanol y ácido acético (Jojoa-Unigarro & González-Martínez, 2021).

3.5 Digestión anaerobia de los residuos del cacao

Existen disímiles procesos para obtener subproductos y/o recuperar energía a partir de la cáscara, mucílago y cascarilla de cacao. Procesos termoquímicos como la combustión directa, la gasificación y la pirólisis (Syamsiro *et al.*, 2012); procesos para elaboración de compostaje, vermicompostaje, bebidas alcohólicas y de alimentos para animales; procesos bioquímicos como la digestión anaerobia y la fermentación alcohólica, entre otros.

Como ha sido detallado en el Capítulo 2, la cáscara de cacao tiene una composición química baja en proteínas, pero rica en fibras, carbohidratos, lípidos y materiales fermentables para la

acción de microorganismos; todos estos componentes son de gran importancia para la generación de biogás y metano (Sánchez, 2013). El contenido de K_2O hace que la mazorca consiga ser aprovechada como fertilizante y/o en procesos termoquímicos de gasificación (Vivanco *et al.*, 2018).

Varios estudios discuten la utilización del mucílago y la mazorca de cacao para la generación de biogás; otorgándole además un uso al sustrato biodigerido que queda como residuo de este proceso. El sustrato biodigerido es generalmente aplicado en los sistemas de producción agrícola con fines fertilizantes, para así reducir el uso de la fertilización de origen sintético (Carrillo & Valenzuela, 2015).

La presencia de minerales menores en los sustratos ayuda en el proceso de digestión, actuando como micronutrientes o suplementos esenciales para las bacterias metanogénicas. Sin embargo, se ha reportado que la presencia de metales pesados como mercurio, cromo y cadmio inhiben bastante el proceso de digestión por el “envenenamiento” de la bacteria (Abdel & Mansour, 2014; Mudhoo & Kumar, 2013). Es posible identificar la presencia de elementos menores como cobalto, cobre, manganeso, molibdeno, níquel, antimonio y zinc en los residuos del cacao en diferentes concentraciones. Estos elementos sirven como micronutrientes para el proceso de digestión anaerobia no haciendo especialmente necesaria, la suplementación externa de micronutrientes para el proceso de digestión.

Martínez-Ángel *et al.* (2015) evaluaron tres muestras de cáscaras de mazorcas de cacao como fuente de energía renovable para los procesos termoquímicos de pirólisis, gasificación y combustión. Las cáscaras contenían niveles relativamente similares de C, H y O, sin embargo, el contenido de cenizas encontrado fue heterogéneo. Se identificó un elevado contenido de K_2O en la ceniza, por lo que la pirólisis presentó una serie de obstáculos y dificultades técnicas a causa de la aparición de fenómenos de sintetizado y aglomeración. Por lo que la gasificación y la combustión se consideraron como procesos termoquímicos con mayores posibilidades para la valorización energética.

En una evaluación tecno-económica de cinco tecnologías de tratamiento, Syamsiro *et al.* (2012) concluyen que el alto contenido de potasa en la cáscara convierte a este residuo en un combustible inadecuado para llevar a cabo la combustión directa. Del mismo modo, Thomsen *et al.* (2015) al evaluar el potencial de once residuos agrícolas provenientes de África Occidental

para la producción de bioetanol, no incluían a las mazorcas de cacao en los cuatro finales que consideraron con un enorme potencial de bioetanol.

Maleka (2016) concluye que las tecnologías de tratamiento más eficaces para la valorización de los residuos del cacao, específicamente de las mazorcas, son la fermentación anaerobia y la carbonización hidrotermal. Estudios como los de Kemausuor *et al.* (2014) y Thomsen *et al.* (2014) sobre la fermentación anaerobia de mazorcas de cacao provenientes de África Occidental, se limitaron a la estimación teórica del potencial de biometano mediante el uso de las ecuaciones de Buswell y de la demanda química de oxígeno.

3.5.1 Potenciales de metano de las mazorcas

En el estudio realizado por Antwi *et al.* (2019), las mazorcas de cacao ensayadas presentaron un potencial teórico de biogás de aproximadamente 922 L/kg_{SV}, con un contenido de biometano de aproximadamente el 51 %. Este valor es mucho más elevado que el obtenido por Thomsen *et al.* (2014a) empleando la ecuación de Buswell, pero similar al resultado de Thomsen *et al.* (2014b) usando las ecuaciones de demanda química de oxígeno. Comparando el potencial de biometano teórico de las mazorcas de cacao con otros residuos, el potencial de las mazorcas es semejante al de los residuos de alimentos domésticos, residuos de parques ciudadanos, algas marinas y ensilaje de maíz. Esto implica que las mazorcas de cacao deben ser consideradas seriamente como biomasa viable en los procesos de digestión anaerobia (Allen *et al.*, 2016).

3.5.2 Dificultades en la DA de las mazorcas de cacao

Aunque es preferida la valorización de estos residuos a través de la digestión anaerobia, la hidrólisis del residuo durante la fermentación es un paso potencialmente limitante debido a la compleja estructura lignocelulósica de las mazorcas.

Los resultados obtenidos por Antwi *et al.* (2019) muestran un bajo índice de biodegradabilidad (fracción del sustrato que puede ser biodegradada), obteniendo valores de producción de biogás de 374.5 L/kg_{SV} (representando el 41 % del rendimiento teórico) y 432.5 L/kg_{SV} (representando el 47 % del rendimiento teórico), en reactores de 500 ml y 30 L, respectivamente. La principal causa de estos bajos valores es el elevado contenido de lignina del residuo que hace que se una eficazmente a la hemicelulosa y la celulosa, lo que dificulta el acceso a las bacterias anaerobias, efecto también corroborado por Grimaldi *et al.* (2015) y Thomsen *et al.* (2014b).

El relativamente bajo índice de biodegradabilidad es una confirmación de la inconveniencia de la presencia de las fibras lignocelulósicas en la digestión anaerobia. Por ello, se hace necesaria una fermentación previa a la metanización con el fin de optimizar la hidrólisis para mejorar la biodegradabilidad de las mazorcas de cacao. El tratamiento de las mazorcas de cacao para hidrolizar la celulosa y la hemicelulosa y, modificar la estructura de la lignina para hacerla más accesible a las bacterias presentes, mejora la producción de biogás como señalan varios autores que aplican pretratamientos a otros sustratos con contenido similar de carbohidratos estructurales (Kim *et al.*, 2016; Kwietniewska & Tys, 2014; Rodríguez *et al.*, 2015). La compleja y diversa composición química de la lignina puede ser degradada por algunas especies microbianas en monómeros de lignina más simples, formándose compuestos aromáticos que, después de un procesamiento microbiano adicional, podrían emplearse en procesos de fermentación microbiana (Iram *et al.*, 2021).

CAPÍTULO 4. METODOLOGÍA

La metodología descrita a continuación está orientada a determinar el potencial de la cáscara del cacao, como sustrato para la producción de metano por digestión anaerobia en dos etapas, a nivel de laboratorio.

Para el cumplimiento de los objetivos de la investigación se desarrolla una estrategia en tres etapas (Figura 4.1):

La **Etapa I** corresponde a la obtención, preparación y caracterización de los residuos del procesamiento agrícola del cacao. El objetivo de esta etapa es, además de la obtención del sustrato de trabajo y su preparación para la posterior fermentación, determinar las características fisicoquímicas y bromatológicas de la cáscara de la mazorca del cacao.

En la **Etapa II**, el trabajo experimental está dirigido al desarrollo de una fermentación anaerobia en presencia de los microorganismos autóctonos de la cáscara de cacao triturada. La fermentación se lleva a cabo en un reactor de vidrio operando en semicontinuo, sin control de pH y bajo una temperatura de 35 °C, con el fin de mejorar la posterior producción de metano.

En la **Etapa III** se desarrolla la metanización tanto de las cáscaras trituradas como de las cáscaras previamente trituradas y fermentadas. Para ello, se emplea un buffer de fosfatos para el control del pH, una solución de micronutrientes para garantizar la presencia de minerales y un inóculo que en este caso son gránulos anaerobios provenientes de un reactor UASB de una compañía cervecera de la Ciudad de México. El objetivo de esta Etapa es, determinar la efectividad de un proceso en dos etapas (fermentación y metanización) para el incremento en la producción de metano, empleando la cáscara de cacao como sustrato. Se evalúa, además, la variación en la concentración de sustrato, manteniendo constante la masa de inóculo con el fin

de establecer las mejores condiciones para lograr la mayor eficiencia en la producción de metano a partir de las cáscaras trituradas y fermentadas y de las cáscaras únicamente trituradas.

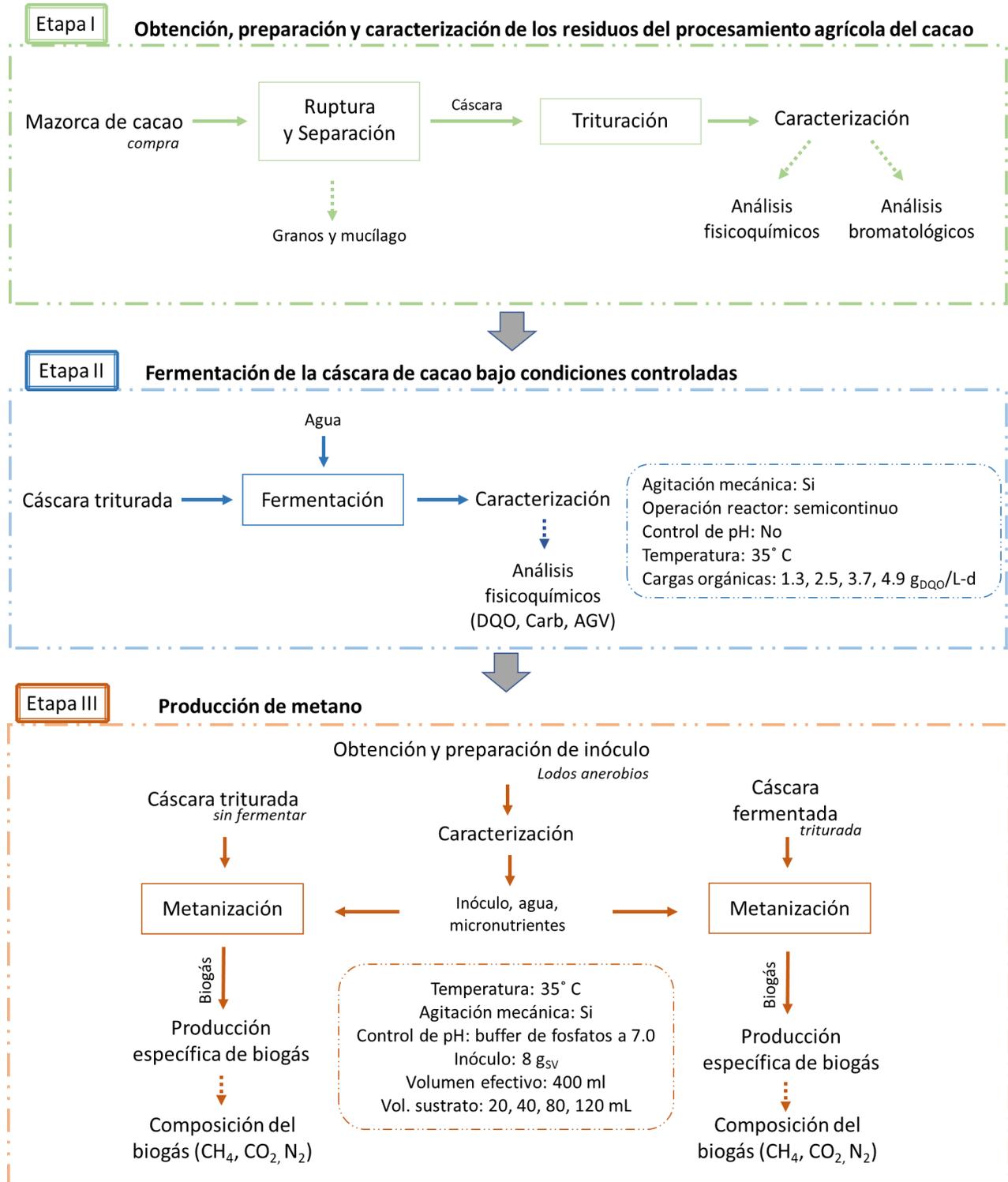


Figura 4.1: Diagrama de metodología general.

4.1 Obtención, preparación y caracterización de los residuos del procesamiento agrícola del cacao

Para la obtención de las muestras se realizó la compra de mazorcas enteras de cacao en estado de madurez, buscando una aproximación al estado real de la mazorca cuando pasa a ser considerada residuo en el procesamiento agrícola del propio fruto. Las mazorcas obtenidas provienen de regiones tropicales mexicanas, específicamente de Chiapas, entidad federativa ubicada al sur, limitante con Guatemala. Este estado presenta un clima cálido húmedo en más de la mitad de su territorio (54 %), condiciones apropiadas para el cultivo de este fruto. A pesar de que en México se cosechan las tres variedades principales del cacao, se prefiere el trabajo con las mazorcas pertenecientes a la variedad *criollo*, por ser la que ofrece el fruto con mejor calidad para la elaboración de chocolates, por ende, la que pretende tener un mayor cultivo en las regiones del país.

Las mazorcas fueron cortadas y separadas sus partes (cáscara, granos y placenta) para cuantificación. Debido a la heterogeneidad de los frutos, el residuo “cáscara” (comprende el exocarpio, mesocarpio y endocarpio del fruto) fue cortado, extrudido y finalmente molido con el objetivo de reducir su tamaño de partícula, homogenizar la muestra y obtener resultados representativos (Figura 4.2). Las cáscaras fueron extrudidas empleando una extrusora marca Advance RH, con diámetro de orificio del cedazo de 8 mm. Posteriormente se empleó un molino de placas marca Nixtamatic, que cuenta con un motor de 1/3 HP de potencia, para proporcionar un tamaño de partícula de 0.5 mm. Una vez terminado este proceso, se colocaron las muestras en un recipiente para su mezclado manual y completa homogenización.

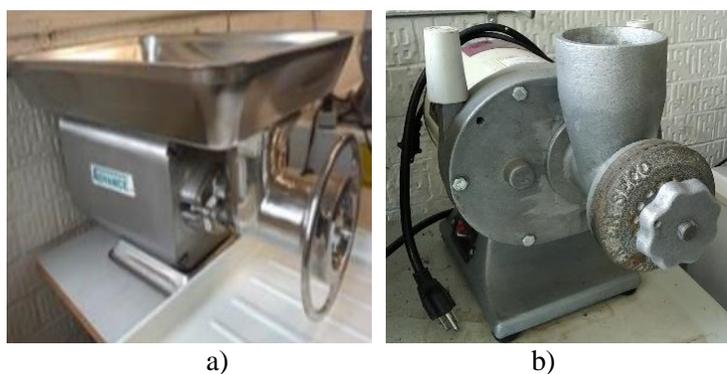


Figura 4.2: Equipos para la trituración de la cáscara de cacao. a) extrusora Advance RH, b) molino Nixtamatic)

Una parte de la muestra fue tomada para caracterización y el resto se conservó en congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ como sugiere (Kreuger *et al.*, 2011); en bolsas especiales, para su posterior uso. La caracterización de las cáscaras es esencial para obtener información acerca de la material biodegradable y no biodegradable; su contenido de sustancias orgánicas fermentables, parámetros básicos de su composición química, compuestos intermediarios y posibles inhibidores en la producción específica de metano. Los parámetros para la caracterización fueron: demanda química de oxígeno (DQO), % humedad, sólidos totales (STT), sólidos totales fijos (STF) y totales volátiles (STV), pH, carbohidratos totales (solubles, insolubles, azúcares, fibras), grasas y aceites y, contenidos de celulosa, hemicelulosa y lignina.

4.2 Fermentación de la cáscara de cacao bajo condiciones controladas

El objetivo de esta etapa fue monitorear el comportamiento de la hidrólisis de la cáscara, bajo condiciones controladas de temperatura y humedad en un reactor operando en semicontinuo. El proceso se realiza para determinar el tiempo en que se alcanza un estado estable durante la fermentación y buscando, además, la producción de metabolitos que potencien una mayor producción de metano posteriormente. La fermentación se desarrolló empleando un reactor de vidrio con un volumen de trabajo de 3.8 L (Figura 4.3). El reactor anaerobio tiene acoplado un sistema de agitación mecánica, ajustable con respecto a sentido y velocidad de agitación. También cuenta con una chaqueta externa para la circulación constante de agua a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ mediante un sistema automático. Este reactor se alimentó diariamente con cáscara de cacao molida a una concentración de $25\pm 2\text{ g}_{\text{DQO}}/\text{L}$ para todos los ensayos de las diferentes cargas orgánicas. El volumen de trabajo y la concentración en el reactor de fermentación no fueron modificados, por lo que se varió la carga orgánica (CO) en cuatro ocasiones por concepto de flujo de alimentación diaria, teniendo valores de alimentación de 200, 400, 600 y 800 ml/d, correspondiendo a las cargas orgánicas de 1.3, 2.6, 3.7 y 4.9 $\text{g}_{\text{DQO}}/\text{L}\cdot\text{d}$, respectivamente. La temperatura se mantuvo controlada y constante a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante los más de 150 días de fermentación, bajo agitación constante de 75 rpm y sin ajuste de pH. Para el monitoreo de la etapa se determinaron parámetros como pH, DQO total y soluble, sólidos, ácidos grasos volátiles, ácido láctico, alcoholes y carbohidratos totales y solubles. El grado de fermentación y grado de hidrólisis se calcularon a partir de las siguientes ecuaciones:

$$\%de\ ferment. = \frac{DQO_{met}}{DQO\ d.\ sist} * 100$$

Ecuación 1

$$\%de\ hidrol. = \frac{DQO\ d.\ efluente}{DQO\ t.\ influente} * 100$$

Ecuación 2



Figura 4.3: Dos vistas del reactor con chaqueta de temperatura para fermentación de las cáscaras de cacao trituradas.

4.3 Producción de metano

La etapa de metanización se realizó de acuerdo con las dos alternativas siguientes:

- Cáscaras sin previa fermentación: las cáscaras extrudidas y molidas en un molino de placas se alimentaron a los reactores metanogénicos discontinuos (Figura 4.4).
- Cáscaras fermentadas: las cáscaras previamente fermentadas bajo condiciones controladas de temperatura, concentración y humedad (ver Capítulo 4.4) se sometieron a metanización. Se emplearon diferentes volúmenes de sustrato fermentado (fracción sólida + fracción líquida) para desarrollar posteriores análisis cinéticos empleando el modelo de Michaelis y Menten.

Para determinar la producción de metano de la cáscara del cacao fermentada y sin fermentar, se realizaron ensayos en frascos de vidrio de 500 ml de capacidad máxima, con un volumen efectivo de 400 ml, bajo agitación continua de 110 rpm y 35 °C constantes de temperatura (intervalo mesofílico) (Figura 4.4). Cada lote de metanización contó con 6 frascos, cada uno

contenía 1 ml de solución de micronutrientes preparada de acuerdo con Campuzano y González-Martínez (2015), 100 ml de solución buffer de fosfatos a pH 7, una cantidad fija de inóculo de 8 g_{SV} y agua del grifo para alcanzar el volumen de reacción de 400 ml. Cuatro de cada seis frascos contenían sustrato (digestatos fermentados) en volúmenes de 20, 40, 80 y 120 ml, los dos frascos restantes del lote contenían inóculo como sustrato. Para garantizar condiciones anaerobias, al comenzar las pruebas, se realizó el desplazamiento del aire del espacio de cabeza de los frascos mediante N₂ durante 30 segundos.



Figura 4.4: Frascos, agitadores y sistema de calentamiento para la metanización de la cáscara de cacao fermentada y sin fermentar.

Inóculo

La puesta en funcionamiento de esta etapa requiere la utilización de una fuente de microorganismos (inóculo anaerobio), el cual fue lodo granular de un reactor UASB para el tratamiento de aguas residuales de la planta cervecera Grupo Modelo S.A. de C.V., ubicada en la Ciudad de México, la cual opera a 35 °C. El inóculo obtenido fue transportado y conservado a 4 °C en la cámara fría del Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería de la UNAM. El proceso de preparación del inóculo consistió en lavar y concentrar los gránulos mediante centrifugación a 3700 rpm por 10 minutos. Con estas centrifugaciones se removieron sustancias solubles remanentes buscando disminuir la producción de metano por sustancias ajenas a la cáscara de cacao. Al finalizar cada centrifugación se eliminó el sobrenadante y se reemplazó la misma cantidad con agua del grifo para eliminar la mayor cantidad de sustrato

disuelto remanente. Los parámetros para la caracterización del inóculo fueron: % humedad, pH y sólidos totales, fijos y volátiles.

Para medir la producción de biogás (metano) se empleó el Automatic Methane Potential Test System (AMPTS II) de la empresa Bioprocess Control, Suecia (Figura 4.5). Este sistema tiene capacidad para 15 reactores, cada uno con sistema de agitación individual. En este dispositivo los reactores se mantienen en un baño de agua con temperatura controlada a 35 °C. Los tapones de plástico utilizados para cerrar los frascos de reacción tienen una salida que conduce el biogás producido al contador. El contador es un recipiente con agua, en el cual hay 15 celdas calibradas a un volumen determinado (cada celda está conectada con la salida de un frasco por medio de una manguera de Tygon) y cuenta con sensores de temperatura y presión para normalizar el metano o el biogás cuantificado a 0 °C y 1 atm (NL=litros normalizados). El biogás generado desplaza el agua dentro de cada celda y, por fuerza boyante, la celda abre liberando el biogás a la atmósfera, y cada vez que la celda abre se envía una señal al software para cuantificar el volumen de biogás con respecto al tiempo.

