





Nota técnica / Technical note

Sacarificación y fermentación de los residuos lignocelulósicos de la naranja para la obtención de bioalcohol

Saccharification and fermentation of the lignocellulosic residues of the orange to obtain bioalcohol

Sacarificação e fermentação dos resíduos lignocelulósicos da laranja para obtenção de bioálcool

Pablo Enrique Alcívar-Mendoza^{1,2*}; José Patricio Muñoz-Murillo²; Christhel Alejandra Andrade-Díaz² y Alex Alberto Dueñas-Rivadeneira².

¹Maestría Académica con Trayectoria Profesional en Agroindustria- Instituto de Posgrado. ²Departamento de Procesos Agroindustriales, Facultad de Ciencias Zootécnicas Universidad Técnica de Manabí, Chone, Ecuador. Correo electrónico: (PA) palcivar4747@hotmail.com, ; (JM) jpmunoz@outlook.es, ; (CA) andraded@insa-toulouse.fr ; (AD) alduri81@hotmail.com .

Resumen

La producción y consumo de naranjas genera gran cantidad de residuos lignocelulósicos que son depositados en los vertederos sin recibir ningún tipo de tratamiento que le permita ser aprovechados como subproductos. El objetivo de la presente investigación fue obtener bioalcohol mediante la sacarificación y fermentación de los residuos lignocelulósicos de la cáscara de la naranja (*Citrus sinensis*). Se utilizaron tres (3) niveles de ácido sulfúrico como tratamiento, para alterar la estructura lignocelulósica de la biomasa, posteriormente, se realizó una hidrólisis con enzimas celulasas, analizando la presencia de azúcares reductores por espectrofotometría. La fermentación se efectuó con dos (2) concentraciones de levaduras *Sacharomyces cerevisiae*, posteriormente, se destiló y se determinó la presencia de compuestos orgánicos volátiles por cromatografía de gases. Los azúcares reductores presentes en mayor proporción fueron glucosa (26,60 ±

Recibido el 04-09-2020 • Aceptado el 22-10-2020

*Autor de correspondencia. Correo electrónico: palcivar4727@hotmail.com

0,77 g.L⁻¹) y fructosa (21,26 ± 0,51 g.L⁻¹); el compuesto orgánico volátil de mayor concentración fue etanol (76,96 %) y el índice de mayor rendimiento de bioalcohol se obtuvo con el tratamiento de mayor concentración de ácido sulfúrico y levadura (12,72 ± 0,65 g.L⁻¹); las cáscaras de naranja son subproductos de origen vegetal que pueden ser aprovechadas para la producción de bioalcohol con porcentajes de etanol superiores al 76%.

Palabras clave Biomasa lignocelulósica, hidrólisis enzimática, subproducto vegetal.

Abstract

The production and consumption of oranges generates a large amount of lignocellulosic waste that is deposited in landfills without receiving any type of treatment that allows it to be used as by-products. The objective of the present investigation was to obtain bioalcohol through the saccharification and fermentation of lignocellulosic residues of the peel of the orange (*Citrus sinensis*). Three (3) different levels of sulfuric acid were used as treatment, to alter the lignocellulosic structure of the biomass, subsequently, a hydrolysis with cellulase enzymes was carried out, analyzing the presence of reducing sugars by spectrophotometry. The fermentation was carried out with two (2) different concentration levels of *Sacharomyces cerevisiae* yeast, subsequently, it was distilled and the presence of volatile organic compounds was determined by gas chromatography. The reducing sugars present in the highest proportion were: glucose (26.6 ± 0.77 g.L⁻¹) and fructose (21.26 ± 0.51 g. L⁻¹); the volatile organic compound with the highest concentration was ethanol (76.96%) and the index with the highest bioalcohol yield was obtained with the treatment with the highest concentration of sulfuric acid and yeast (12.72 ± 0.65 g. L⁻¹); Orange peels are by-products of vegetable origin that can be used for the production of bioalcohol with percentages of ethanol higher than 76%.

Keywords: biomass Lignocellulosic, enzymatic hydrolysis, plant by-product.

Resumo

A produção e o consumo da laranja geram uma grande quantidade de resíduos lignocelulósicos que são depositados em aterros sanitários sem receber nenhum tipo de tratamento que permita sua utilização como subproduto. O objetivo da presente investigação foi a obtenção do bioálcool por meio da sacarificação e fermentação de resíduos lignocelulósicos da casca da laranja (*Citrus sinensis*). Três