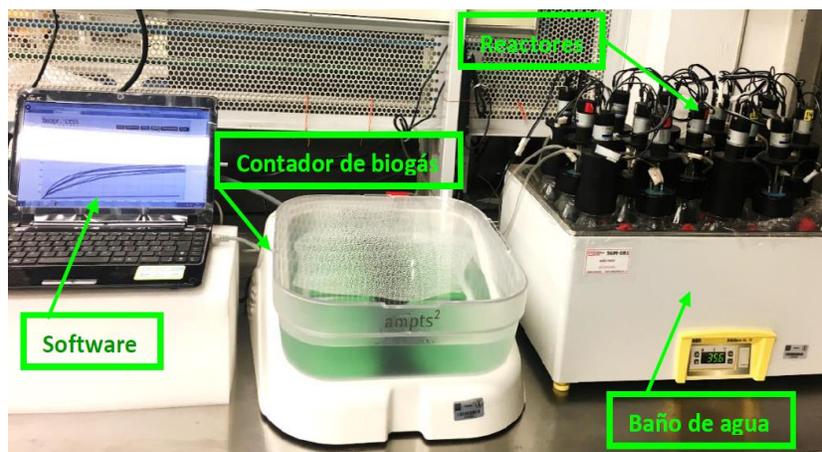


Figura 4.5: Sistema automático de prueba de potencial de metano (AMPTS II).

Diariamente, en un cromatógrafo de gases (Ver Tabla 4.1), el cual utiliza helio como gas de arrastre, se determinaron los contenidos de metano, dióxido de carbono y nitrógeno del biogás producido. Se usó una jeringa de 0.5 ml para la toma de muestra de cada reactor y su inyección en el cromatógrafo. Se calculó el volumen de metano producido en condiciones normalizadas (NL) por unidad de masa de sustrato. El resultado se expresó en términos de rendimiento de biogás, el cual se representa como volumen de biogás producido por cantidad de sustrato alimentado (NL/kg_{ST}) y como rendimiento de metano, que es la cantidad de metano producida

por cantidad de sustrato alimentado (NL_{CH_4}/kg_{ST}). La producción de biogás se consideró concluida cuando la pendiente de la curva cambia súbitamente y permanece sin cambios (Jojoa-Unigarro & González-Martínez, 2021).

4.4 Métodos analíticos

Los métodos para la caracterización y determinación de los parámetros evaluados durante la experimentación permitieron conocer las características de los residuos agrícolas del procesamiento del cacao y del inóculo y dar seguimiento en el arranque y operación de los reactores de fermentación y de metanización (Tabla 4.1). En las determinaciones de DQO, carbohidratos y, ácidos grasos volátiles y alcoholes, las muestras fueron tratadas como aguas residuales: se les añadió un volumen conocido de agua destilada para alcanzar las concentraciones requeridas por las diferentes determinaciones.

Tabla 4.1: Técnicas analíticas para la caracterización de la cáscara de cacao, identificación de productos de la fermentación y método para cuantificación de producción de metano.

Parámetro	Método y Principio
<i>pH</i>	APHA-4500-H ⁺ B. Medición con potenciómetro
<i>Sólidos totales</i>	APHA-2540 B. Gravimetría. Sólidos secados a una temperatura de 105 °C.
<i>Sólidos volátiles y fijos</i>	APHA-2540 E. Gravimetría. Contenido de sólidos de una muestra secada a 105 °C e incinerada a 550 °C.
<i>Humedad</i>	APHA-2540 B. Gravimetría. Se obtiene por diferencia entre el peso inicial de la muestra y los sólidos totales determinados. Se expresa en porcentaje.
<i>Demanda Química de Oxígeno</i>	APHA-5220 D. Fotometría. Digestión ácida por reflujo cerrado a 150 °C durante 2 horas. Lectura en espectrofotómetro a 600 nm.
<i>DQO (soluble)</i>	APHA-5220 D. Muestra previamente filtrada utilizando filtros de celulosa de 0.45 µm.
<i>Grasas y aceites</i>	APHA 5520 D. EPA 3540 C. AOAC 920.39 AOAC 954.02. Gravimetría. Extracción con solventes orgánicos (hexano) y posterior evaporación. Método Soxhlet.
<i>Hidratos de carbono</i>	Dubois <i>et al.</i> (1956). Fotometría. Método colorimétrico con fenol y ácido sulfúrico concentrado. Lectura en espectrofotómetro a 490 nm.
<i>Hemicelulosa, celulosa y lignina</i>	Van Soest (1967). Gravimetría. NDF-Fibra detergente neutra.

<i>Celulosa y lignina</i>	AOAC 973.18. Gravimetría. ADF-Fibra detergente ácida y ácido sulfúrico al 72 % (AOAC, 2012).
<i>Ácidos grasos volátiles y alcoholes</i>	Cromatógrafo de gases (HP 5890 GC System) equipado con detector de ionización de llama (FID), columna Stabilwax-DA, con hidrógeno como gas de arrastre. Muestra previamente filtrada utilizando filtros de 0.22 µm
<i>Producción de biogás</i>	VDI 4630-Asociación Alemana de Ingenieros. Desplazamiento por volumen y captura de la información con un sistema automatizado (AMPTS II).
<i>Composición del biogás (CH₄, CO₂ y N₂)</i>	Cromatógrafo de gases (SRI 8610c) equipado con detector de conductividad térmica, columna de acero inoxidable empaquetada con gel de sílice (8600-PK1A), helio como gas de arrastre con flujo de 20 ml/min. La temperatura del detector fue de 150 °C.

4.5 Modelación cinética

La hipótesis de Michaelis y Menten propone una reacción en la que un sustrato (S) reacciona con una enzima (E) para formar un intermediario, llamado complejo enzima-sustrato (ES), que a su vez libera un producto (P) que regenera la enzima libre (Ecuación 3). Bajo ciertos supuestos, Michaelis y Menten llegan finalmente al desarrollo de la Ecuación 4. Para el análisis cinético en esta investigación, se seleccionó el modelo de Michaelis y Menten (Ecuación 4), el cual ha sido empleado en previas investigaciones con éxito pues permite relacionar el consumo de sustrato con formación de productos a través de los coeficientes de rendimiento (Jojoa-Unigarro & González-Martínez, 2019; Fernández-Rodríguez *et al.*, 2013). Esto es particularmente importante cuando la concentración de sustrato sobre el tiempo de reacción no se puede medir con precisión. Además, según los mecanismos de la metanogénesis, determinando la concentración de sustrato durante el tiempo de reacción no se puede obtener información confiable porque la acetogénesis representa varias posibles reacciones simultáneas. En esta investigación, la cinética se determinó usando el producto (metano) como parámetro de reacción medible.



$$v = \frac{V_{\text{máx}} * S}{K_m + S} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde v es la velocidad de reacción ($\text{Nml}_{\text{CH}_4}/\text{L}\cdot\text{d}$), $V_{\text{máx}}$ es la velocidad máxima de reacción posible ($\text{Nml}_{\text{CH}_4}/\text{L}\cdot\text{d}$), S la concentración del sustrato ($\text{g}_{\text{DQO}} \text{L}^{-1}$) y K_m es la constante de Michaelis-Menten.

Los resultados experimentales pueden ajustarse usando la linealización propuesta al modelo de Michaelis y Menten por Lineweaver y Burk. A partir de las curvas resultantes entregadas por el software del equipo AMPTS II, se calculó con apoyo del software Excel, la pendiente que representa la rapidez inicial de la producción de metano. Los datos empleados corresponden a la producción obtenida durante el primer día de metanización. Estos valores iniciales se tomaron como la velocidad de reacción, que se grafica contra la concentración inicial de sustrato.

De acuerdo con Lineweaver y Burk, se toma el inverso de cada una de las velocidades iniciales y se grafican contra el inverso de la concentración de sustrato expresados como ST . Los valores resultantes son rectas que se ajustan por mínimos cuadrados. De esas rectas la ordenada al origen corresponde con el valor inverso de la máxima velocidad de producción de metano ($1/V_{\text{máx}}$) y la pendiente es igual a $K_m/V_{\text{máx}}$. De esta manera se calcularon K_m y $V_{\text{máx}}$ para cada una de las cargas orgánicas ensayadas.

CAPÍTULO 5. RESULTADOS

En este capítulo se describen los resultados obtenidos durante la aplicación de las etapas descritas en la metodología y su discusión con lo reportado en la literatura.

5.1 Etapa I. Obtención, preparación y caracterización de los residuos del procesamiento agrícola del cacao

Las mazorcas de cacao enteras y maduras pertenecientes a la variedad criollo fueron adquiridas al inicio del segundo semestre del año 2022 a través de un distribuidor que comercia mazorcas precedentes de la costa del estado de Chiapas. Al ingresar al Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería de la UNAM las mazorcas fueron cortadas y separados sus componentes para cuantificación (Figura 5.1), persiguiendo corroborar la relación en peso de la cáscara con relación al fruto o mazorca del cacao.

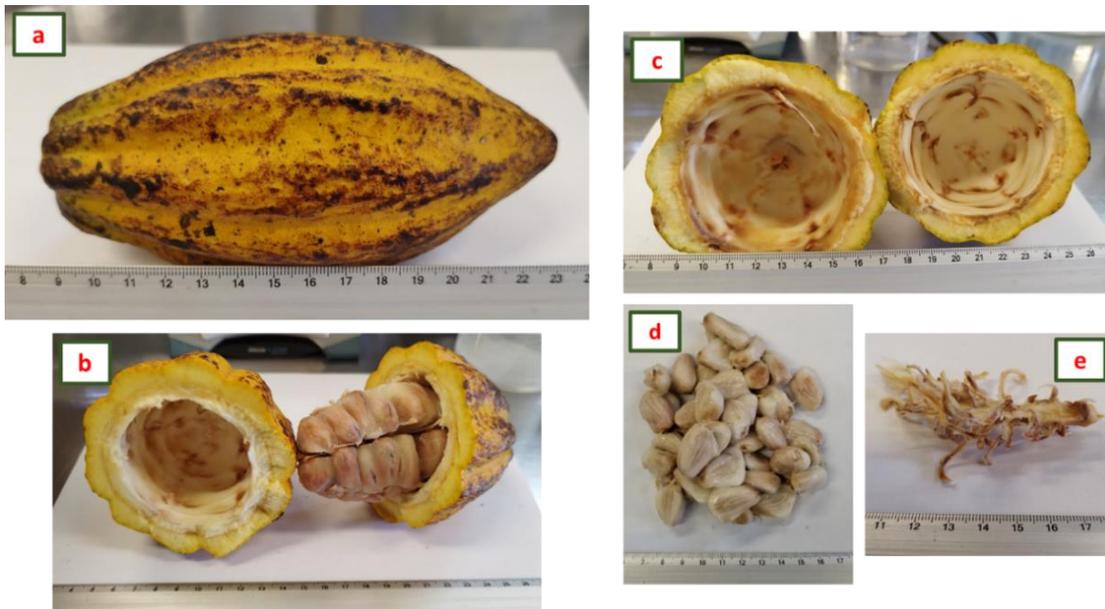


Figura 5.1: Componentes del fruto del cacao: a) mazorca entera, b) mazorca abierta, c) cáscara, d) granos y mucílago, y e) placenta.

Las mazorcas procesadas se situaron entre los 250 y 550 g de peso, predominando los frutos de aproximadamente 350 g. El tamaño promedio fue de 13-20 cm y se encontraron en cada una de 35 a 48 granos. Los valores anteriores pueden ser comparados con los obtenidos por Graziani de Fariñas *et al.* (2002) durante la caracterización de frutos del cacao en regiones venezolanas. El procesamiento de tres lotes de mazorcas de cacao *criollo* con las características anteriores confirmó que la cáscara representa el mayor porcentaje con relación al peso total del fruto, situándose entre el 70 y 78 %. Ouattara *et al.* (2021), ratifica este resultado ofreciendo un rango entre 70 y 80 %. Resultados similares obtienen Whistler *et al.* (1956) y Donkoh *et al.* (1991) refiriendo en sus investigaciones un peso de la cáscara con respecto al fruto de aproximadamente el 76 %. Oddoye *et al.* (2013) obtienen una masa del 67 %, aún con este resultado, sigue siendo la cáscara del cacao el residuo generado en mayor masa.

Con el objetivo de obtener resultados representativos y a razón de la heterogeneidad de la cáscara, esta fue extrudida en un molino de carne (modelo MOLAI-22) y luego molida en un molino para granos (marca Nixtamatic) para proporcionar a la muestra el menor tamaño de partícula posible. Finalmente, para la completa homogenización, se realizó un intenso mezclador manual (Figura 5.2). Se consideró la placenta como parte de la cáscara de la mazorca y se sometió a los mismos procesos.

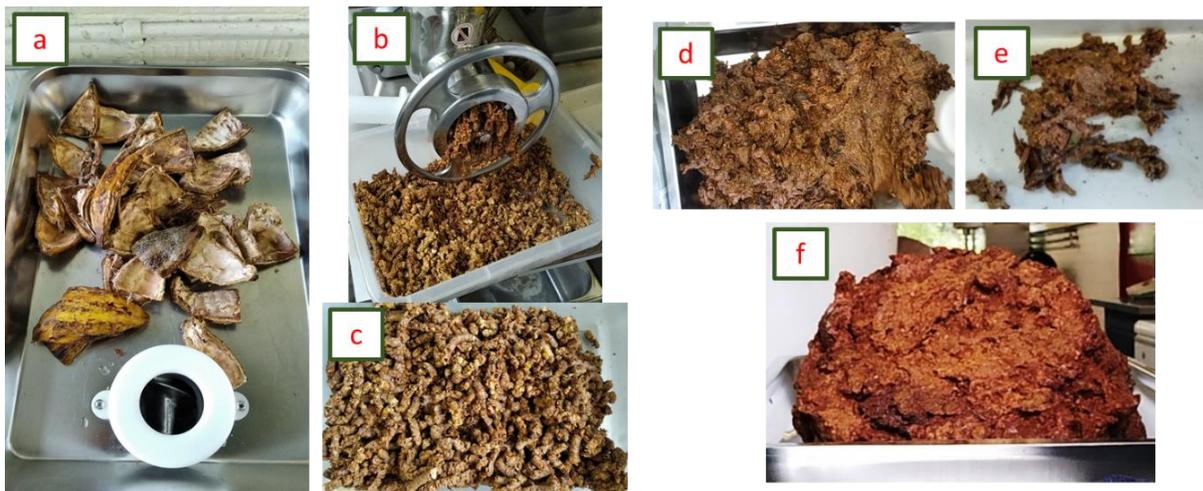


Figura 5.2: Preparación de la muestra: a) cáscaras cortadas en pedazos, b) y c) muestra extrudida, d) y e) muestra molida, y f) muestra homogenizada.

Una vez homogenizada la muestra, se separó una fracción para la caracterización fisicoquímica y bromatológica. La cáscara molida restante se conservó a -20 °C en bolsas con cierre hermético para su uso en las posteriores etapas de fermentación y metanización.

Las características fisicoquímicas y bromatológicas de la cáscara de cacao pueden variar de acuerdo con su origen regional, especie, forma de cultivo, tiempo de almacenamiento y traslado, entre otros. Por lo que se hace necesaria la caracterización previa a cualquier proceso fisicoquímico y/o biológico. Además, su contenido en lípidos, carbohidratos, proteínas, celulosa, hemicelulosa, así como la lignina proporcionan una perspectiva en cuanto al potencial de metano teórico esperado y la degradabilidad del sustrato (Raposo *et al.* 2011).

La caracterización realizada en este trabajo (Tabla 5.1), muestra que la cáscara de cacao es un sustrato ácido de pH 5.4, valor inferior al 6.25 reportado por Castillo *et al.* (2018) en su caracterización fisicoquímica de la harina a partir del exocarpio y mesocarpio del fruto.

Tabla 5.1: Caracterización fisicoquímica y bromatológica de la cáscara de cacao molida.

Parámetro	Valor	Unidades
<i>pH</i>	5.4 (3)	-
<i>Humedad</i>	77 ± 0.2 (3)	%
<i>Sólidos totales</i>	234 ± 1.6 (3)	g/kg
<i>Sólidos volátiles</i>	212 ± 2.0 (3)	g/kg
<i>Sólidos fijos</i>	21 ± 1.2 (3)	g/kg
<i>SV/ST</i>	91	%
<i>DQO_T</i>	987 ± 12.5 (5)	gO ₂ /kg _{ST}
<i>Carbohidratos</i>	279 ± 7.1 (5)	g/kg _{ST}
<i>Celulosa</i>	260 ± 14 (4)	g/kg _{ST}
<i>Hemicelulosa</i>	81 ± 19.8 (4)	g/kg _{ST}
<i>Lignina</i>	158 ± 21 (4)	g/kg _{ST}
<i>Grasas y aceites</i>	16 ± 1.3 (3)	g/kg _{ST}

Entre paréntesis se indica el número de repeticiones

Las cáscaras de cacao muestreadas presentaron una humedad del 77 % y un contenido de sólidos, como masa seca, del 23 %. Del total de materia seca, el 91 % corresponde a sólidos volátiles, indicando que una gran parte son compuestos carbonosos que pueden ser susceptibles de ser aprovechados para una degradación biológica. Antwi *et al.* (2019) reportan resultados similares; un contenido de humedad del 79.7 % y 20.3 % de materia seca, de la cual el 92.6 % corresponde a los sólidos volátiles y el 7.39 % a cenizas obtenidas a 550 °C.

La demanda química de oxígeno (DQO) es comúnmente empleada para caracterizar el contenido orgánico total de las sustancias, así como la predicción de la generación de metano, aunque no es un parámetro reportado en la bibliografía consultada para la cáscara de cacao. Se determinó que las cáscaras presentan una DQO total aproximada de 987 g/kg_{ST}. La fracción de la muestra utilizada como sustrato primario disponible en la fermentación, entendida como carbohidratos totales, se identificó en torno a los 279 g/kg_{ST}. El valor obtenido para la DQO y para el análisis de carbohidratos ubican a esta biomasa entre las biomásas lignocelulósicas altamente utilizadas en procesos de fermentación y metanización directa, como es el caso del maíz que posee valores de carbohidratos en intervalos de 87 a 301 g/kg_{ST} (Zhou *et al.*, 2016) o la FORSU de la Ciudad de México con un contenido de carbohidratos de 206 g/kg_{ST} (Castellón-Zelaya, 2021).

La cáscara presenta una composición rica en lignina (16 %ST) y polisacáridos no amiláceos como celulosa (26 %ST) y hemicelulosa (8 %ST). La lignina se considera un componente de difícil degradación en los procesos anaerobios; además de retardar la hidrólisis que conlleva a limitar el proceso de conversión de la materia orgánica a compuestos más simples. Los valores obtenidos son similares a los publicados por Antwi *et al.* (2019) en el cual las cáscaras secas tienen una estructura lignocelulósica con una fracción de lignina y celulosa de aproximadamente el 21 y 26 %, respectivamente. Vriesmann y Petkowicz (2013) y Ogunjobi y Lajide (2016) reportan similares resultados; sólo Thomsen *et al.*, (2014a) reportan valores inferiores para estos compuestos. El contenido de grasas y aceites es bajo, similar al reportado por Castillo *et al.* (2018). Las diferencias pueden deberse tanto a la heterogeneidad de sustrato como a la preparación de la muestra.

5.2 Etapa II. Fermentación de la cáscara de cacao bajo condiciones controladas

En esta sección se presentan los resultados de la segunda etapa de la metodología donde se lleva a cabo, en operación semicontinua, la fermentación del sustrato en presencia de microorganismos autóctonos a 35 °C (Figura 5.3). El objetivo principal fue facilitar la hidrólisis del sustrato previo al proceso de metanización, además de conocer y analizar los metabolitos que son generados durante la fermentación bajo distintas cargas orgánicas.



Figura 5.3: Fermentación de la cáscara de cacao: a) reactor operando en semicontinuo (3.8 L), b) método de extracción de muestra, y c) vista comparativa de la muestra extraída y la alimentación diaria

La Figura 5.4 muestra el comportamiento de los sólidos (a), la demanda química de oxígeno (b) y los metabolitos producidos (c) en el reactor anaerobio para todo el tiempo de fermentación. La fermentación de la cáscara de cacao se llevó a cabo por más de 150 días.

Los datos comienzan el día 28 de fermentación pues durante este tiempo se redujo la concentración de sólidos dentro del reactor con el fin de alcanzar un mezclado homogéneo, debido a que la presencia de pectinas en el sustrato hizo que incrementara significativamente la viscosidad en el interior del reactor. El fluido dentro del reactor ofreció resistencia al sistema de mezclado instalado pues las pectinas en presencia de agua forman geles, aumentando la viscosidad. Una vez establecida la concentración a manejar como fija para el ensayo de la primera CO, comenzó el registro de resultados.

Pasados los primeros 28 días se mantuvieron constantes la concentración en la alimentación al reactor y el volumen de reacción. Las modificaciones que condicionaron el cambio de las cargas orgánicas se realizaron con base en el flujo de alimentación diario. Se trabajó con cuatro cargas orgánicas diferentes. Los resultados obtenidos en cada una de estas cargas se amplían más adelante.

La Figura 5.4 (a) muestra la concentración de sólidos totales y volátiles en el influente y efluente del reactor. Los sólidos a la entrada y salida presentaron valores similares, lo que corrobora la estabilidad del sistema.

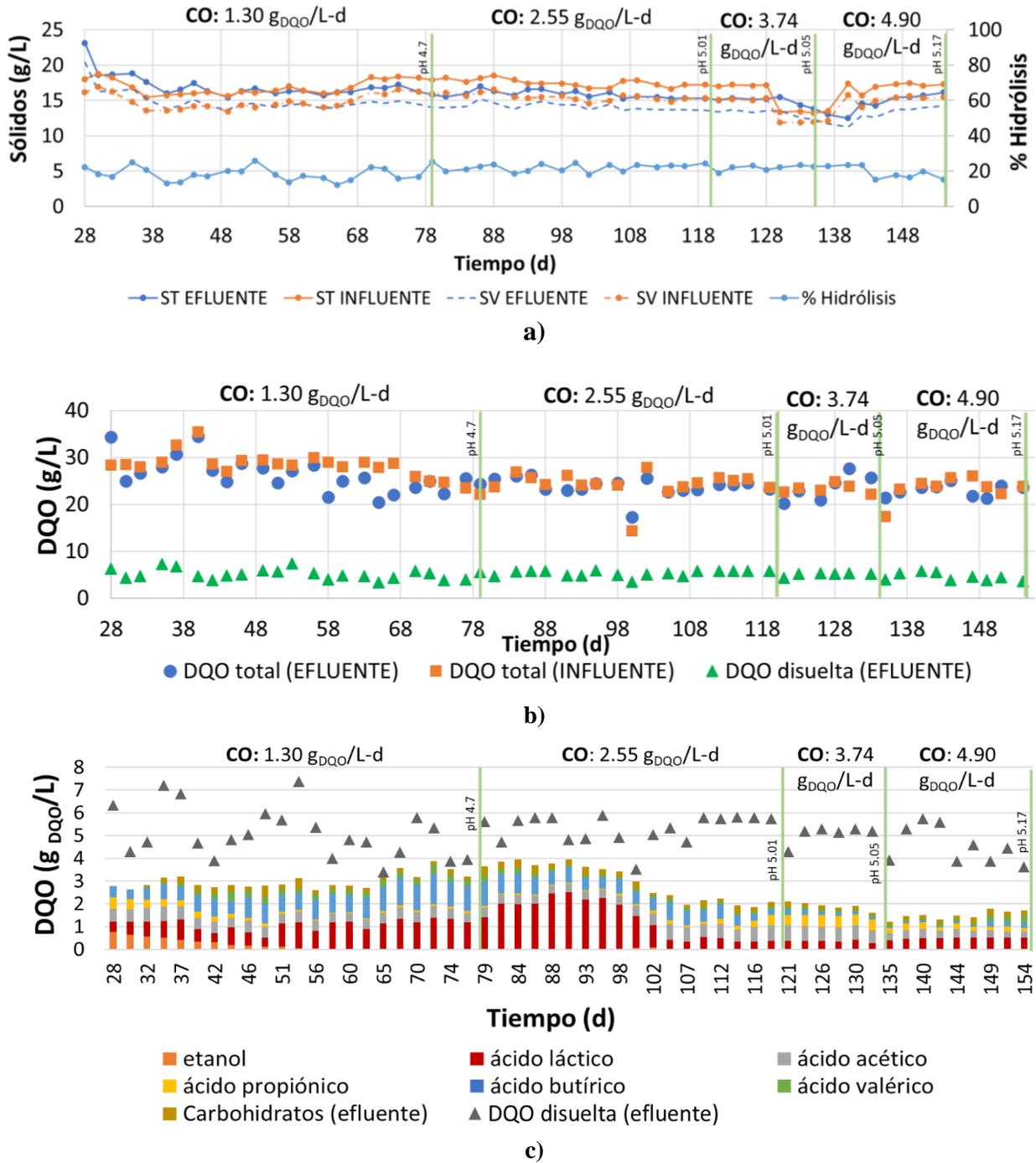


Figura 5.4: Comportamiento del fermentador bajo diferentes cargas orgánicas. a) sólidos totales y volátiles en influente y efluente. % hidrólisis b) DQO en influente y efluente c) metabolitos producidos y detectados en el efluente, expresados como DQO

Los valores de sólidos totales se determinaron en 17 g_{ST}/L y 15 g_{ST}/L para influente y efluente, respectivamente. Los sólidos volátiles se establecieron en 2 g/L menos respecto a los sólidos

totales, para el influente y efluente. Las concentraciones de sólidos no variaron en el tiempo pues la alimentación no varía su concentración durante todo el tiempo de fermentación. Luego, al día 130, los sólidos y los valores de DQO muestran una disminución, esto ocurre por el cálculo de alimentación del reactor, al alimentar cáscara cruda proveniente de un nuevo lote de cáscaras. Durante la fermentación el grado de hidrólisis fue de aproximadamente el 20 %; este valor se determinó a partir de la DQO disuelta en el efluente y la DQO total del influente. Los valores de DQO a la salida y entrada del reactor se pueden observar en la Figura 5.4 (b). Al inicio de la CO más baja se observa la mayor variación. Luego, el efluente se estabilizó en los 25 g_{DQO}/L. La DQO disuelta en el efluente del reactor fue de 5 g_{DQO}/L; de acuerdo con este resultado es posible interpretar que la mayor concentración de materia orgánica se encuentra en la fracción sólida del efluente. La Figura 5.4c hace referencia a la concentración de metabolitos durante todo el tiempo de fermentación. La DQO disuelta en el efluente se utiliza para corroborar la suma de los metabolitos detectados, de ahí que todos estén expresados en g_{DQO}/L. Los metabolitos detectados fueron: los ácidos acético, propiónico, butírico y valérico; alcoholes como el etanol (solo al inicio del proceso) y ácido láctico. Además, se identificaron trazas de ácidos heptanoico y hexanoico, pero por debajo de los límites de confianza del cromatógrafo. En las secciones posteriores se analiza si las variaciones observadas pueden relacionarse con el tiempo de residencia de sólidos y/o los cambios en la carga orgánica (CO). En las fermentaciones bajo distintas cargas orgánicas, predominan los ácidos láctico y butírico en la CO de 1.3 g_{DQO}/L·d, los ácidos acético y propiónico en la CO de 2.6 y 3.7 g_{DQO}/L·d, y los ácidos láctico y valérico en la CO de 4.9 g_{DQO}/L·d.

5.2.1 Fermentación con carga orgánica de 1.3 g_{DQO}/L·d.

En general, la presencia y concentración de metabolitos durante la primera CO no fue constante. Esta condición abarcó un total de 50 días a concentración y volumen constantes en el reactor. La alimentación diaria fue de 0.2 L; cada día se reponía aproximadamente el 5 % del volumen total de reacción, por lo que el tiempo de retención de sólidos (asumido equivalente al tiempo de retención hidráulico) fue de 19 días.

La Figura 5.4c muestra las concentraciones de los metabolitos detectados durante la fermentación bajo una CO de 1.3 g_{DQO}/L·d, además de los carbohidratos y la DQO disuelta en

el efluente. Los metabolitos presentes fueron etanol, ácidos láctico, acético, propiónico, butírico y valérico.

En el día uno la cáscara de cacao tuvo una concentración de metabolitos totales de 2.8 g_{DQO}/L, donde el etanol presentó la mayor concentración relativa, seguido del ácido acético. Para el día tres, las concentraciones de metabolitos presentes se mantuvieron constantes, únicamente aumentó la concentración de ácido láctico mientras que el etanol comenzó a disminuir. A partir del día cinco los cambios en el sistema comenzaron a acentuarse, el ácido propiónico y el etanol disminuían constantemente, mientras que la concentración de ácido láctico se desestabilizaba y el ácido butírico comenzaba a aumentar de forma gradual. Al día 26 se detectó el último y más bajo valor de concentración de etanol, para este momento, la concentración de ácido láctico ocupaba más del 40 % del total de metabolitos producidos, seguido del ácido butírico con un 27 % del total. La presencia de butírico sugiere agotamiento o no existencia de carbohidratos simples en el caldo, por lo cual los microorganismos presentes deben degradar compuestos más complejos y es más difícil llegar a obtener productos como el etanol (Castellón-Zelaya & González-Martínez, 2021a). Resultados similares obtiene Zheng *et al.* (2015) para los residuos de frutas y verduras; la concentración de etanol disminuye a medida que aumenta la concentración de ácido láctico. La alta concentración de etanol podría garantizarse mediante altas cargas de sólidos, pero como se describe en capítulos anteriores, mantener una carga de sólidos elevada en el reactor es técnicamente difícil por la alta viscosidad.

A partir del día 29 y hasta el 50 (último día de fermentación para esta condición), no se manifestaron cambios significativos. Las concentraciones relativas de los metabolitos se mantuvieron por encima de 1 g_{DQO}/L solo para los ácidos láctico y butírico. La concentración total de metabolitos más alta se identificó al día 45 con 3.72 g_{DQO}/L, donde los ácidos láctico y butírico representaban, cada uno, cerca del 37 % del total. Los metabolitos restantes de mayor a menor concentración fueron los ácidos: acético, valérico y propiónico. La concentración total de metabolitos se determinó en 3.2 g_{DQO}/L (con ligeras variaciones) para los últimos días de fermentación.

Las diferencias menores entre la suma total de metabolitos y la DQO disuelta incluyen trazas de sustancias no identificadas y pequeñas cantidades de ácidos heptanoico y hexanoico. El grado de fermentación, calculado como la DQO de los metabolitos sobre la DQO disuelta del sistema

por 100, tuvo un promedio del 57 % para todo el tiempo de fermentación de esta CO. El valor más bajo determinado fue de 37 y el más elevado 88 %.

A consecuencia de la relativa constancia en la DQO (desvest: 1.5 g_{DQO}/L), los sólidos a la entrada y salida del reactor, y la producción de metabolitos, se califica a esta condición como *estable*. Esta consideración permite que se tomen las muestras para posterior metanización y se realicen los cálculos para el inmediato cambio de condición en el reactor fermentativo, acción que se repite para cada CO. Al momento de realizar el cambio, la primera CO había cumplido 2.6 tiempos de retención de sólidos.

5.2.2 Fermentación con carga orgánica de 2.6 g_{DQO}/L·d

El cambio de CO en el reactor de fermentación estuvo regido exclusivamente por el volumen de alimentación diaria, las restantes variables se mantuvieron constantes. La cantidad de sustrato alimentado diariamente fue de 0.4 L, por lo que ahora se reponía poco más del 10 % del volumen total de reacción y el tiempo de retención de sólidos era un 50 % inferior respecto a la anterior CO.

Durante la CO de 2.55 g_{DQO}/L·d la producción de metabolitos, carbohidratos y la DQO disuelta se comportan como señala la Figura 5.4. El ensayo se extendió por un total de 41 días. En días alternos, se tomaron las muestras para determinación de ácido láctico, AGV y alcoholes.

En relación con la anterior, la nueva CO presenta igual variedad de metabolitos (exceptuando el etanol) aunque en diferentes concentraciones. En el día uno la concentración de metabolitos totales para la cáscara de cacao es igual a la del último día de la anterior CO, con un valor de 3.2 g_{DQO}/L, donde el ácido láctico presentó la mayor concentración relativa, seguido del ácido butírico. Durante la primera mitad de la prueba, la fermentación dominante fue la del ácido láctico, llegando a ocupar el 67 % del total de metabolitos. El segundo metabolito más producido fue el ácido butírico, representando menos del 20 % respecto al total. La sumatoria de los restantes metabolitos, no alcanzaron 1 g_{DQO}/L. La concentración total de metabolitos más alta se identificó en esta etapa, al día 13 con 3.73 g_{DQO}/L.

A partir del día 19 los microorganismos presentes disminuyeron su actividad y se comenzaron a observar cambios en la producción de ácido láctico. La producción de este ácido disminuyó radicalmente y para la segunda mitad de la prueba, los ácidos acético y butírico eran los metabolitos más producidos, sumando cerca del 60 % de la producción total. El promedio total

de metabolitos previo a la caída del ácido láctico era de 3.33 g_{DQO}/L. Aunque las bacterias ácido-lácticas pueden crecer en una amplia gama de valores de pH y temperaturas (Bühlmann *et al.*, 2020; Mäki-Arvela *et al.*, 2014), el desplazamiento de las comunidades lácticas provocó que la concentración de metabolitos alcanzara 1.88 g_{DQO}/L, lo que significa que la tasa de fermentación disminuyó casi un 50 % respecto a la producción global. La concentración total de metabolitos más baja también se identificó en esta etapa, al día 36 con 1.62 g_{DQO}/L.

El ácido acético representa el primer día al 7 % del total de la DQO disuelta (incluye compuestos sin identificar), permaneció con cambios muy discretos hasta la caída en la producción de láctico, donde incrementa hasta alcanzar un valor final del 14 %. El comportamiento del ácido butírico fue contrario al descrito anteriormente, comenzó con un 20 % y al disminuir la concentración de ácido láctico ocupó un 13 % respecto a la DQO disuelta.

Para microorganismos autóctonos, el grado de fermentación al inicio no fue tan discrepante de otros sustratos, como la FORSU (Jojoa-Unigarro, 2022). En un inicio se identificaron valores no superiores al 77 %. Con la disminución en la producción del ácido láctico y el incremento paulatino del ácido acético, el grado de fermentación se reduce drásticamente hasta la mitad, promediando un 35 %. Hacia el final de esta condición, se muestra una tendencia al incremento de los ácidos acético y propiónico.

Al día 41, luego de haber ocurrido más de cuatro tiempos de retención de sólidos, se extraen las muestras para caracterización y producción de metano. Al ocurrir el desplazamiento de la población láctica habían sucedido más de 2 tiempos de retención de sólidos.

5.2.3 Fermentación con cargas orgánicas de 3.7 y 4.9 g_{DQO}/L·d

La fermentación realizada con CO de 3.7 y 4.9 g_{DQO}/L·d muestran cierta similitud en cuanto a presencia inicial y generación total de metabolitos. Es por ello, que a continuación se realiza un análisis en paralelo de sus comportamientos.

La CO de 3.74 g_{DQO}/L·d se trabajó por un total de 13 días. Aunque fue la condición con el menor tiempo de fermentación, el recambio del contenido total del reactor ocurrió cada 6.3 días, por lo que de igual manera cumplió con 2 tiempos de retención de sólidos como las CO anteriores. La alimentación diaria fue de 0.6 L, reponiéndose cerca del 16 % del volumen total de reacción. Por otro lado, la última CO estudiada reponía diariamente el 20 % del volumen de reacción (0.8

L). Esta CO de 4.90 g_{DQO}/L·d permaneció por 20 días, con un tiempo de retención de sólidos de entre 4 y 5 días.

La Figura 5.4c ilustra las concentraciones de metabolitos detectadas para ambas condiciones. Los metabolitos identificados ocuparon con regularidad menos del 50 % de la DQO disuelta total lo que sugiere la presencia de compuestos desconocidos en el sistema. Además, el grado de fermentación para ambas condiciones fue bajo con valores entre el 33 y 34 %.

La CO de 3.7 g_{DQO}/L·d en su primer día tuvo una producción total de metabolitos de 1.87 g_{DQO}/L, donde el ácido acético presentó la mayor concentración relativa, seguido de los ácidos propiónico, láctico y butírico, en ese orden. Estas concentraciones se sostuvieron en el tiempo de manera constante, no sucediendo así durante la CO de 4.9 g_{DQO}/L·d. La presencia de ácido acético favorece el posterior proceso de metanización, ya que este metabolito a diferencia de los demás no necesita sufrir acetogénesis antes de transformarse a metano. Los organismos usan el ácido acético directamente para producir metano y dióxido de carbono; no ocurre la pérdida de energía por estas transformaciones.

La última CO ensayada inició con una concentración de metabolitos inferior al 30 % del total de la DQO disuelta. La concentración total de metabolitos fue de 1.06 g_{DQO}/L, predominando el ácido láctico, seguido del acético y propiónico. La cantidad de ácido láctico producida incrementó discretamente respecto a la CO anterior. Al día 13 de fermentación se comenzó a observar una menor producción de ácido propiónico y un aumento en las concentraciones de los ácidos butírico y valérico; la concentración de metabolitos sobrepasó 1.8 g_{DQO}/L.

Durante el tiempo de fermentación de las cuatro CO fue posible apreciar una variación en la presencia y concentración de metabolitos, esto puede relacionarse con la población autóctona de microorganismos y la desarrollada por el propio sustrato durante la fermentación. Evidencia de ello son las diferencias significativas en la producción de etanol y ácidos láctico, propiónico y butírico. La CO responsable del grado de fermentación más bajo fue la última (4.9) y el más alto, la primera (1.3). Las CO iniciales (1 y 2) lograron la mayor transformación de DQO disuelta en metabolitos de interés.

De acuerdo con Kandyliš *et al.* (2016) por debajo de un pH de 5.5 los procesos hidrolíticos son deficientes, la actividad enzimática es muy baja e inhibe el metabolismo microbiano. La baja tasa de hidrólisis durante todo el proceso fermentativo, aun cuando se incluyen elevados tiempos

de retención de sólidos, indica que la hidrólisis del sustrato no se basa en estos tiempos (como es el caso de otros sustratos como la FORSU), sino que depende de la población de microorganismos en el sustrato y su distribución a través del tiempo. Es por ello que los autores que se mencionan a continuación, además de emplear el proceso fermentativo de la cáscara de cacao con un propósito diferente a la mejora en la posterior producción de metano, lo hacen además en condiciones distintas a la que propone esta investigación.

Perwitasari *et al.* (2021) con el objetivo de encontrar una alternativa económica para la producción de ácido cítrico, desarrollaron una fermentación en estado sólido de la cáscara del cacao usando *Aspergillus niger* Tiegh F359. La cáscara de cacao procedente de Indonesia fue secada (72 horas a 40 °C), molida y posteriormente tamizada para convertirla en harina. Se prepararon diferentes medios que contenían etanol, metanol, melazas residuales, agua y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fuente de nitrógeno. El medio con contenido limitado de nitrógeno aumentó la producción de ácido cítrico. El metanol estimuló la producción de ácido cítrico mejor que el etanol. La mayor producción de ácido cítrico se alcanzó con 67 % de agua, 0.28 % de nitrógeno y un tiempo de incubación de 8.11 días. Se produjeron alrededor de 7530 ppm de ácido cítrico a partir de 1 g de la cáscara de cacao como fuente de carbono.

El estudio de Alemawor *et al.* (2009) investigó la viabilidad y optimización de un proceso de fermentación usando el hongo *Pleurotus ostreatus* como biocatalizador para mejorar el estado nutricional de las cáscaras del cacao para ser usadas como alimento animal. Los factores principales evaluados fueron el tiempo de fermentación y la cantidad de iones (Mn^{2+}). Luego de cinco semanas de fermentación, las cáscaras modificadas con MnCl_2 al 0,075 % (p/p) mostraron un incremento del 36 % en el contenido de proteínas crudas y carbohidratos solubles totales, una reducción del 17 % de la fibra cruda y lignina, y un 88 % de reducción de taninos totales.

Adejinmi *et al.* (2007) investigan el rendimiento y digestibilidad de los nutrientes en conejos alimentados con cáscara de mazorca del cacao. El experimento duró diez semanas. Los resultados mostraron un aumento significativo en el consumo de alimentos, la ganancia de peso corporal y el índice de conversión alimenticia en los conejos al aumentar las cantidades de cacao fermentado y sin fermentar en las dietas experimentales. Sucedió de igual manera en el análisis de la digestibilidad de nutrientes. Sin embargo, las dietas basadas en cáscara fermentada obtuvieron el mejor rendimiento.

La fermentación aeróbica natural de la cáscara de la mazorca de cacao es una importante fuente de metabolitos que contienen compuestos bioactivos contra bacterias de relevancia médica, especialmente *P. aeruginosa* y *S. choleraesuis*. El extracto obtenido a través de esta fermentación estudiada por Santos *et al.* (2014), contenía una mezcla de metabolitos secundarios ya sea de las propias cáscaras del cacao o de derivados formados durante su fermentación aeróbica o de la combinación de ambas fuentes, como lo demuestra la identificación y presencia de compuestos principalmente fenólicos y algunos nitrogenados.

Una fermentación natural *in vitro* (cáscaras lavadas, secadas al sol durante 14 días y molidas en polvo; fermentación anaerobia durante 3 días a temperatura ambiente) provocó el aumento de los contenidos de proteína (22–116 %), ceniza (11–31 %), grasa (68–75 %), humedad (49–142 %) y flavonoides (29–101 %) de la cáscara de la mazorca. Los rangos se relacionan con las variedades de cacao (*criollo*, *forastero*, *trinitario*). Aunque las condiciones de operación de Shodehinde & Abike (2017) fueron distintas a las de este trabajo, proporcionan un escenario positivo al mostrar como la fermentación afectó la composición de las cáscaras de cacao al reducir la fibra cruda (59–73 %) y taninos (41–87 %). El contenido de carbohidratos presentó cambios insignificantes (Shodehinde & Abike, 2017). Los carbohidratos determinados en el influente y efluente de este trabajo tampoco presentaron cambios notorios.

Por otro lado, (Tiburcio, 2017) identificó 50 compuestos volátiles en las cáscaras de las mazorcas de cacao empleando un proceso de micro-extracción sólida (5/95 % carboxeno/polidimetilsiloxano, 75 μm) seguido de una desorción y separación en 95 % polidimetilsiloxano y 5 % fenilo. Estos compuestos eran: 16 alcoholes, 11 hidrocarburos, 8 aldehídos, 7 cetonas, 5 ésteres, 2 aminas y ácido isovalérico. La fermentación en estado sólido de las cáscaras con *Rhizopus stolonifera* NRRL 28169 (incubado en un agitador rotatorio 100 rpm, 30 °C, pH 5.5 por 7 días) redujo el número (de 50 a 33) compuestos volátiles identificados.

La investigación de Bobiles *et al.* (2022) presenta una alternativa para la fermentación del grano de cacao empleando un pequeño volumen de granos húmedos y las cáscaras de las mazorcas con el fin de apoyar el trabajo de los pequeños productores que cosechan un volumen limitado de cacao. Los resultados demuestran que la fermentación a pequeña escala (3 kg granos húmedos + 4 kg de cáscaras) puede ser un tratamiento práctico y económico en comparación con el tratamiento de fermentación tradicional. Los resultados de este trabajo indican que la

fermentación de la cáscara del cacao, a escala de laboratorio, también es un procedimiento práctico y económico.

5.3 Etapa III. Producción de metano

En esta sección se analizan los resultados que corresponden a la tercera etapa de la metodología (ver preparación de reactores metanogénicos en Capítulo 4). A partir de la determinación de la composición del biogás y la variación de las concentraciones iniciales de sustrato en los reactores de metanización, se analizaron las curvas de producción de biogás entregadas por el software del AMPTS II durante 25 días. Además, se determinó la producción específica de metano y se aplicó el modelo de Michaelis y Menten con el objetivo de identificar los parámetros cinéticos para cada condición ensayada. Las reacciones se consideraron finalizadas cuando en las curvas de producción de metano, la pendiente cambió súbitamente. No fue posible registrarse por el criterio que enuncia que las reacciones terminan cuando su pendiente se muestra similar a la del inóculo ya que los inóculos no se comportaron de igual manera para todas las reacciones, a pesar de haber sido preparados bajo el mismo procedimiento. Las curvas de producción de metano para los inóculos no presentan una terminación semejante a las demás curvas y no fue posible compararlas. La producción termina cuando el sustrato exógeno es consumido (comparar Figura 5.5 y Tabla 5.2). Luego de la metanización bajo cada CO, se determinaron los metabolitos remanentes y los producidos para conocer los productos de las transformaciones durante este proceso.

Tabla 5.2: Volumen final de metano alcanzado por la cáscara cruda y fermentada bajo diferentes cargas orgánicas. (*) se tomaron 3 de 4 concentraciones para el cálculo de prod. esp. CH₄.

Carga orgánica (gdQO/L·d)	Prod. Final de CH ₄ (Nml)			
	Sustrato (20 ml)	Sustrato (40 ml)	Sustrato (80 ml)	Sustrato (120 ml)
<i>Cáscara cruda*</i>	101	184	185	261
<i>CO: 1.3*</i>	110	176	293	493
<i>CO: 2.6 *</i>	161	122	189	280
<i>CO: 3.7</i>	89	115	167	235
<i>CO: 4.9</i>	122	161	272	394

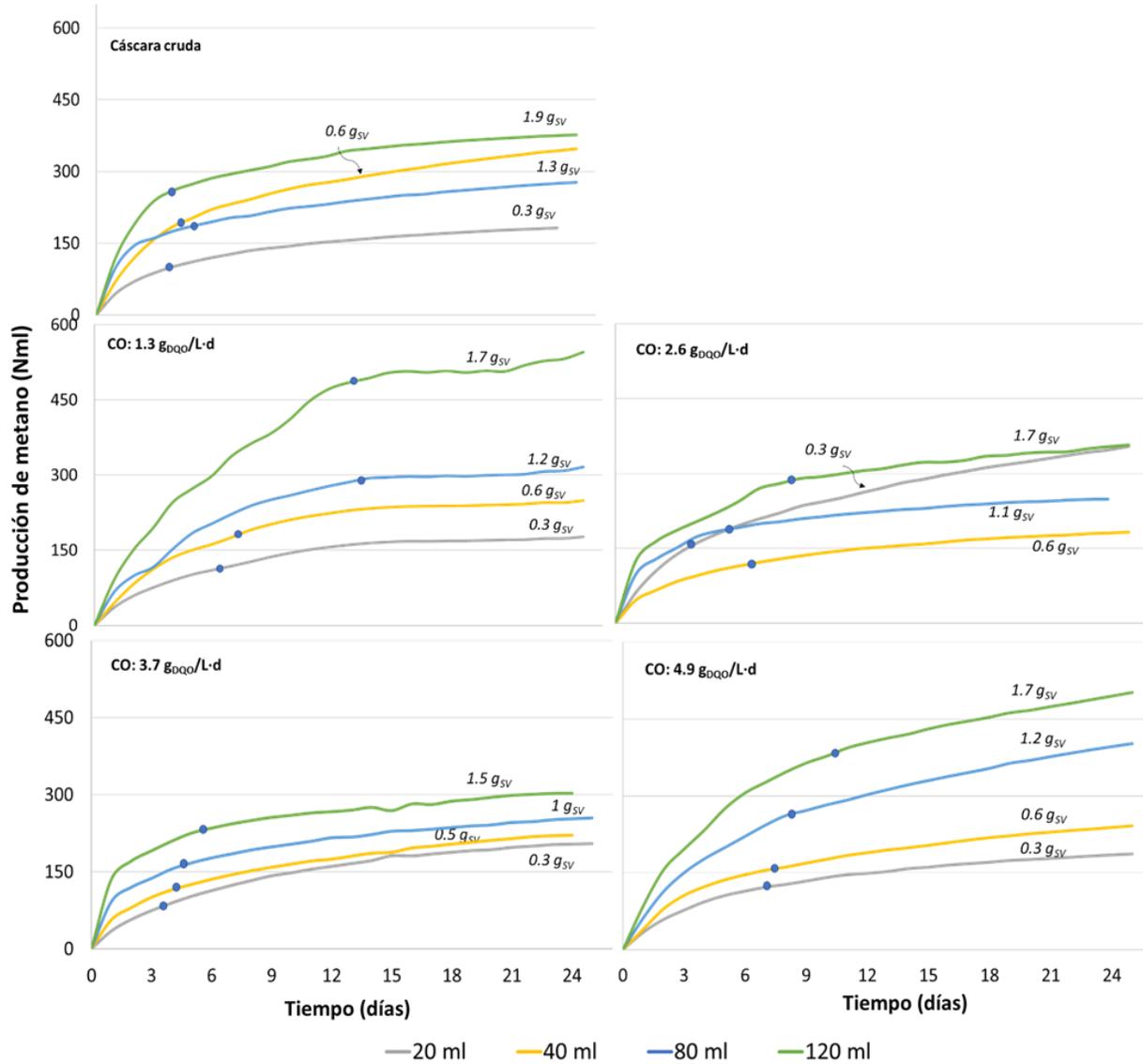


Figura 5.5: Curvas de producción de metano para la cáscara de cacao cruda y fermentada bajo diferentes cargas orgánicas.

5.3.1 Producción de metano de las cáscaras de las mazorcas de cacao

La Figura 5.5 muestra las curvas de producción de metano para las diferentes concentraciones de las cáscaras de cacao trituradas y sin previa fermentación. El objetivo de esta metanización es referenciar cuánto metano generan directamente las cáscaras de cacao “crudas”. La concentración más baja se observa con la curva de color gris y la más alta con el color verde; las curvas de color amarillo y azul representan las concentraciones intermedias. La producción de metano comienza inmediatamente después de la inyección del sustrato en los reactores y aumenta hasta alcanzar una pendiente máxima después de pocos días. En la Figura 5.5, las

curvas de producción de metano vs. tiempo en días no evidencian una fase de retardo o tiempo de latencia visible, el cual se describe como el tiempo que requiere el sustrato para ocupar los sitios activos en la enzima o para saturar la enzima. Sin embargo, al graficar la producción de metano vs. el tiempo en horas sí puede identificarse la presencia de esta fase durante aproximadamente las primeras cinco horas de reacción del día 1, luego comienza la producción de metano tal y como se describe en la Figura 5.5, donde la mayor producción de metano corresponde con la mayor concentración de sustrato. El final de la producción se puede observar cuando las curvas cambian su pendiente para comportarse más como una línea recta, esto ocurre aproximadamente al cuarto día para las cuatro concentraciones.

Durante los dos primeros días las pendientes de las curvas de producción de metano aumentaron con la concentración de sustrato. Al tercer día, el reactor que contenía 0.63 g_{SV} cambió radicalmente su comportamiento y comenzó a mostrar una producción de metano superior respecto al segundo reactor con mayor cantidad de sustrato en el sistema (1.3 g_{SV}). De igual manera, el inóculo varió su comportamiento, aumentando su producción de metano cada vez más hasta sobrepasar al reactor con menor concentración de sustrato (0.32 g_{SV}) al día 13. Esta conducta es totalmente irregular y sus causas pueden estar ligadas a una deficiente ruptura de los gránulos presentes en el inóculo. El resto de las curvas se mostraron paralelas en su producción y con un aumento proporcional a la cantidad de sustrato contenida en los reactores.

En el biogás producido se identificó una concentración de metano superior al 74 % e inferior al 80 %, para todas las concentraciones de sustrato ensayadas y prácticamente desde el primer día (ver Anexo 1.1). Los menores porcentajes de metano corresponden con los reactores de mayor concentración de sustrato. Los volúmenes de metano en un 74 % respecto al total de biogás indican la presencia de arqueas hidrogenotróficas trabajando correctamente, pero también la presencia de organismos facultativos metanógenos descomponiendo los metabolitos presentes en mayor cantidad respecto a los demás reactores, como se explicó en las secciones del Capítulo de DA. Las arqueas hidrogenotróficas, al consumir alcalinidad, desplazan el equilibrio de carbonatos, lo que implica menor salida de CO₂ a la fase gaseosa y mayor presencia de metano en la composición del biogás. El rendimiento de metano de 574 NL/kg_{SV} fue logrado por el reactor con menor contenido de sustrato (0.32 g_{SV}), seguido del reactor con 0.63 g_{SV} (Figura 5.5). Antwi *et al.* (2019) reportan un rendimiento de biogás de 357 NL/kg_{SV} con un contenido de metano aproximado del 55 % para la cáscara de cacao sin fermentar (cáscaras provenientes

de Ghana, Vol. de reacción 300 ml, 38 °C), lo que indica que obtuvieron 196 NL_{CH4}/kg_{SV}, de un potencial teórico estimado en 470 NL_{CH4}/kg_{SV}. En este trabajo, los reactores con más de 1 g_{SV} fueron los únicos que lograron una producción cercana a la obtenida por Antwi *et al.* (2019), las restantes concentraciones alcanzaron valores superiores.

5.3.2 Producción de metano de las cáscaras fermentadas bajo diferentes cargas orgánicas

El proceso metanogénico posterior a la fermentación debe desarrollarse a concentraciones bajas para que no se acumulen los ácidos propiónico y valérico, sustancias inhibitoras del proceso que están presentes en el caldo fermentado o que se generan como parte de la desintegración de otros metabolitos durante la metanización, como por ejemplo el ácido láctico. La Figura 5.5 muestra las curvas de producción de metano durante 25 días para los digestatos de las fermentaciones desarrolladas bajo diferentes cargas orgánicas. Como observación general, las curvas muestran que la producción de metano es directamente proporcional a la concentración inicial del sustrato; sólo para la segunda carga orgánica (2.6 g_{DQO}/L·d) en su concentración más baja, se manifestó una singularidad que es analizada más adelante.

Durante los primeros días, la producción de metano para todas las condiciones es relativamente rápida luego la tasa de producción disminuye mostrando una segunda etapa; para algunas condiciones este cambio no fue tan acentuado por lo que su identificación gráfica no es tan clara.

Metanización de los fermentos obtenidos con una carga orgánica de 1.3 g_{DQO}/L·d

La primera CO llevada a metanización fue de 1.3 g_{DQO}/L·d, la cual permaneció en el reactor de fermentación por 50 días, cumpliendo 2.6 tiempos de retención de sólidos de 19 días cada uno. Para este ensayo, a los cuatro reactores metanogénicos ingresó un caldo fermentado con aproximadamente 39 y 36 % (respecto al total de metabolitos producidos en fermentación) de ácidos láctico y butírico, respectivamente (Tabla 5.3). Los demás metabolitos presentes, aunque en menor proporción, fueron los ácidos acético, propiónico y valérico (comparar con Figura 5.4c).

Tabla 5.3: Concentraciones de etanol, ácido láctico y ácidos grasos volátiles al terminar el periodo correspondiente a la CO en la fermentación. Entre paréntesis se indica el % que representan respecto al total de metabolitos producidos.

<i>Metabolitos</i>	Carga orgánica (g_{DQO}/L·d)			
	1.3	2.6	3.7	4.9
<i>Etanol</i>	NA	NA	NA	NA
<i>Ác. láctico</i>	1.19 (39)	0.37 (20)	0.27 (18)	0.52 (27)
<i>Ác. acético</i>	0.41 (13)	0.70 (38)	0.57 (38)	0.27 (14)
<i>Ác. propiónico</i>	0.09 (3)	0.44 (23)	0.48 (32)	0.16 (8)
<i>Ác. butírico</i>	1.09 (36)	0.26 (14)	0.10 (7)	0.20 (11)
<i>Ác. valérico</i>	0.28 (9)	0.11 (6)	0.07 (5)	0.36 (19)

NA: no aplica

Estos valores corresponden con los sustratos alimentados a los frascos para producción de metano. Los valores están expresados como DQO en g/L.

Las tres primeras concentraciones de sustrato presentaron una producción de metano paralela y con un aumento en su producción en correspondencia con la concentración de sustrato presente. La concentración más alta tiene un comportamiento singular y su producción de metano aumenta permanentemente y, aunque al día 13 se comienza a observar una producción continua (entendida como el fin de la metanización), 25 días no fueron suficientes para la terminación de la reacción pues la producción continuó aumentando a partir del día 21; este fenómeno se puede entender como un crecimiento diáuxico en la producción de metano bajo esta concentración. Los valores finales de metano para la más alta concentración son similares a los encontrados en el reactor con igual concentración de sustrato, pero para la cuarta CO llevada a metanización (4.9 g_{DQO}/L·d).

Durante los primeros 9 días de metanización se genera más del 70 % del metano producido en los 25 días. Una vez identificado el final de la producción para cada reactor, representado con un punto azul sobre las curvas (Figura 5.5), se observa que al sexto día los dos reactores de más baja concentración habían producido más del 85 % del metano total y los dos reactores con concentración más alta más entre el 55 y el 62 %.

El comportamiento de las curvas de metano del material fermentado bajo esta CO puede relacionarse con la concentración inicial de ácido láctico y/o butírico (metabolitos en mayor concentración en el sustrato). La presencia de estos pudo provocar acumulación de ácido

propiónico en el reactor. Como demostró Jojoa-Unigarro (2022), con concentraciones de ácido propiónico por encima de los 600 mg_{DQO}/L el sistema presenta grados de inhibición importantes. La presencia de ácido láctico en mayor proporción con respecto al total de metabolitos presentes interfiere en la producción de metano de manera negativa. La acetogénesis del ácido láctico puede tener tres caminos: acetogénesis que solo produce acetato, la formación de propiónico y acetato, o la formación de butirato. La reacción de metanización del ácido láctico no es eficiente a concentraciones altas de este metabolito. De acuerdo con Detman *et al.*, 2018 y Vasmara *et al.* (2021), la acetogénesis del lactato produce ácido propiónico, lo cual provoca el freno en el proceso acetogénico y la acumulación de metabolitos, originando la inhibición del sistema biológico por acidificación y obstaculizando la metanogénesis. Para contrarrestar este inconveniente recomiendan bajas cargas orgánicas para tener la concentración final mínima posible de propiónico e incrementar la formación de acetato.

De igual manera, el ácido butírico en concentraciones altas (3-20 g_{DQO}/L) hace que aumente el tiempo de latencia, por acetogénesis, y después de una etapa de aclimatación de los microorganismos presentes se produzca rápidamente metano (Dogan *et al.*, 2005). De acuerdo con Zhang *et al.* (2019), el ácido butírico alcanza una concentración de inhibición de metano al 50 % con 1.3 g_{DQO}/L; en este estudio la acetogénesis del ácido butírico fue un paso limitante y además se concluye que puede actuar como inhibidor de los metanógenos. La concentración de ácido butírico identificada antes de la metanización en este trabajo fue de 1.1 g_{DQO}/L, valor cercano al descrito por Zhang *et al.* (2019). Estudios como el de Jojoa-Unigarro (2022) muestran que a concentraciones más elevadas de ácido butírico mayor es la producción de isobutírico e isovalérico producto de la acetogénesis; la presencia de estos inhibe la metanización a altas concentraciones.

Metanización de los fermentos obtenidos con una carga orgánica de 2.6 g_{DQO}/L·d

Con el objetivo de evitar una inhibición por producto, para esta condición nuevamente las concentraciones de sustrato ingresadas a los reactores fueron bajas. En este segundo ensayo, bajo una CO de 2.6 g_{DQO}/L·d, la cáscara de cacao permaneció por 41 días en el reactor fermentativo y presentó un tiempo de residencia de sólidos de 9.5 días. El material producto de la fermentación que se usó en los cuatro reactores de metanogénesis contenía los siguientes metabolitos: ácidos láctico, butírico, acético y propiónico; los dos últimos metabolitos se

observaban en mayor concentración con 38 y 23 % cada uno (Tabla 5.3) (comparar con la Figura 5.4c).

De forma general, la producción de metano se muestra en aumento con la concentración de sustrato; sólo la concentración de sustrato más baja presenta una producción irregular sobrepasando a la concentración de 1.1 gsv al día cinco (Figura 5.5). Los valores finales de metano para estas concentraciones son similares (Tabla 5.2). Este comportamiento hace que se deba desestimar esta curva para el análisis de la producción de metano, el cálculo de producción específica y los parámetros cinéticos. Las restantes curvas tuvieron un comportamiento uniforme y predecible con una producción proporcional a la cantidad de sustrato presente en los reactores. Durante los primeros tres días la producción de metano es relativamente rápida, luego la velocidad de generación disminuye y antes del noveno día se identifica el final de la producción para todas las concentraciones. Al día 9, las concentraciones más altas habían conseguido producir más del 81 % del metano que se produciría al final de la prueba al día 25 y las dos concentraciones más bajas, habían producido entre el 66 y 74 % (Figura 5.5).

La presencia de ácido acético en el sustrato de la metanización en mayor concentración representa una gran ventaja para esta condición. Es un metabolito que no necesita sufrir acetogénesis antes de transformarse a metano, no ocurriendo así la pérdida de energía por estas transformaciones. Cuando se consume el ácido acético no se generan otros subproductos, por lo que los metabolitos que pudieran inhibir el proceso no se acumulan. Durante la metanización del acetato no se produce hidrógeno. Si el acetato fuera el único sustrato disponible para los metanógenos entonces no se produce metano hidrogenotrófico, por lo que la composición del biogás debería tener una concentración igual de 50 % para metano y dióxido de carbono (Jojoa-Unigarro, 2022). Debido a la presencia de otros metabolitos en el sustrato, los porcentajes de metano no pueden ubicarse entre los mencionados anteriormente, sino que el metano para estos reactores se encontró entre el 75 y 82 % con respecto al total de biogás generado.

El segundo metabolito con mayor concentración fue el ácido propiónico. Como se mostró en la Tabla 3.3 el propionato tiene un ΔG positivo y produce tres veces más hidrógeno que las demás reacciones; este hidrógeno debe consumirse para disminuir la presión parcial de hidrógeno y hacer factible la reacción de metanogénesis. De acuerdo con Jojoa-Unigarro (2022), a mayores concentraciones de propiónico se produce una acetogénesis incompleta, formándose ácidos

isobutírico, butírico, isovalérico y valérico. Según Wang *et al.* (2009), se logra una inhibición completa para concentraciones superiores de ácido propiónico de 1.4 g_{DQO}/L. Aunque para este caso específicamente, es un valor muy alto; es necesario recordar que el ácido propiónico se acumula, inhibe la metanización y promueve la formación de otros ácidos que también pueden inhibir el proceso (Lata *et al.*, 2002; Wainaina *et al.*, 2019; Mata-Álvarez, 2002). Además, Han *et al.* (2020), al trabajar con residuos de alimentos, concluyen que la presencia de ácido propiónico por encima de 0.45 g_{DQO}/L reduce la actividad metanogénica.

Metanización de los fermentos obtenidos con una carga orgánica de 3.7 g_{DQO}/L·d

Las curvas de producción de metano obtenidas a partir de esta CO en el reactor fermentativo tienen un comportamiento similar a las curvas derivadas de la condición anterior. Esta CO tuvo el menor tiempo de fermentación que los anteriores casos con 13 días. Bajo esta CO se lograron dos tiempos de retención de sólidos de poco más de seis días cada uno. En la composición del producto de la fermentación, igual que en la anterior condición, destaca la presencia de los ácidos acético y propiónico (Tabla 5.3).

Todas las curvas muestran una producción acelerada de metano durante el primer día, luego la velocidad de producción disminuye y va aumentando progresivamente en función de la concentración inicial de sustrato. Los valores finales identificados al día 25 se encuentran entre los 150 y 300 Nml de metano (Figura 5.5). Al sexto día la producción había cesado para las cuatro concentraciones. Se logró en una primera etapa de metanización una presencia de metano entre el 56 y 78 % del volumen generado en toda la prueba (comparar Figura 5.5 y Tabla 5.2). Las curvas no presentan un comportamiento diáuxico y en pocos días se generó una cantidad de metano significativa en relación con el total.

Es notorio que la etapa limitante no fue la acetogénesis pues los metabolitos se consumieron relativamente rápido, no se acumularon pues no se observa período de latencia en la Figura 5.5. La línea recta observada para todas las concentraciones durante el primer día y medio es un indicador de que el consumo de acetato (metabolito en mayor concentración) es rápido y, por ende, la producción de metano también. La producción endógena de metano no se ve afectada por los metabolitos acumulados: las pendientes de todas las curvas después del día 5 son paralelas y casi horizontales.

Metanización de los fermentos obtenidos con una carga orgánica de 4.9 g_{DQO}/L·d

Las concentraciones de sustrato fermentado bajo esta CO describen curvas de producción de metano similares a las obtenidas a partir de la CO 1.3 g_{DQO}/L·d. El producto de fermentación de esta carga trabajada por 20 días, con tiempo de retención de sólidos de 4.8 días, presentó una mayor concentración de ácidos láctico y valérico. Los demás metabolitos estuvieron presentes, pero en muy baja concentración (Tabla 5.3).

Las curvas muestran una producción continua de metano y en correspondencia con la concentración de sustrato alimentado, pero la producción no es tan rápida como en las otras cargas orgánicas. Al tercer día la producción de metano no llegaba al 50 % y al noveno día se había producido más del 70 % del metano generado en toda la prueba. En este caso, como no se observa un comportamiento lineal desde el momento de inicio, la etapa limitante se identifica como la acetogénesis. Existe una alta probabilidad de que el ácido láctico (metabolito en mayor concentración) se esté transformando en otros metabolitos de más tardada degradación para la generación de metano. Otro criterio aplicable a la descripción de estas curvas es que cuando la producción de biogás es progresiva, el acetato y el hidrógeno generado van siendo transformados en metano y en sus correspondientes curvas no se logra identificar las etapas de acetogénesis y metanización.

Los valores finales de metano son similares para las cargas orgánicas 1.3 y 4.9 g_{DQO}/L·d y para 2.6 y 3.7 g_{DQO}/L·d, con rangos de 160-540 Nml y 160-400 Nml, respectivamente. Se observa una producción de metano dependiente de la cantidad de sustrato presente en los reactores (ver Anexo 1); a mayor cantidad de sustrato menor presencia de metano (para todas las cargas orgánicas ensayadas). La mayor producción específica fue lograda bajo la CO de 3.7 g_{DQO}/L·d con más de 800 Nml/kg_{SV}. Es necesario tener en cuenta que la producción de metano varía según el tipo de sustrato y como para estas cuatro cargas orgánicas la concentración de metabolitos de fermentación no es la misma, los valores de metano no pueden asociarse directamente. Las mayores producciones durante el primer día corresponden a las cargas orgánicas 2.6 y 3.7 g_{DQO}/L·d (ácido acético en mayor concentración, comparar Tabla 5.3). Para el tercer día las mayores producciones se observan con los sustratos provenientes de las cargas orgánicas 1.3 y 4.9 g_{DQO}/L·d (ácido láctico en mayor concentración). A pesar de la variación en las cargas orgánicas y en la composición del sustrato para metanogénesis, los reactores con

concentraciones de 0.6 gsv tienen similar comportamiento; presentan una sola etapa de generación, pero difieren en el volumen de metano generado al final de la prueba. Las producciones de metano para cada CO tuvieron patrones diferentes. De acuerdo con Shen *et al.* (2013), si en la etapa de fermentación se produce una elevada concentración de metabolitos y el reactor metanógeno no se adecúa para recibir estas concentraciones, se puede presentar inhibición por sustrato o por producto o acidificación del reactor.

5.3.3 Producción específica de metano

En la Figura 5.6 se presenta la producción específica de metano calculada por regresión lineal y en la Tabla 5.4 el resumen de los resultados de esta linealización. La pendiente representa la producción específica de metano, calculada a partir de la producción final de metano y la concentración de sustrato inicial en los reactores de metanización; y la ordenada al origen representa, en teoría, la producción endógena por parte del inóculo ya que Jojoa-Unigarro y González-Martínez (2021) demostraron que la producción endógena del inóculo es dependiente del tipo/concentración de sustrato, por lo que no se puede establecer como una constante.

Se debe tener en cuenta que el sustrato afecta los microorganismos presentes en el inóculo de manera diferente, modificando sus rutas metabólicas durante y después de que se consume el sustrato, algunos generando diferentes productos durante la metanización y otros no siendo capaces de consumir estos productos en su totalidad. Esta es una de las razones por la cual no se determina la producción específica a partir de la resta de la curva del inóculo. La producción final de metano para cada concentración y CO se consideró en el punto de inflexión donde las pendientes de las curvas de producción cambian su comportamiento radicalmente y dan por terminada la reacción (ver Figura 5.5).

Tabla 5.4: Resultados de la linealización para producción específica de metano de la cáscara cruda y las cáscaras fermentadas. El % de aumento es con respecto a la cáscara cruda.

Carga orgánica (gdQO/L·d)	Pendiente (Prod. esp. de CH ₄ , Nml/gsv)	Ordenada al origen	Coefficiente de correlación (R ²)	% aumento
Cáscara sin fermentar*	99.6	66	0.993	NA
1.3*	210	51	0.999	110
2.6*	144	39	0.993	45
3.7	115	58	0.996	16
4.9	192	59	0.995	93

* se tomaron 3 de 4 concentraciones. NA: no aplica

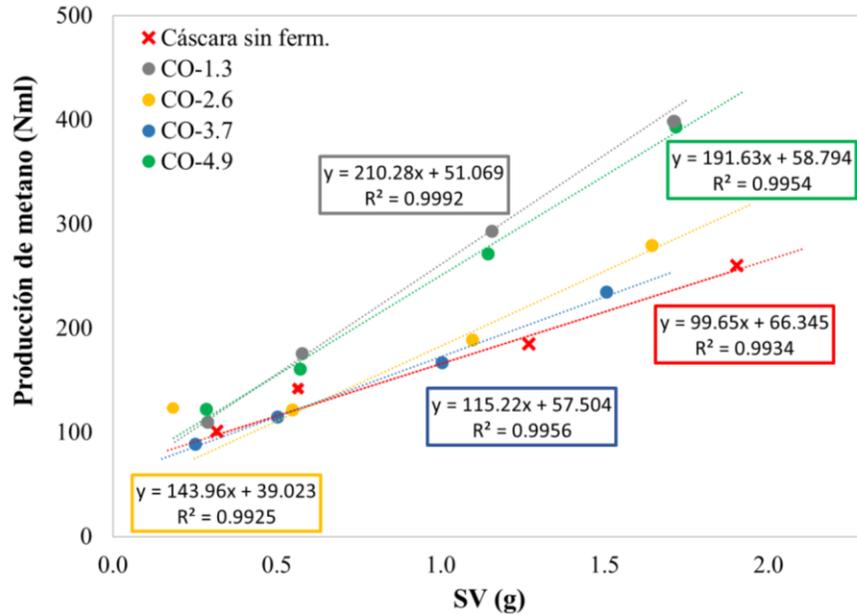


Figura 5.6: Producción específica de metano para la cáscara cruda y los digestatos de fermentación a partir de diferentes masas de sustrato.

La producción específica de metano solo tiene en cuenta tres concentraciones para la representación de las cáscaras crudas y las CO 1 y 2, ya que las concentraciones 1.3, 1.7 y 0.3 gsv respectivamente, mostraron comportamientos irregulares (ver Figura 5.5). Gráficamente (Figura 5.6) también puede observarse cómo estos valores se separan de la línea de tendencia que describen los datos; los coeficientes de correlación llegan a valores de 0.8 si se tienen en consideración estas concentraciones. Una comparativa general puede hacerse relacionando el comportamiento de las cargas orgánicas 1.3 y 4.9 y, por separado, 2.6 y 3.7 $g_{DQO}/L \cdot d$, con su contenido de metabolitos antes de la metanización. De acuerdo con la Tabla 5.4, las mayores producciones específicas se observan con los fermentos provenientes de las cargas orgánicas en 1.3 y 4.9 y, las menores, con 2.6 y 3.7 $g_{DQO}/L \cdot d$.

La producción específica de metano de las cáscaras sin fermentar es superada por todas las producciones de los fermentos producidos bajo cualquiera de las cargas orgánicas (Tabla 5.4). La menor producción específica se obtiene con la CO 3.7 $g_{DQO}/L \cdot d$, que logró un aumento de tan solo el 16 % sobre las cáscaras sin fermentar. Los productos de las fermentaciones bajo las otras cargas orgánicas superan la producción específica de las cáscaras sin fermentar en 45, 93 y 110 %. El material fermentado bajo la CO de 1.3 $g_{DQO}/L \cdot d$ proporciona la mayor producción específica de metano y se relaciona este valor con el tiempo de retención de sólidos que fue el

mayor de todos los experimentos con 50 días, lo que implica que los procesos hidrolíticos se desarrollaron durante largo tiempo. Al no identificarse ninguna pendiente negativa, se concluye que no existieron condiciones con inhibición.

Como se mencionó anteriormente, el inóculo se comportó de manera diferente dependiendo del sustrato. La ordenada al origen, identificada como la producción de sustrato endógeno, presenta valores similares en todos los casos (Tabla 5.4). Desde el inicio hasta el final de la reacción, la generación de metano es, principalmente por consumo de sustrato y, en menor escala, por consumo endógeno. La menor producción de sustrato endógeno la exhibe la CO de 2.6 g_{DQO}/L·d, cuyo producto contenía la mayor concentración ácidos acético y propiónico; este último metabolito pudo acumularse como parte de los productos de otras rutas metabólicas y causar problemas de inhibición. En el análisis de Jojoa-Unigarro (2022) sobre la metanización de ácido propiónico puro, se observa como la tendencia de producción específica para este metabolito es negativa lo que confirma su comportamiento como inhibidor.

La producción de metano a partir de la cáscara cruda y los digestatos previamente fermentados es directamente proporcional a la concentración del sustrato, evidencia de ello son los coeficientes de correlación (Tabla 5.4), donde para todos los casos se muestran muy cercanos a la unidad. Los coeficientes de correlación de 0.99 confirman la prácticamente nula dificultad que presentan los reactores al tratar de consumir el sustrato.

5.3.4 Análisis cinético de la producción de metano

En esta sección se realiza un análisis de la cinética de metanización de la primera fase de generación de metano. Se calcularon las pendientes iniciales de la producción de metano y se tomaron sus valores inversos, junto con los inversos de la concentración inicial de sustrato para construir un diagrama Lineweaver y Burk. La Tabla 5.5 muestra los parámetros cinéticos calculados a partir de las curvas de producción de metano teniendo en cuenta la tasa inicial de generación de metano. La tasa inicial comprende las primeras horas de reacción durante la metanización. El software Excel se utilizó para los cálculos.

Se utilizó la linealización que Lineweaver y Burk hacen al modelo de Michaelis y Menten para calcular la tasa de reacción máxima posible (V_{max}) y la constante K_m , la cual puede interpretarse como la afinidad de las enzimas por el sustrato; a mayor afinidad, menor valor de K_m .

Tabla 5.5: Parámetros cinéticos de las curvas de producción de metano de acuerdo con la linealización de Lineweaver y Burk.

Carga orgánica (gDQO/L·d)	Pendiente	Ordenada	V_{max} (Nml _{CH4} /L·d)	Km (g/L)	R ²	PEM
Cáscara sin ferm.	0.0132	0.0059	171	2.251	0.9991	100
1.3	0.0140	0.0099	101	1.409	0.9137	210
2.6	0.0062	0.0071	140	0.869	0.9704	144
3.7	0.0167	0.0093	108	1.806	0.9664	115
4.9	0.0171	0.0109	92	1.573	0.9564	192

PEM: Producción específica de metano (Nml/g_{sv})

El sustrato de referencia para la metanización es la cáscara sin fermentar, la cual presenta la V_{max} más elevada con 171 ml_{CH4}/L·d, un coeficiente de correlación cercano a la unidad y la Km más elevada de 2.25 g/L. Ninguno de los productos de las fermentaciones bajo diferentes cargas orgánicas logra superar la V_{max} de la cáscara cruda. Durante las primeras horas de reacción los digestatos fermentados no producen metano de manera acelerada como la cáscara cruda. Sin embargo, la producción específica de metano (PEM) para todos los otros casos es superior con relación a la cáscara cruda.

Los valores de V_{max} más altos los presentan los digestatos provenientes de las cargas orgánicas 2.6, 3.7 y 1.3 gDQO/L·d, con valores de 140, 108 y 101 Nml_{CH4}/L·d, respectivamente. La primera, tercera y cuarta cargas orgánicas presentan valores de V_{max} y Km similares, por lo que se concluye que estas condiciones producen metano a un ritmo y afinidad (del sustrato al inóculo) equivalentes; la presencia de los ácidos láctico y propiónico en estos reactores dificultan la metanización, como se explicó en el Capítulo 5.2 (ver además Tabla 5.3). La V_{max} más baja la presenta los sustratos correspondientes con la más alta CO. Los productos de la segunda CO llevados a metanización presentaron la V_{max} más alta y la Km más baja, es decir, la mejor afinidad; esto es consecuente con los contenidos de ácido acético en este sustrato (ver Tabla 5.3) y las curvas de producción de metano descritas en la Figura 5.5. El resto de los valores de Km mostraron reducciones respecto a la cáscara sin fermentar, lo que implica un aumento en la afinidad.

La Figura 5.7 compara los resultados de la modelación y los valores experimentales alcanzados durante la metanización. Las líneas punteadas indican el ajuste del modelo de Michaelis y Menten y los marcadores (cruces) indican los valores experimentales obtenidos. Los valores de

K_m y V_{max} que se emplearon en la modelación cinética son los mostrados en la Tabla 5.5. La variable tiempo de fermentación no genera efectos considerables en la V_{max} y la K_m , por lo que no se puede establecer una relación entre estas variables y el tiempo de fermentación. La fracción sólida implícita en los sustratos fermentados contenía material orgánico de difícil degradación, el cual finalmente se metaniza, pero a tasas mucho más bajas. El modelo presenta un buen ajuste a las condiciones y a los datos experimentales, con más del 91 % para todos los casos. En general el modelo de Michaelis y Menten se ajusta a los resultados obtenidos correctamente por lo que se puede emplear para simular la metanización de los sustratos producidos durante la fermentación, a diferentes cargas orgánicas, de la cáscara de la mazorca del cacao.

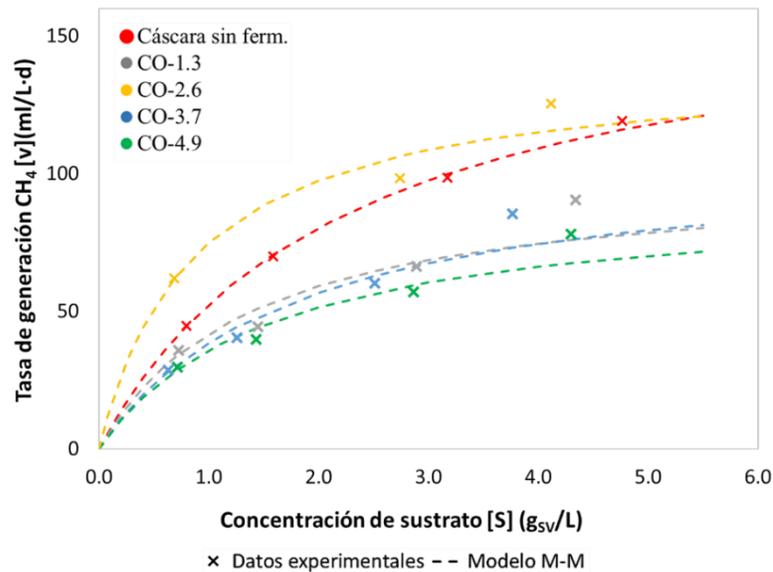


Figura 5.7: Comparación entre los valores experimentales y el modelo de Michaelis y Menten para la producción de metano a partir de la cáscara cruda y los digestatos fermentados.

5.3.5 Metabolitos remanentes después de la metanización

Los metabolitos presentes al inicio de cada metanización fueron: ácidos láctico, acético, propiónico, butírico y valérico, en diferentes concentraciones (Tabla 5.3). La identificación de metabolitos luego de la metanización muestra que no se produjeron otros subproductos y que todos los metabolitos, luego de 25 días fueron consumidos por completo únicamente en los frascos que contenían la menor concentración de sustrato. En los frascos con concentraciones superiores, sólo fue detectado ácido acético. Las concentraciones detectadas en los frascos con mayor contenido de sustrato presentaron valores superiores a 6.5 y menores a 35.8 mg_{DQO}/L.

Estas concentraciones incrementaron a medida que aumentó la concentración de sustrato en los frascos. La presencia exclusiva de ácido acético sugiere que los metabolitos presentes al inicio del proceso tuvieron tiempo suficiente durante la metanización para ser transformados en metabolitos intermediarios y finalmente en metano (ver Tabla 3.3); y que probablemente un tiempo prolongado de metanización ocasionaría un valor final de metano superior por la presencia remanente del ácido acético, es decir, por la producción endógena del sustrato presente.

5.3.6 Valores de pH inicial y final en la metanización

Se determinaron los valores de pH al final del proceso de metanización (después de 25 días). La Figura 5.8 muestra los valores de pH obtenidos en cada reactor para la cáscara sin fermentar y las cuatro cargas orgánicas ensayadas. En general se observó una tendencia en donde, el aumento de las cargas orgánicas y el aumento de la concentración de sustrato provoca que los valores de pH en los reactores disminuyan.

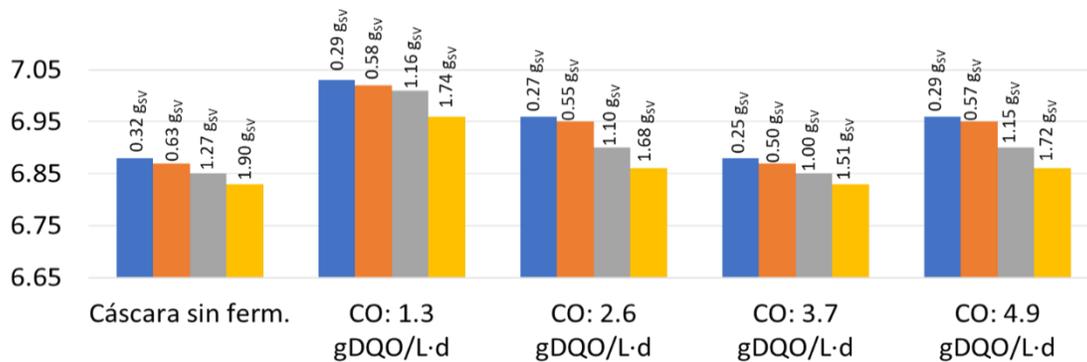


Figura 5.8: Valores de pH en cada reactor al final de la metanización.

El pH inicial corresponde al valor promedio determinado a partir de los reactores antes del inicio de la metanización. Se considera que todos los reactores operaron bajo las mismas condiciones, con pH inicial de 7.01 (obtenido mediante una solución buffer de fosfatos). Los valores de pH registrados al final de cada metanización fueron superiores a 6.83 e inferiores a 7.03. El menor pH lo presentaron las concentraciones más altas de la cáscara sin fermentar y la CO de 3.7 gDQO/L·d.

De acuerdo con Jojoa-Unigarro (2022), los metabolitos detectados al inicio de la metanización no son capaces de ocasionar cambios drásticos en el pH; los cambios se pueden observar de forma gradual, algunas veces de hasta 0.2 unidades de pH a medida que las concentraciones

incrementan. Las disminuciones del pH al aumentar la CO se consideran pequeñas y se concluye que dichas variaciones de pH no afectaron la producción de metano.

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

Con base en los resultados de investigación es posible concluir que la hipótesis planteada en este trabajo es verdadera si se tiene en cuenta la producción específica de metano a partir de los digestatos previamente fermentados.

- La cáscara de cacao considerada como residuo contiene elevadas concentraciones de fibra y carbohidratos simples.
- La fermentación de la cáscara del cacao, como primera etapa de la digestión anaerobia, permite la hidrólisis del sustrato y produce metabolitos considerados importantes para un posterior proceso de metanización, independientemente de la carga orgánica a la que se somete la cáscara cruda.
- La concentración de metabolitos producidos durante la fermentación disminuye al aumentar la carga orgánica. Esto se relaciona con la reducción de los tiempos de reacción al aumentar la carga orgánica.
- Las cargas orgánicas iniciales logran la mayor transformación de DQO disuelta en metabolitos de interés para la fermentación (ácidos láctico, acético, propiónico, butírico y valérico).
- El grado de fermentación es inversamente proporcional a la carga orgánica.
- La producción de metano aumenta con la disminución de la concentración de sustrato y es independiente del tiempo de residencia de sólidos dentro del reactor de fermentación.
- La producción endógena de metano se puede determinar de manera confiable mediante la linealización de los valores de producción específica de metano. Esta producción depende de las características del sustrato y no se puede considerar constante.

-
- La presencia de metabolitos como ácido propiónico, butírico y valérico al comienzo de la metanización de las cáscaras fermentadas provocan tasas iniciales de generación de metano inferiores a la cáscara cruda.
 - Todos los metabolitos detectados en la fermentación, excepto ácido acético, se consumen durante la metanización provocando producciones de metano superiores respecto a la cáscara cruda.
 - Las constantes cinéticas obtenidas con el modelo de Michaelis y Menten, y los excelentes coeficientes de correlación confirman la calidad de los resultados experimentales.

CAPÍTULO 7. REFERENCIAS

- Abdel-Shafy, H.I., Mansour, M.S.M., (2014). Biogas production as affected by heavy metals in the anaerobic digestion of sludge. *Egyptian Journal of Petroleum*. 23(4). 409–417. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2014.09.009>.
- Abedi, E., Hashemi, S.M.B., (2020). Lactic acid production - producing microorganisms and substrates sources-state of art. *Heliyon*. 6(10). DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e04974.
- Adejinmi, O.O., Hamzat, R.A., Fapohunda, J.B., (2021). Performance and nutrient digestibility of rabbits fed fermented and unfermented cocoa pod husk. *Nigerian Journal of Animal Production*. 34. 63-68. <https://doi.org/10.51791/njap.v34i1.2422>.
- Adekunle, K., Okolie, J., (2015). A Review of Biochemical Process of Anaerobic Digestion. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 6(3). 205-212. DOI: [10.4236/abb.2015.63020](https://doi.org/10.4236/abb.2015.63020).
- Adeyeye, S.A., Ayodele, S.O., Oloruntola, O.D., Agbede, J.O., (2019). Processed cacao pod husk dietary inclusion: Effects on the performance, carcass, haematogram, biochemical indices, antioxidant enzyme and histology of the liver and kidney in broiler chicken. *Bull. Natl. Res. Cent*. 43(54).
- Afoakwa, E.O., (2010). Chocolate science and technology. *Choc. Sci. Technol*. <https://doi.org/10.1002/9781444319880>.
- Aguilera, E., (2018). Generación de biogás mediante el proceso de digestión anaerobia a partir del aprovechamiento de sustratos orgánicos. *Revista Científica de FAREM-Estelí*.
- Al Seadi, T., Ruiz, D., Prassl, H., Kottner, M., Finsterwaldes, T., Volke, S., Janssens, R., (2008). *Handbook of Biogas*. University of Southern Denmark, Esbjerg.
- Alemawor, F., Dzogbefia, V. P., Oddoye, E.O.K., Oldham, J.H., (2009). Effect of *Pleurotus ostreatus* fermentation on cocoa pod husk composition: Influence of fermentation period and Mn²⁺ supplementation on the fermentation process. *African journal of biotechnology*. 8. 1950-1958.
- Alemawor, F., Dzogbefia, V.P., Oddoye, E.O.K., Oldham, J.H., (2009). Enzyme cocktail for enhancing poultry utilisation of cocoa pod husk. *Sci. Res. Essay*. 4. 555–559.
- Allen, E., Wall, D., Herrmann, C., Murphy, J., (2016). A detailed assessment of resource of biomethane from first, second and third generation substrates. *Renewable Energy*. 87. 656-665. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.10.060>.
- Ameyaw, L. K., Ettl, G. J., Leissle, K., Anim-Kwapong, G. J., (2018). Cocoa and climate change: Insights from smallholder cocoa producers in Ghana regarding challenges in implementing climate change mitigation strategies. *Forests*. 9(12). 742. <https://doi.org/10.3390/f9120742>.
- Anderson, G.K., Kasapgil, B., Ince, O., (1994). Microbiological study of two stage anaerobic digestion start-up. *Water Res*. 28. 2383–2392.

- Andini, A., Bonnet, S., Rousset, P., Hasanudin, U., (2018). Impact of Open Burning of Crop Residues on Air Pollution and Climate Change in Indonesia. *Current Science*. 115(12). 2259-2266. <https://www.jstor.org/stable/pdf/26978589.pdf>.
- Angelidaki, I., Chen, X., Cui, J., Kaparaju, P., Ellegaard, L., (2006). Thermophilic anaerobic digestion of source-sorted organic fraction of household municipal solid waste: Start-up procedure for continuously stirred tank reactor. *Water Research*. 40(14). 2621–2628. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.05.015>.
- Antwi, E., Engler, N., Nelles, M., Schüch, A., (2019). Anaerobic digestion and the effect of hydrothermal pretreatment on the biogas yield of cocoa pods residues. *Waste management (New York, N.Y.)*. 88. 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.03.034>.
- Anvoh, K.Y.B., Zoro, B.I., Gnakri, D., (2009). Production and Characterization of Juice from Mucilage of Cocoa Beans and its Transformation into Marmalade. *Pakistan Journal of Nutrition*. 8(2). 129–133. <https://scialert.net/abstract/?doi=pjn.2009.129.133>.
- AOAC, (2004). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 19th ed. Gaithersburg, Md.: AOAC International. ISBN: 978-0-935584-83-7.
- APHA, (2005). *Standard methods for the examination of water and wastewater 21a ed.* American Public Health Association, American Water Works Association & Water Pollution Control Federation. Washington D.C., EEUU.
- Aregheore, E.M., (2002). Chemical evaluation and digestibility of cocoa (*Theobroma cacao*) byproducts fed to goats. *Tropical animal health and production*. 34(4). 339–348. <https://doi.org/10.1023/a:1015638903740>.
- Arteaga, Y., (2017). Estudio Del Desperdicio Del Mucílago De Cacao En El Cantón Naranjal (Provincia Del Guayas). *ECA Sinergia*. 4. 49–59. <http://revistas.utm.edu.ec/index.php/ECASinergia/article/view/149/119>.
- Aslanzadeh, S., Rajendran, K., Taherzadeh, M.J., (2014). A comparative study between single- and two-stage anaerobic digestion processes: effects of organic loading rate and hydraulic retention time. *Int. Biodeterior. Biodegrad*. 95. 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.06.008>.
- Atasoy, M., Eyice, O., Schnürer, A., Cetecioglu, Z., (2019). Volatile fatty acids production via mixed culture fermentation: revealing the link between pH, inoculum type and bacterial composition. *Bioresour. Technol*. 292. 121889. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121889>.
- Azbar, N., Speece, R., (2001). Two-Phase, Two-Stage, and Single-Stage Anaerobic Process Comparison. *Journal of Environmental Engineering*. 127. 240-248. https://www.researchgate.net/publication/245300371_Two-Phase_Two-Stage_and_Single-Stage_Anaerobic_Process_Comparison.
- Azbar, N., Ursillo, P., Speece, R. E., (2001). Effect of process configuration and substrate complexity on the performance of anaerobic processes. *Water research*. 35(3). 817–829. [https://doi.org/10.1016/s0043-1354\(00\)00318-3](https://doi.org/10.1016/s0043-1354(00)00318-3).
- Baird, R., Bridgewater, L., (2017). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 23rd edition. Washington, D.C. American Public Health Association.
- Barazarte, H., Sangronis, E., Unai, E., (2008). La cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.): una posible fuente comercial de pectinas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 58(1). 64–70. ISSN: 0004-0622.
- Berg, I.A., Kockelkorn, D., Ramos-Vera, W.H., Say, R.F., Zarzycki, J., Hügler, M., Albert, B.E., Fuchs, G., (2010). Autotrophic carbon fixation in archaea. *Nature Reviews Microbiology*. 8(6). 447–460.
- Bhatia, S.K., Yang, Y.H., (2017). Microbial production of volatile fatty acids: current status and future perspectives. *Rev Environ Sci Biotechnol*. 16. 327–345. <https://doi.org/10.1007/s11157-017-9431-4>.

- Bobiles, S.C., Elegado, F.B., Millena, C.G., Merca, F.E., (2022). Small-scale cacao (*Theobroma cacao* L.) fermentation process utilizing cacao pod husk. *Food Research*. 6(4). 236-245. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.6\(4\).502](https://doi.org/10.26656/fr.2017.6(4).502).
- Bogner, J., Pipatti, R., Hashimoto, S., Diaz, C., Mareckova, K., Diaz, L., Kjeldsen, P., Monni, S., Faaij, A., Gao, Q., Zhang, T., Ahmed, M. A., Sutamihardja, R. T., Gregory, R., (2008). Mitigation of global greenhouse gas emissions from waste: conclusions and strategies from the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) Fourth Assessment Report. Working Group III (Mitigation). *Waste Management & Research*. 26(1). 11–32. <https://doi.org/10.1177/0734242X07088433>.
- Boone, D.R., Whitman, W.B., Rouviere, P., (1993). Diversity and taxonomy of methanogens. In: Ferry JG (ed) *Methanogenesis ecology, physiology, biochemistry & genetics*. Chapman & Hall. New York. 35–80.
- Bühlmann, C., Mickan, B., Tait, S., Renton, M., Bahri, P., (2020). Lactic acid from mixed food wastes at a commercial biogas facility: Effect of feedstock and process conditions. *Journal of Cleaner Production*. 284. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.125243>.
- Buratti, S., Benedetti, S., (2016). Chapter 28: Alcoholic fermentation using electronic nose and electronic tongue. 291–299 in *Electronic Noses and Tongues in Food Science*. Academic Press.
- Campuzano, R., González-Martínez, S., (2015). Extraction of soluble substances from organic solid municipal waste to increase methane production. *Bioresource technology*. 178. 247–253. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.042>.
- Cardona, M., Sorza, J., Posada, S., Carmona, J., Ayala, S., Álvarez, O., (2002). Establecimiento de una base de datos para la elaboración de tablas de contenido nutricional de alimentos para animales. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 7.
- Carrillo, B., Valenzuela, J., (2015). Estudio de las posibilidades de peletización de la cáscara de cacao y su utilización como biocombustible. Universidad de Guayaquil. Guayaquil-Ecuador.
- Carrillo-Nieves, D., Rostro, M.J.A., de la Cruz, R.Q., Ruiz, H.A., Iqbal, H.M.N., Parra-Saldívar, R., (2019). Current status and future trends of bioethanol production from agro-industrial wastes in Mexico. *Renew. Sustain. Energy Rev*. 102. 63–74. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2018.11.031>.
- Castellón-Zelaya, M.F., (2021). Ensilado de residuos sólidos orgánicos urbanos para la producción de biogás. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Castellón-Zelaya, M.F., González-Martínez, S., (2021). Silage of the organic fraction of municipal solid waste to improve methane production. *Water Science and Technology*. 83. <https://doi.org/10.2166/wst.2021.148>.
- Castillo, E., Álvarez, C., Contreras, Y., (2018). Caracterización fisicoquímica de la cáscara del fruto de un clon de cacao (*Theobroma cacao* L.) Cosechados en Cauca, estado Miranda. Venezuela. *Rev. Invest*. 42. 154–176.
- CEDRSSA. Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sostenible y la Soberanía Alimentaria, (2020). *Industria del cacao en México*. Reporte en Cámara de Diputados LXIV Legislatura, Palacio Legislativo de San Lázaro, Ciudad de México. http://www.cedrssa.gob.mx/post_industria_del_n-cacao_en_mn-xico-n.htm.
- Chafla, A.L., Rodríguez, Z., Boucourt, R., Torres, V., (2016). Caracterización bromatológica de la cáscara de cacao (*Theobroma cacao*), procedente de siete cantones de la Amazonia, Ecuador. *Cuban Journal of Agricultural Science*. 50(2).
- Chang, H.N., Kim, N.J., Kang, J., Jeong, C.M., (2010). Biomass-derived volatile fatty acid platform for fuels and chemicals. *Biotechnol. Bioproc. Eng*. 15. 1–10. <https://doi.org/10.1007/s12257-009-3070-8>.
- Chávez-Porras, Á., Rodríguez-González, A., (2016). Aprovechamiento de residuos orgánicos agrícolas y forestales en Iberoamérica. *Academia Y Virtualidad*. 9(2). 90–107. <https://doi.org/10.18359/ravi.2004>.

- Choi, B., Rempala, G.A., Kim, J.K., (2017). Beyond the Michaelis-Menten equation: accurate and efficient estimation of enzyme kinetic parameters. *Nat Sci Rep.* 142. 115–128. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17072-z>.
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., (2013). Fermentation. *Encyclopedia of Ecology.* 2. 1548-1558. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier.
- Cohen, A., Breure, A.M., van Andel, J.G., van Deursen, A., (1980). Influence of phase separation on the anaerobic digestion of glucose-1: maximum COD turnover rate during continuous operation. *Water Res.* 14. 1439.
- Conrad, R., (2009). The global methane cycle: Recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environ. Microbiol. Rep.* 1:285–292.
- Corrales, L. C., Antolinez, D.M.R., Bohórquez, J.A.M., Corredor, A.M.V., (2015). Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *Nova.* 13(24). 55-81. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S179424702015000200007&lng=en&tlng=es.
- Costa, K.C., Leigh, J.A., (2014). Metabolic versatility in methanogens. *Current opinion in biotechnology.* 29. 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.02.012>.
- Crossette, B., (2011). Estado de la Población Mundial 2011. www.unfpa.org/sites/default/files/pub-pdf/SPSWOP2011_Final.pdf.
- Crutzen, P.J., Andreae, M.O., (1990). Biomass Burning in the Tropics: Impact on Atmospheric Chemistry and Biogeochemical Cycles. *Science* 250. 1669-1678. <https://doi.org/10.1126/science.250.4988.1669>.
- Daniyan, I.A., Adeodu, A.O., Adewumi, D.F., (2014). Design of a Processor for the Production of 30,000 Tons of Caustic Potash per Anum from Cacao Pod. *Int. J. Sci. Res.* 3. 691–700.
- Daud, Z., Awang, H., Mohd Kassim, A.S., Mohd Hatta, M.Z., Mohd Aripin, A., (2014). Cacao Pod Husk and Corn Stalk: Alternative Paper Fibres Study on Chemical Characterization and Morphological Structures. *Adv. Mater. Res.* 911. 331–335.
- De Baere, L., (2000). Anaerobic digestion of solid waste: state-of-the-art. *Water Sci Technol.* 41(3). 283–290. <https://doi.org/10.2166/wst.2000.0082>.
- Demirel, B., Scherer, P., (2008). The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. *Rev Environ Sci Biotechnol.* 7. 173–190. <https://doi.org/10.1007/s11157-008-9131-1>.
- Demirel, B., Yenigün, O., (2002). Two-phase anaerobic digestion processes: A review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 77. 743 - 755. <https://doi.org/10.1002/jctb.630>.
- Detman, A., Mielecki, D., Pleśniak, Ł., Bucha, M., Janiga, M., Matyasik, I., Chojnacka, A., Jędrysek, M-o., Błaszczak, M.K., Sikora, A., (2018). Methane-yielding microbial communities processing lactate-rich substrates: a piece of the anaerobic digestion puzzle. *Biotechnol Biofuels* 11. 116. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1106-z>.
- Devi, S., Gupta, C., Jat, S., Parmar, M., (2017). Crop residue recycling for economic and environmental sustainability: The case of India. *Open Agriculture.* 2(1). 486-494. <https://doi.org/10.1515/opag-2017-0053>.
- DOF. Diario Oficial de la Federación, (2003). Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos. (LGPGIR). Ley publicada en el Diario Oficial de la Federación. México.
- Dogan, T., Ince, O., Oz, N., Ince, B., (2005). Inhibition of Volatile Fatty Acid Production in Granular Sludge from a UASB Reactor. *Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering.* 40. 633-44. <https://doi.org/10.1081/ESE-200046616>.

- Donkoh, A., Atuahene, C.C., Wilson, B.N., Adomako, D., (1991). Chemical composition of cocoa pod husk and its effect on growth and food efficiency in broiler chicks. *Animal Feed Science and Technology* (Netherlands). 35. 161–169.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28. 350-356.
- Dwidar, M., Park, J.-Y., Mitchell, R.J., Sang, B.-I., (2012). The Future of Butyric Acid in Industry, *Sci. World J.* 1–10. <https://doi.org/10.1100/2012/471417>.
- Edwiges, T., Frare, L.M., Lima Alino, J.H., Triolo, J.M., Flotats, X., Silva de Mendonça, M.S., (2020). Methane potential of fruit and vegetable waste: an evaluation of the semi-continuous anaerobic mono-digestion, *Environmental Technology*. 41:7. 921-930. <https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1515262>.
- Fernández-Rodríguez, J., Pérez, M., Romero, L.I., (2013). Comparison of mesophilic and thermophilic dry anaerobic digestion of OFMSW: Kinetic analysis. *Chemical Engineering Journal*. 232. 59-64.
- Ferrão-Gonzales, A.D., Vital, A.V.D., Lima, J.M., Rodrigues, M.B.S., (2013). Desenvolvimento sustentável para o resgate da cultura do cacau baseado no aproveitamento de resíduos. *Interfaces Científicas - Saúde E Ambiente*. 1(2). 41–52. <https://doi.org/10.17564/2316-3798.2013v1n2p41-52>.
- Ferry, J.G., Kstead, K.A., (2007). Methanogenesis. *Archaea: Molecular and Cellular Biology*, ed Cavicchioli R (ASM Press, Washington, DC). 288–314.
- Figueira, A., Janick, J., BeMiller, J.N., (1993). New products from *Theobroma cacao*: seed pulp and pod gum. In: Janick, J., Simin, J.E. (Eds.). *New Crops*. Wiley, New York. 475–478.
- Forero-Nuñez, C.A., Jochum, J., Vargas, F.E.S., (2015). Effect of particle size and addition of cacao pod husk on the properties of sawdust and coal pellets. *Ing. Investig.* 35. 17–23.
- Fridarti, N., Jamarun, M., Zein, M., Ningrat, R.W.S., (2017). The use of waste cacao (*Theobroma cacao* L) fermentation as a substitute for forage to cattle sheep performance. *Scholars Journal of Agriculture and Veterinary Sciences*. 4(6). 230-235. https://www.researchgate.net/publication/329426549_The_use_of_waste_cacao_Thiobrome_cacaoL_fermentation_as_substitute_for_forage_to_cattle_sheep_performance.
- García-Aguirre, J., Aymerich, E., González-Martínez, de Goñi J., Esteban-Gutiérrez, M., (2017) Selective VFA production potential from organic waste streams: assessing temperature and pH influence, *Bioresour. Technol.* 244.1081–1088. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.187>.
- García-Torres, A.M., Torres-Sáe, R.G., (2003). Producción de enzimas lignolíticas por Basidiomycetes mediante la técnica de fermentación en sustrato sólido. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 1. 56–64.
- Gbohaida, V., Mossi, I., Adjou, E.S., Dossa, C.P.A., Wotto, D.V., Avlessi, F., Sohounhloue, D.C., (2016). Évaluation du pouvoir fermentaire de *Saccharomyces cerevisiae* et de *S. carlsbergensis* dans la production de bioéthanol à partir du jus de la pomme cajou. *Journal of Applied Biosciences*. 101(1). 9643–9652.
- Gerardi, M.H., (2003). *The Microbiology of Anaerobic Digesters*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken. <http://dx.doi.org/10.1002/0471468967>.
- Ghosh, S., Klass, D.L., (1978). Two-phase anaerobic digestion. *Proc. Biochem.* 15(2).
- González, C., Jaimés, M., (2005). Desarrollo experimental del proceso para la obtención de jugo derivado del mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L.). Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.
- González, M., Hernández, F., Perea, M., (2015). Efecto del sustrato en la liberación de CO₂ por: *Saccharomyces cerevisiae*. Universidad Nacional Autónoma de México. http://www.feriadelasciencias.unam.mx/anteriores/feria21/feria283_01_efecto_del_sustrato_en_la_liberacion_de_co2_por_s_.pdf

- González-Gil, L., Mauricio-Iglesias, M., Carballa, M., Lema J.M., (2018). Why are organic micropollutants not fully biotransformed?. A mechanistic modelling approach to anaerobic systems. *Water Res.* 142.115–128. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.05.032>.
- Graziani de Fariñas, L., Ortiz de Bertorelli, L., Angulo, J., Parra, P., (2002). Características físicas del fruto de cacao tipos *criollo*, *forastero* y *trinitario* de la localidad de cumboto, venezuela. *Agronomía Tropical*. 52(3). 343-362. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002192X2002000300006&lng=es&tlng=es.
- Grazzo, C.A., (2015). Caracterización físicoquímica de los lixiviados del cacao y café del litoral ecuatoriano, como potenciales fuentes de producción de bioetanol.
- Grimaldi, M.P., Marques, M.P., Laluce, C., Cilli, E.M., Regina, S., Sponchiado, P., (2015). Biotechnology for biofuels evaluation of lime and hydrothermal pretreatments for efficient enzymatic hydrolysis of raw sugarcane bagasse. *Biotechnol. Biofuels.* 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0384-y>.
- Gu, X.Y., Liu, J.Z., Wong, J.W.C., (2018). Control of lactic acid production during hydrolysis and acidogenesis of food waste, *Bioresour. Technol.* 247. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.166>.
- Güemes-Vera, N., Ríos-Pérez, F., Soto-Simental, S., Quintero-Lira, A., Piloni-Martini, J., (2020). Harina de cáscara de vaina de cacao: Una opción para el aprovechamiento de residuos agroindustriales. *Boletín De Ciencias Agropecuarias Del ICAP.* 6(11). 5-7. <https://doi.org/10.29057/icap.v6i11.5322>.
- Gujer, W., Zehnder, A.J., (1983). Conversion processes in anaerobic digestion. *Water science and technology.* 15(8-9). 127-167.
- Han, Y., Green, H., Tao, W., (2020). Reversibility of propionic acid inhibition to anaerobic digestion: Inhibition kinetics and microbial mechanism. *Chemosphere.* 255. 126840. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126840>.
- Han, Y., Green, H., Tao, W.D., (2020). Reversibility of propionic acid inhibition to anaerobic digestion: inhibition kinetics and microbial mechanism. *Chemosphere.* 255. 126840. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126840>.
- Harsono, S., (2019). Coffee Husk Biopellet Characteristics as Solid Fuel for Combustion Stove. *Environmental Science: Current Research.* 2. 1-6. [10.24966/ESCR-5020/100004](https://doi.org/10.24966/ESCR-5020/100004).
- Hedderich, R., Whitman, W.B., (2013). Physiology and Biochemistry of the Methane-Producing Archaea. In: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30141-4_81.
- Henze, M., van Loosdrecht, M. C., Ekama, G. A., & Brdjanovic, D., (2008). *Biological wastewater treatment*. IWA publishing.
- Huang, X.F., Shen, C., Liu, J., Lu, L., (2015). Improved volatile fatty acid production during waste activated sludge anaerobic fermentation by different bio-surfactants. *Chemical Engineering Journal.* 264. 280-290. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.11.078>.
- IDAE. Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía, (2007). *Biomasa: digestores anaerobios. Energía de la Biomasa*.
- IEA. International Energy Agency, (2010). *Sustainable Production of Second-Generation Biofuels*.
- Igbinador, R., (2009). Other Tropical Fruit Vinagers. En L. Solieri, & P. Giudici, *Vinegars on the World*. 263-264. Verlag-Italia: Springer. https://books.google.es/books?id=XuPWgEMx_eIC&pg=PA262&lpg=PA262&dq=cocoaf
- Ilmén, M., Koivuranta, K., Ruohonen, L., Suominen, P., Penttilä, M., (2007). Efficient production of L-lactic acid from xylose by *Pichia stipitis*. *Applied and environmental microbiology.* 73(1). 117-123. <https://doi.org/10.1128/AEM.01311-06>.

- INEN. Instituto Ecuatoriano de Normalización, (2006). NTE INEN 176:2006. Cacao en grano. Requisitos (Norma Técnica Ecuatoriana Obligatoria). Quito, Ecuador.
- Iram, A, Berenjjan, A., Demirci, A., 2021. A Review on the Utilization of Lignin as a Fermentation Substrate to Produce Lignin-Modifying Enzymes and Other Value-Added Products. *Molecules*. 26, 2960. <https://doi.org/10.3390/molecules26102960>.
- Jenkins, B.M., Williams, R.B., Adams, L.S., Peace, C., Petersen, G., Leary, M., (2008). Current Anaerobic Digestion Technologies Used for Treatment of Municipal Organic Solid Waste. *Calif. Integr. Waste Management*. 125.
- Jojoa-Unigarro, G.D, (2022). Fermentación ácida de residuos sólidos orgánicos municipales durante la producción de biogas. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Jojoa-Unigarro, G.D., González-Martínez, S., (2021). Kinetic analysis of the methanization of the byproducts from OFMSW fermentation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. <https://doi.org/10.1002/jctb.6921>.
- Jones, R., Massanet-Nicolau, J., Guwy, A., Premier, G., Dinsdale, R., Reilly, M., (2015). Removal and recovery of inhibitory volatile fatty acids from mixed acid fermentations by conventional electrodialysis. *Bioresour. Technol.* 189. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.001>.
- Jördening H., Winter, J., (2005). *Environmental Biotechnology: Concepts and Applications*. John Wiley & Sons. 1-23. 355-374.
- Kalvathev, Z., Garzaro, D., Cedezo, F., (1998). *Theobroma cacao* L.: Un nuevo enfoque para nutrición y salud. *Revista agroalimentaria*. 4(6). 23-25. ISSN 1316-0354
- Kandylyis, P., Bekatorou, A., Pissaridi, K., Lappa, K., Dima, A., Kanellaki, M., Koutinas, A.A., (2016). Acidogenesis of cellulosic hydrolysates for new generation biofuels. *Biomass and Bioenergy*. 91. 210–216. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.05.006>.
- Kemausuor, F., Kamp, A., Thomsen, S.T., Bensah, E.C., Stergård, H., (2014). Assessment of biomass residue availability and bioenergy yields in Ghana. *Resour. Conserv. Recycl.* 86. 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2014.01.007>.
- Khalid, A., Arshad, M., Anjum, M., Mahmood, T., Dawson, L., (2011). The anaerobic digestion of solid organic waste. *Waste Manage.* 31 (8). 1737–1744. <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2011.03.021>.
- Khanal, S. K., (2008). *Anaerobic biotechnology for bioenergy production: principles and applications*. John Wiley & Sons. DOI:10.1002/9780813804545.
- Kim, S.M., Dien, B.S., Singh, V., (2016). Biotechnology for biofuels promise of combined hydrothermal / chemical and mechanical refining for pretreatment of woody and herbaceous biomass. *Biotechnol. Biofuels*. 2. 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0505-2>.
- Kotsyurbenko, O.R., Glagolev, M.V., Nozhevnikova, A.N., Conrad, R., (2001). Competition between homoacetogenic bacteria and methanogenic archaea for hydrogen at low temperature. *FEMS Microbiology Ecology*. 38(2-3). 153–159. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2001.tb00893.x>
- Kreuger, E., Nges, I.A., Björnsson, L., (2011). Ensiling of crops for biogas production: effects on methane yield and total solids determination. *Biotechnology for Biofuels* 4(44).
- Kumar, H., Kumar, P., Yadav, A.K., (2018). Crop Residue Burning: Impacts on Air Quality, Health and Climate Change Modelling using Geospatial Technology: A Review. *Int. J. Creat. Res. Thoughts*. 6. 524–534. 10.1729/IJCRT.17571.
- Kwietniewska, E., Tys, J., (2014). Process characteristics, inhibition factors and methane yields of anaerobic digestion process, with particular focus on microalgal biomass fermentation. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 34. 491–500. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.03.041>.
- Lachenaud, P., Paulin, D., Ducamp, M., Thevenin, J.M., (2007). Twenty years of agronomic evaluation of wild cocoa trees (*Theobroma cacao* L.) from French Guiana. *Scientia Horticulturae*. 113. 313-321. 10.1016/j.scienta.2007.05.016.

- Lang, K., Schuldes, J., Klingl, A., Poehlein, A., Daniel, R., Brunea, A., (2015). New mode of energy metabolism in the seventh order of methanogens as revealed by comparative genome analysis of “*Candidatus methanoplasma termitum*”. *Applied and environmental microbiology*. 81(4). 1338–1352. <https://doi.org/10.1128/AEM.03389-14>.
- Lata, K., Rajeshwari, K., Pant, D.C., Kishore, V.V.N., (2002). Volatile fatty acid production during anaerobic mesophilic digestion of tea and vegetable market wastes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18. 589–592. <https://doi.org/10.1023/A:1016314903817>.
- Lateef, A., Azeez, M.A., Asafa, T.B., Yekeen, T.A., Akinboro, A., Oladipo, I.C., Azeez, L., Ojo, S.A., Gueguim-Kana, E.B., Beukes, L.S., (2016). Cocoa pod husk extract-mediated biosynthesis of silver nanoparticles: Its antimicrobial, antioxidant and larvicidal activities. *Journal of Nanostructural Chemistry*. 6(2). 159–169.
- Lecumberri, E., Mateos, R., Izquierdo-Pulido, M., Rupérez, P., Goya, L., Bravo, L., (2007). Dietary fibre composition, antioxidant capacity and physico-chemical properties of a fibre-rich product from cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Food Chemistry*. 104. 948-954. [10.1016/j.foodchem.2006.12.054](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.12.054).
- León-Villamar, F., Calderón-Salazar, J., Mayorga-Quinteros, E., (2016). Estrategias para el cultivo, comercialización y exportación del cacao fino de aroma en Ecuador. *Revista Ciencia Unemi*. 9(18). 45-55.
- Lessner, D. J., (2009). *Methanogenesis biochemistry*. eLS John Wiley & Sons, Ltd. Chichester. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000573.pub2>.
- Li, Y., Park, S.Y., Zhu, J., (2011). Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 15(1). 821–826. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2010.07.042>.
- Liang, S., Gliniewicz, K., Gerritsen, A.T., McDonald, A.G., (2016). Analysis of microbial community variation during the mixed culture fermentation of agricultural peel wastes to produce lactic acid. *Bioresource technology*. 208. 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.054>.
- Liu, Y., Whitman, W.B., (2008). Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Ann N Y Acad. Sci.* 1125.171–189.
- Lorenzo, A.Y., Obaya, A.C., (2005). La digestión anaerobia. Aspectos teóricos. Parte I ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. vol. XXXIX. núm. 1. 35-48. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar Ciudad de La Habana, Cuba.
- Luna, C.T.A., (2018). Producción de etanol a partir del mucílago de cacao (*Theobroma cacao*) mediante fermentación alcohólica. UTMACH, Unidad Académica de Ciencias Químicas Y De La Salud. Machala, Ecuador. 54.
- Lutheran World Relief_Sustainable Development. Lasting Promise. (2013). Guía 8: Aprendiendo e innovando sobre la cosecha, fermentación y secado del cacao. <http://www.lwr.org> o <https://es.scribd.com/document/264448289/R-MT-guia8-Cosecha-fermentacion-y-secado-de-cacao-pdf>.
- Luzuriaga, D., (2012). Extracción y aprovechamiento del mucílago de cacao como materia prima en la elaboración de vino. Universidad Tecnológica Equinoccial.
- Maki-Arvela, P., Simakova, I.L., Salmi, T., Murzin, D.Y., (2014). Production of lactic acid/lactates from biomass and their catalytic transformations to commodities. *Chemical reviews*. 114(3). 1909-1971. <https://doi.org/10.1021/cr400203v>.
- Mäki-Arvela, P., Simakova, I.L., Salmi, T., Murzin, D.Y., (2014). Production of lactic acid/lactates from biomass and their catalytic transformations to commodities. *Chemical reviews*. 114(3). 1909–1971. <https://doi.org/10.1021/cr400203v>.
- Malakar, S., Paul, S.K., Pou, K.J., (2020). Biotechnological interventions in beverage production. In *Biotechnological progress and beverage consumption*. 1-37. Academic Press.

- Maleka, D., (2016). Assessment of the Implementation of Alternative Process Technologies for Rural Heat and Power Production from Cocoa Pod Husks. Royal Institute of Technology.
- Malo, P., Urquhart, E.A., (2016). Fermented foods: Use of starter cultures. In Encyclopedia of Food and Health, 2nd ed.; Carl Batt, C., Pradip, P., Eds. Academic Press: Cambridge, MA, USA. 681–685. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00282-8>.
- Manyi-Loh, C., Mamphweli, S., Meyer, E., Okoh, A., Makaka, G., Simon, M., (2013). Microbial Anaerobic Digestion (Bio-Digesters) as an Approach to the Decontamination of Animal Wastes in Pollution Control and the Generation of Renewable Energy. International Journal of Environmental Research and Public Health. 10(9). 4390–4417. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph10094390>.
- Mao, C., Feng, Y., Wang, X., Ren, G., (2015). Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. Renew. Sustain. Energy Rev. 45. 540–555. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.02.032>.
- Márquez, A.J., Salazar, E.J., (2015). Análisis de los niveles de desperdicio del mucílago de cacao y su aprovechamiento como alternativa de biocombustible. 93. [http://repositorio.unemi.edu.ec/bitstream/123456789/1770/1/Análisis de los niveles de desperdicio del mucílago de cacao y su aprovechamiento como alternativa de biocombustible.pdf](http://repositorio.unemi.edu.ec/bitstream/123456789/1770/1/Análisis%20de%20los%20niveles%20de%20desperdicio%20del%20mucílago%20de%20cacao%20y%20su%20aprovechamiento%20como%20alternativa%20de%20biocombustible.pdf)
- Martínez, E. R., Torres, C. P., Meneses, M., Figueroa, J., Pérez-Álvarez, J., Viuda-Martos, M., (2012). Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products. Food Research International. 49. 39-45. 10.1016/j.foodres.2012.08.005.
- Martínez-Ángel, J.D., Villamizar-Gallardo, R.A., Ortíz-Rodríguez, O.O., (2015). Characterization and evaluation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husk as a renewable energy source. Agrociencia, 49(3). 329-345. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952015000300008&lng=es&tlng=.
- Martín-González, L., Font, X., Vicente, T., (2013). Alkalinity ratios to identify imbalances in anaerobic digesters treating source-sorted organic fraction of municipal wastes. Biochemical Engineering Journal. 76. 1-5.
- Massey, M.L., Pohland, F.G., (1978). Phase separation of anaerobic stabilization by kinetic controls. J. Water Pollut Control Fed. 50. 2204–2222.
- Mata-Álvarez, J., (2002). Biomethanization of the Organic Fraction of Municipal Solid Wastes. Fundam. Anaerob. Dig. Process. 4. <https://doi.org/10.2166/9781780402994>.
- Mata-Álvarez, J., Macé, S., Llabrés, P., (2000). Anaerobic Digestion of Organic Solid Wastes. An Overview of Research Achievements and Perspectives. Bioresource Technology. 74. 3-16. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00023-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00023-7).
- Mejía, D., De La Cruz Medina, J., Vargas Ortiz, M.A., Del Angel Coronel, O.A., (2012). CACAO: Operaciones Poscosecha. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). <http://www.fao.org/publications/card/en/c/1fa1c733-4ed9-41e7-a9b0-6d5585ad262e>.
- Mejía, L.A., Arguello, O., (2000). Tecnología para el Mejoramiento del Sistema de Producción de Cacao. Corpoica, 1–30. <http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/jspui/bitstream/11348/3832/1/220.1.pdf>
- Meza-Sepúlveda, D.C., Castro, A.M., Zamora, A., Arboleda, J.W., Gallego, A.M., Camargo-Rodríguez, A.V., (2021). Bio-Based Value Chains Potential in the Management of Cocoa PodWaste in Colombia, a Case Study. Agronomy. 11(4). 693. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040693>.
- Motamayor, J.C., Lachenaud, P., da Silva e Mota, J.W., Loor, R., Kuhn, D.N., Brown, J.S., (2008) Geographic and Genetic Population Differentiation of the Amazonian Chocolate Tree (*Theobroma cacao* L). PLoS ONE 3(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003311>.

- Mudhoo, A., Kumar, S., (2013). Effects of heavy metals as stress factors on anaerobic digestion processes and biogas production from biomass. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 10. 1383–1398. <https://doi.org/10.1007/s13762-012-0167-y>.
- Murali, N., Fernández, S., Ahring, B., (2016). Fermentation of wet-exploded corn stover for the production of volatile fatty acids. *Bioresour Technol.* 227. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.012>.
- Nagarajan, S., Jones, R.J., Oram, L., Massanet-Nicolau, J., Guwy, A., (2022). Intensification of Acidogenic Fermentation for the Production of Biohydrogen and Volatile Fatty Acids—A Perspective. *Fermentation.* 8(7). 325. <http://dx.doi.org/10.3390/fermentation8070325>.
- Nguyen, V.T., Nguyen, N.H., (2017). Proximate Composition, Extraction, and Purification of Theobromine from Cacao Pod Husk (*Theobroma cacao* L.). *Technologies.* 5. 14.
- Njoku, V.O., Ayuk, A.A., Ejike, E.E., Oguzie, E.E., Duru, C.E., Bello, O.S., (2011). Cacao pod husk as a low cost biosorbent for the removal of Pb(II) and Cu(II) from aqueous solutions. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* 5. 101–110.
- Novak, J.T., Carlson, D.A., (1970). The kinetics of anaerobic long chain fatty acids degradation. *Journal WPCF.* 42. 1932-1943.
- Oddoye, E.O., Agyente-Badu, C.K., Gyedu-Akoto, E., (2013). Chocolate in health and nutrition. *Nutrition and health.* Springer. New York. 7. 23-38.
- Ogunjobi, J.K., Lajide, L., (2016). The potential of cocoa pods and plantain peels as renewable sources in Nigeria the potential of cocoa pods and plantain peels as renewable sources in Nigeria. *Int. J. Green Energy* 12. 440–445. <https://doi.org/10.1080/15435075.2013.848403>.
- Okiyama, D. C. G., Navarro, S. L. B., Rodrigues, C. E. C., (2017). Cocoa shell and its compounds: Applications in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 63, 103–112.
- Orjuela, W.A., Cardona, E.A., Murillo, W., Méndez, J.J., (2019). Aprovechamiento de la Biomasa Lignocelulósica de la Cadena del Cacao, UN Camino a la Bioeconomía Circular; Universidad del Tolima: Ibagué, Colombia. 1–20.
- Ortiz, V.K.L., Álvarez, L.R., (2015). Efecto del vertimiento de subproductos del beneficio de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre algunas propiedades químicas y biológicas en los suelos de una finca cacaotera, municipio de Yaguará (Huila, Colombia). *Boletín Científico. Centro de Museos.* 19(1). 65-84. <https://doi.org/10.17151/bccm.2015.19.1.5>.
- Ouattara, L.Y., Kouassi, E.K.A., Soro, D., Soro, Y., Yao, K.B., Adouby, K., Drogui, A. P., Tyagi, D.R., Aina, P.M., (2021). Cocoa pod husks as potential sources of renewable high-value-added products: A review of current valorizations and future prospects. *BioResources.* 16(1). 1988-2020.
- Panak, B.J., Ackar, D., Jokic, S., Jozinovic, A., Babic, J., Milicevic, B., Subaric, D., Pavlovic, N., (2018). Cocoa Shell: A by-product with great potential for wide application. *Molecules.* 23(6). 1404-1418. <https://doi.org/10.3390/molecules23061404>.
- Panesar, P.S., Kaur, S., (2015). Bioutilisation of agro-industrial waste for lactic acid production. *International Journal of Food Science and Technology.* 50. 2143-2151. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12886>.
- Pavlostathis, S.G., Giraldo-Gomez, E., (1991) Kinetics of anaerobic treatment: A critical review, *Critical Reviews in Environmental Control.* 21(5-6). 411-490. DOI:10.1080/10643389109388424.
- Peinemann, J.C., Demichelis, F., Fiore, S., Pleissner, D., (2019). Techno-economic assessment of non-sterile batch and continuous production of lactic acid from food waste. *Bioresour technol.* 289. 121631. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121631>.
- Perwitasari, U., Agustina, N.T., Pangestu, R., Amanah, S., Saputra, H., Fahrurrozi, A.A., Juanssilfero, A.B., Thontowi, A., Widyaningsih, T.D., Eris, D.D., Amaniyah, M., Yopi, Habibi, M.S., (2021). Cacao pod husk for citric acid production under solid state fermentation using response

- surface method. *Biomass Conversion and Biorefinery*. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01690-9>
- Pham-Van, D., Takeshi, F., Hoang-Minh, G., Pham-Phu, S.T., (2020). Comparison Between Single and Two-Stage Anaerobic Digestion of Vegetable Waste: Kinetics of Methanogenesis and Carbon Flow. *Waste Biomass Valor.* 11. 6095–6103. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00861-0>.
- Pohland, F.G., Ghosh, S., (1971). Developments in Anaerobic Stabilization of Organic Wastes -The Two-Phase Concept, *Environmental Letters*. 1(4). 255-266. <https://doi.org/10.1080/00139307109434990>.
- PRB. Population Reference Bureau, (2013). “Cuadro de Datos de la Población Mundial”. www.prb.org/pdf14/2013-population-data-sheet_spanish.pdf.
- PROCOMER. Promotora del Comercio Exterior de Costa Rica, (2019). Guía 3: Manual Técnico: Poscosecha de Cacao fino y de aroma. Costa Rica exporta; BID.
- Quiñones-Galvez, D., Dercy, P.O., (2015). Caracterización bioquímica de hojas de clones de *Theobroma cacao* y su relación con los tricomas. *SciELO*. 8.
- Quintero, R.M.L., Díaz, M.K.M., (2004). El mercado mundial del cacao. *Agroalimentaria*. 9(18). 47-59. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-03542004000100004&lng=es&tlng=es.
- Ramos-Suárez, J., Arroyo, N.C., González-Fernández, C., (2015). The role of anaerobic digestion in algal biorefineries: clean energy production, organic waste treatment, and nutrient loop closure. *Algae and Environmental Sustainability*. 53–76. Springer, India.
- Raposo, F., Fernández-Cegri, V., de la Rubia, M.A., Borja, R., Béline, F., Cavinato, C., Demirer, G., Fernández, B., Fernández-Polanco, M., Frigon, J.C., Ganesh, R., Koubova, J., Méndez, R., Menin, G., Peene, A., Scherer, P., Torrijos, M., Uellendahl, H., Wierinck, I., de Wilde, V., (2011). Biochemical methane potential (BMP) of solid organic substrates: evaluation of anaerobic biodegradability using data from an international interlaboratory study. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 86 (8). 1088-1098. <https://doi.org/10.1002/jctb.2622>.
- Reddy, N., Yang, Y., (2005). Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications. *Trends in biotechnology*. 23. 22-7. 10.1016/j.tibtech.2004.11.002.
- Rodríguez, C., Alaswad, A., Mooney, J., Prescott, T., Olabi, A.G., (2015). Pre-treatment techniques used for anaerobic digestion of algae. *Fuel Process. Technol.* 138. 765–779. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2015.06.027>.
- Romero, C., Zambrano, A., (2012). Análisis de azúcares en pulpa de cacao por colorimetría y electroforesis capilar Analysis of sugars in cocoa pulp by colorimetric and capillary electrophoresis. *Revista Científica UDO Agrícola*, 12(4). 906–913.
- Sablayrolles, J.M., (2009). Control of alcoholic fermentation in winemaking: Current situation and prospect. *Food Research International*. 42. 418-424. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.12.016>.
- Sánchez, J., (2013). Evaluación energética de cáscaras de cacao Nacional y CCN-51. Universidad de Cuenca. Cuenca-Ecuador. 128.
- Sangronis, E., Soto, M.J., Valero, Y., Buscema, I., (2014). Cascarrilla de cacao venezolano como materia prima de infusiones. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 64(2). 123-130. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000406222014000200007&lng=e&tlng
- Santos, R.X., Oliveira, D.A., Sodr e, G.A., Gosmann, G., Brendel, M., Pungartnik, C., (2014). Antimicrobial activity of fermented *Theobroma cacao* pod husk extract. *Genetics and molecular research : GMR*. 13(3). 7725–7735. <https://doi.org/10.4238/2014.September.26.10>.
- Schievano, A., Tenca, A., Scaglia, B., Merlino, G., Rizzi, A., Daffonchio, D., Oberti, R., Adani, F., (2012). Two-stage vs single-stage thermophilic anaerobic digestion: comparison of energy

- production and biodegradation efficiencies. *Environ. Sci. Technol.* 46(15). 8502–8510. <https://doi.org/10.1021/es301376n>.
- Schink, B., (1994). Diversity, ecology, and isolation of acetogenic bacteria. In: Drake HL (eds) *Acetogenesis*. Chapman & Hall, New York London. 387–415.
- Schlegel, K., Müller, V., (2013). Evolution of Na⁺ and H⁺ bioenergetics in methanogenic archaea. *Biochem. Soc. Trans.* 41. 421–426.
- Schnurer, A., Jarvis, A., (2010). *Microbiological handbook for biogas plants*. Swedish Waste Management. 1-74. https://www.researchgate.net/publication/285684745_Microbiological_Handbook_for_Biogas_Plants.
- Shah, F., Mahmood, Q., Shah, M., Pervez, A., Asad, S., (2014). Microbial Ecology of Anaerobic Digesters: The Key Players of Anaerobiosis. *The Scientific World Journal*. <https://doi.org/10.1155/2014/183752>.
- Shen, F., Yuan, H., Pang, Y., Chen, S., Zhu, B., Zou, D., Liu, Y., Ma, J., Yu, L., Li, X., (2013). Performances of anaerobic co-digestion of fruit & vegetable waste (FVW) and food waste (FW): single-phase vs. two-phase. *Bioresource technology*. 144. 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.099>.
- Shodehinde, S.A., Abike, A., (2017). Tapping into the good use of cocoa (*Theobroma cacao*) pod husks: Towards finding alternative sources of nutrients for animals in Nigeria. *Journal of Food Technology and Preservation*. 1(1). 42–46.
- Sitio web: www.cacaomexigo.org/ Principales países productores d cacao
- Smulders, M.J.M., Esselink, D., Amores, F., Ramos, G., Sukha, D., Butler, D., Vosman, B., Van Loo, E.N., (2012). Identification of Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Varieties with Different Quality Attributes and Parentage Analysis of Their Beans. *International Group for Genetic Improvement of Cocoa Newsletter*. 12. 1-13. https://www.researchgate.net/publication/237666150_Identification_of_Cocoa_Theobroma_cacao_L_Varieties_with_Different_Quality_Attributes_and_Parentage_Analysis_of_Their_Beans
- Soest, P.V., Wine, R.H., (1967). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. 50(1). 50-55.
- Soto, M., (2012). *Desarrollo del proceso de producción de cascarilla de semilla de cacao en polvo destinada al consumo humano*. Quito: Universidad Simón Bolívar.
- Stanbury, P.F., Whitaker, A., Hall, S.J., (2013). *Principles of fermentation technology*. Elsevier.
- Strazzer, G., Battista, F., García, N.H., Frison, N., Bolzonella, D., (2018). Volatile fatty acids production from food wastes for biorefinery platforms: A review. *Journal of environmental management*. 226. 278–288. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.08.039>.
- Stronach, S.M., Rudd, T., Lester J.N., (1986). *Anaerobic Digestion Processes in Industrial Wastewater Treatment*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 80-90. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-71215-9>.
- Sulaiman, I., Boachie-Danquah, B., (2017). Investing in Ghana's Cocoa Processing Industry: Opportunities, Risks & the Competitive Advantage. *Goodman*. <https://goodmanamc.blogspot.com/2017/05/ghanas-cocoa-processing-industry.html>.
- Syamsiro, M., Saptoadi, H., Tambunan, B., (2011). Experimental Investigation on Combustion of Bio-Pellets from Indonesian Cocoa Pod Husk. *Asian Journal of Applied Sciences*. 4. 712-719. 10.3923/ajaps.2011.712.719.
- Syamsiro, M., Saptoadi, H., Tambunan, B.H., Pambudi, N.A., (2012). Energy for Sustainable Development A preliminary study on use of cocoa pod husk as a renewable source of energy in Indonesia. *Energy Sustain. Dev.* 16. 74–77. <https://doi.org/10.1016/j.esd.2011.10.005>.

- Tan, J., Abdel-Rahman, M., Sonomoto, K., (2017). Biorefinery-Based Lactic Acid Fermentation: Microbial Production of Pure Monomer Product. https://doi.org/10.1007/12_2016_11.
- Thi, N., Tinh, T., Tien, N., Thi, H., Hoa, T., Thi, N., (2016). A study of wine fermentation from mucilage of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). 6(3). 387–397.
- Thomsen, S.T., Kadar, Z., Schmidt, J.E., (2014a). Compositional analysis and projected biofuel potentials from common West African agricultural residues. *Biomass Bioenergy*. 3. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.01.045>.
- Thomsen, S.T., Londoño, J.E., Schmidt, J.E., Kádár, Z., (2015). Comparison of different pretreatment strategies for ethanol production of West African biomass. *Applied biochemistry and biotechnology*. 175(5). 2589–2601. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1444-7>.
- Thomsen, S.T., Spliid, H., Østergård, H., (2014b). Bioresource technology statistical prediction of biomethane potentials based on the composition of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 154. 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.029>.
- Tiburcio, P.B., (2017). Solid-state fermentation of *Theobroma cacao* pod husk using *Rhizopus stolonifera* - prospection of biomolecules. Curitiba, Paraná, Brazil: Universiade Federal do Paraná.
- Titiloye, J.O., Abu-Bakar, M.S., Odetoye, T.E., (2013). Thermochemical characterisation of agricultural wastes from West Africa. *Ind. Crops Prod.* 47. 199–203.
- Trzcinski, A.P., David, C.S., (2017). Microbial biomethane from solid wastes: principles and biotechnological processes. *Microbial Fuels*. 77–151. CRC Press, Boca Raton.
- Ueno, Y., Tataru, M., Fukui, H., Makiuchi, T., Goto, M., Sode, K., (2007). Production of hydrogen and methane from organic solid wastes by phase-separation of anaerobic process. *Bioresource technology*. 98. 1861–5. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.06.017>.
- Vallejo, A., Díaz, R., Morales, W., Soria, R., Vera, J., Baren, C., (2016). Utilización del mucílago de cacao, tipo *nacional* y *trinitario*, en la obtención de jalea. *Revista Espam Ciencia* ISSN 1390-8103. 7(1). 51–58. http://190.15.136.171/index.php/Revista_ESPAMCIENCIA/article/view/116
- van Maris, A.J., Winkler, A.A., Porro, D., van Dijken, J.P., Pronk, J.T., (2004). Homofermentative lactate production cannot sustain anaerobic growth of engineered *Saccharomyces cerevisiae*: possible consequence of energy-dependent lactate export. *Appl. Environ. Microbiol.* 70. 2898–2905.
- Van, D.P., Fujiwara, T., Tho, B.L., Toan, P.P.S., Minh, G.H., (2019). A review of anaerobic digestion systems for biodegradable waste: configurations, operating parameters, and current trends. *Environ. Eng. Res.* <https://doi.org/10.4491/eer.2018.334>.
- Vasmara, C., Marchetti, R., Carminati, D., (2021). Wastewater from the production of lactic acid bacteria as feedstock in anaerobic digestion. *Energy*. 120740. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2021.120740>.
- Vásquez, A.M., Quintero, E.C.A., Trujillo, C.J.E., Perdomo, F.E.F., (2017). Aprovechamiento de subproducto del cacao para la elaboración de galletas. *Revista Agropecuaria y Agroindustrial La Angostura*. 4. <https://revistas.sena.edu.co/index.php/raaa/article/view/4704>.
- Vásquez, Z.S., de Carvalho-Neto, D.P., Pereira, G.V.M., Vandenberghe, L.P.S., de Oliveira, P.Z., Tiburcio, P.B., Rogez, H.L.G., Góes-Neto, A., Soccol, C.R., (2019). Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review. *Waste management (New York, N.Y.)*. 90. 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.04.030>
- Vázquez, H., Dacosta, O., (2007). Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Ingeniería, Investigación Y Tecnología*. 249–259. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-77432007000400004&script=sci_arttext&tlng=pt.
- VDI. Verein Deutscher Ingenieure, (2016). 4630: Fermentation of Organic Materials: Characterisation of the Substrate, Sampling, Collection of Material Data, Fermentation Tests. Beuth Verlag.

- Veá, E.B., Romeo, D., Thomsen, M., (2018). Biowaste Valorization in a Future Circular Bioeconomy. *Procedia CIRP*. 69. 591–596. <https://doi.org/10.1016/j.procir.2017.11.062>.
- Villamizar, A., López, L., (2016). Cáscara de cacao fuente de polifenoles y fibra: simulación de una planta piloto para su extracción. *Revista Científica de la Universidad Francisco de Paula Santander*. 9.
- Villamizar, Y.L., Rodríguez, J.S., León, L.C., (2017). Caracterización fisicoquímica, microbiológica y funcional de harina de cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.) variedad CCN-51. *Cuad. Act.* 9. 65–75. <https://doi.org/10.53995/20278101.421>.
- Vincent, M.C.V., Álvarez, S.B., Zaragoza, J.L.C., (2006). *Química industrial orgánica*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.
- Vivanco, E., Matute, L., Campo, M., (2018). Caracterización físicoquímica de la cascarilla de *Theobroma cacao* L, variedades Nacional y CCN-51. 2(1). *Conference Proceedings UTMACH*.
- Vriesmann, L., Amboni, R., Petkowicz, C., (2011). Cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.): Composition and hot-water-soluble pectins. *Industrial Crops and Products - IND CROPS PRODUCTS*. 34. 1173-1181. [10.1016/j.indcrop.2011.04.004](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.04.004).
- Vriesmann, L.C., Petkowicz, C.L.O., (2013). Highly acetylated pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.) forms gel. *Food Hydrocoll.* 33. 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.02.010>.
- Wainaina, S., Lukitawesa, L., Awasthi, M.K., Taherzadeh, M., (2019). Bioengineering of anaerobic digestion for volatile fatty acids, hydrogen or methane production: A critical review. *Bioengineered*. <https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1673937>.
- Wang, Y., Tashiro, Y., Sonomoto, K., (2015). Fermentative production of lactic acid from renewable materials: recent achievements, prospects, and limits, *J. Biosci. Bioeng.* 119. 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.06.003>.
- Wang, Y., Yang, Z., Qin, P., Tan, T., (2014). Fermentative L-(+)-lactic acid production from defatted rice bran. *RSC Advances*. 4. 8907-8913. [DOI:10.1039/c3ra46140h](https://doi.org/10.1039/c3ra46140h).
- Ward-Doria, M., Arzuaga-Garrido, J., Ojeda, K.A., Sánchez, E., (2016). Production of biogas from acid and alkaline pretreated cocoa pod husk (*Theobroma cacao* l.). *Int. J. ChemTech Res.* 9. 252–260.
- WCF. World Cocoa Foundation, (2019). <https://www.worldcocoafoundation.org/>
- Wee, Y.J., Kim, J.N., Ryu, H.W., (2006). Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technology and Biotechnology*. 44(2). 163-172.
- Whistler, R.L., Masak, E.J., Plunkett, R.A., (1956). Cacao polysaccharides. *Journal of the American Chemical Society*. 78 (12). 2851-2853. DOI: 10.1021/ja01593a058.
- Xiao, B., Qin, Y., Wu, J., Chen, H., Yu, P., Liu, J., Li, Y.Y., (2018). Comparison of single-stage and two-stage thermophilic anaerobic digestion of food waste: performance, energy balance and reaction process. *Energy Convers. Manag.* 156. 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2017.10.092>.
- Yépez, N., Juan, C., (2015). Efecto de altas densidades y dos sistemas de siembra sobre el rendimiento y rentabilidad del cultivo de plátano (*Musa AAB*) bajo condiciones de regadío. *Quevedo. UTEQ*. 103.
- Yin, J., Yu, X., Wang, K., Shen, D., (2016). Acidogenic fermentation of the main substrates of food waste to produce volatile fatty acids. *Int. J. Hydrogen Energy*. 41. 21713–21720. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.07.094>.
- Zhang, W., Zhang, F., Li, Y.X., Jianxiong Zeng, R., (2019). Inhibitory effects of free propionic and butyric acids on the activities of hydrogenotrophic methanogens in mesophilic mixed culture fermentation. *Bioresource technology*. 272. 458–464. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.10.076>.

- Zheng, M., Zheng, M., Wu, Y., Ma, H., Wang, K., (2015). Effect of pH on types of acidogenic fermentation of fruit and vegetable wastes. *Biotechnol Bioproc Eng.* 20. 298–303. <https://doi.org/10.1007/s12257-014-0651-y>.
- Zheng, X.Q., Koyama, Y., Nagai, C., Ashihara, H., (2004). Biosynthesis, accumulation and degradation of theobromine in developing *Theobroma cacao* fruits. *Journal of plant physiology.* 161(4). 363–369. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-01253>.
- Zhou, M., Yan, B., Wong, J.W.C., Zhang, Y., (2018). Enhanced volatile fatty acids production from anaerobic fermentation of food waste: A mini review focusing on acidogenic metabolic pathways. *Bioresour Technologies.* <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.121>.
- Zhou, Y., Drouin, P., Lafrenière, C., (2016). Effect of temperature (5–25 °C) on epiphytic lactic acid bacteria populations and fermentation of whole-plant corn silage. *Journal of Applied Microbiology.* 121(3). 657-671. <https://doi.org/10.1111/jam.13198>.
- Zou, H., Gao, M., Wang, Q., Zhang, W., Wu, C., Song, N., (2019). Metabolic analysis of efficient methane production from food waste with ethanol pre-fermentation using carbon isotope labeling, *Bioresour. Technol.* 291. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121849>.

ANEXOS

Anexo 1. Concentración de metano (%) en el biogás producido

Anexo 1.1: Concentración de metano en el biogás producido por la cáscara cruda a diferentes concentraciones y durante 25 días

<i>Días</i>	Concentración de CH₄ (%)			
	0.3 gsv (20ml)	0.6 gsv (40ml)	1.3 gsv (80ml)	1.9 gsv (120ml)
1	0.80	0.80	0.78	0.77
2	0.82	0.82	0.83	0.83
3	0.81	0.78	0.78	0.73
4	0.81	0.80	0.78	0.72
5	0.81	0.79	0.77	0.72
6	0.81	0.79	0.77	0.72
7	0.81	0.78	0.77	0.72
8	0.81	0.77	0.76	0.72
9	0.81	0.77	0.76	0.72
10	0.80	0.77	0.77	0.73
11	0.80	0.77	0.77	0.73
12	0.80	0.76	0.77	0.73
13	0.80	0.76	0.77	0.74
14	0.80	0.76	0.77	0.74
15	0.80	0.76	0.77	0.74
16	0.80	0.76	0.77	0.74
17	0.80	0.76	0.77	0.74
18	0.80	0.76	0.77	0.74
19	0.80	0.76	0.77	0.74
20	0.80	0.76	0.77	0.74
21	0.80	0.76	0.77	0.74
22	0.80	0.76	0.77	0.74
23	0.80	0.76	0.77	0.74
24	0.80	0.76	0.77	0.74
25	0.80	0.76	0.77	0.74

Anexo 1.2: Concentración de metano en el biogás producido por la CO: 1.3 gDQO/L·d a diferentes concentraciones y durante 25 días

<i>Días</i>	Concentración de CH₄ (%)			
	0.3 gsv (20ml)	0.6 gsv (40ml)	1.2 gsv (80ml)	1.7 gsv (120ml)
1	0.81	0.80	0.82	0.82
2	0.82	0.82	0.82	0.80
3	0.82	0.81	0.78	0.78
4	0.83	0.82	0.81	0.75
5	0.83	0.82	0.79	0.74
6	0.83	0.81	0.78	0.73
7	0.83	0.81	0.78	0.73
8	0.83	0.80	0.78	0.73
9	0.83	0.80	0.78	0.71
10	0.83	0.79	0.77	0.72
11	0.83	0.79	0.77	0.72
12	0.82	0.79	0.77	0.72
13	0.82	0.79	0.77	0.72
14	0.82	0.79	0.77	0.71
15	0.82	0.79	0.77	0.71
16	0.82	0.79	0.77	0.72
17	0.82	0.79	0.77	0.71
18	0.82	0.79	0.77	0.72
19	0.82	0.79	0.76	0.71
20	0.82	0.79	0.77	0.72
21	0.82	0.79	0.77	0.71
22	0.82	0.79	0.77	0.72
23	0.82	0.79	0.77	0.72
24	0.81	0.79	0.76	0.71
25	0.82	0.79	0.77	0.72

Anexo 1.3: Concentración de metano en el biogás producido por la CO: 2.6 g_{DQO}/L·d a diferentes concentraciones y durante 25 días

<i>Días</i>	Concentración de CH₄ (%)			
	0.3 gsv (20ml)	0.6 gsv (40ml)	1.1 gsv (80ml)	1.7 gsv (120ml)
1	0.81	0.82	0.85	0.84
2	0.82	0.82	0.83	0.83
3	0.83	0.83	0.80	0.80
4	0.83	0.81	0.82	0.79
5	0.83	0.81	0.82	0.79
6	0.83	0.81	0.81	0.78
7	0.83	0.80	0.81	0.76
8	0.83	0.80	0.81	0.75
9	0.83	0.80	0.81	0.75
10	0.82	0.80	0.81	0.74
11	0.82	0.80	0.81	0.74
12	0.82	0.80	0.80	0.74
13	0.82	0.79	0.80	0.74
14	0.82	0.79	0.80	0.75
15	0.82	0.79	0.80	0.75
16	0.82	0.79	0.80	0.74
17	0.82	0.79	0.80	0.74
18	0.82	0.79	0.80	0.75
19	0.82	0.79	0.80	0.75
20	0.82	0.79	0.80	0.75
21	0.82	0.79	0.80	0.75
22	0.82	0.79	0.80	0.74
23	0.82	0.79	0.80	0.75
24	0.82	0.79	0.80	0.75
25	0.82	0.79	0.80	0.75

Anexo 1.4: Concentración de metano en el biogás producido por la CO: 3.7 g_{DQO}/L·d a diferentes concentraciones y durante 25 días

<i>Días</i>	Concentración de CH₄ (%)			
	0.3 gsv (20ml)	0.5 gsv (40ml)	1 gsv (80ml)	1.5 gsv (120ml)
1	0.79	0.82	0.84	0.83
2	0.82	0.82	0.83	0.83
3	0.82	0.82	0.81	0.81
4	0.82	0.83	0.82	0.80
5	0.82	0.82	0.81	0.79
6	0.82	0.82	0.81	0.78
7	0.81	0.82	0.80	0.78
8	0.81	0.81	0.80	0.78
9	0.82	0.81	0.80	0.78
10	0.81	0.81	0.80	0.78
11	0.81	0.81	0.80	0.78
12	0.80	0.80	0.80	0.77
13	0.80	0.80	0.79	0.77
14	0.80	0.80	0.79	0.78
15	0.82	0.79	0.80	0.75
16	0.80	0.80	0.79	0.78
17	0.80	0.80	0.79	0.77
18	0.80	0.80	0.79	0.78
19	0.79	0.80	0.79	0.78
20	0.79	0.80	0.78	0.78
21	0.79	0.80	0.78	0.78
22	0.79	0.80	0.78	0.78
23	0.79	0.80	0.78	0.78
24	0.79	0.79	0.78	0.78
25	0.79	0.79	0.78	0.78

Anexo 1.5: Concentración de metano en el biogás producido por la CO: 4.9 g_{DQO}/L·d a diferentes concentraciones y durante 25 días

<i>Días</i>	Concentración de CH₄ (%)			
	0.3 gsv (20ml)	0.6 gsv (40ml)	1.2 gsv (80ml)	1.7 gsv (120ml)
1	0.77	0.78	0.81	0.81
2	0.82	0.82	0.83	0.83
3	0.81	0.81	0.81	0.79
4	0.82	0.81	0.80	0.77
5	0.81	0.81	0.79	0.75
6	0.82	0.81	0.79	0.74
7	0.82	0.81	0.78	0.74
8	0.81	0.80	0.78	0.74
9	0.81	0.80	0.77	0.74
10	0.81	0.80	0.77	0.73
11	0.81	0.80	0.77	0.73
12	0.80	0.80	0.77	0.73
13	0.80	0.80	0.77	0.73
14	0.81	0.80	0.77	0.73
15	0.81	0.80	0.77	0.73
16	0.81	0.80	0.77	0.73
17	0.81	0.80	0.77	0.73
18	0.81	0.80	0.77	0.73
19	0.81	0.80	0.77	0.73
20	0.81	0.80	0.77	0.73
21	0.81	0.80	0.77	0.73
22	0.81	0.80	0.77	0.73
23	0.81	0.80	0.77	0.73
24	0.81	0.80	0.77	0.73
25	0.81	0.80	0.77	0.73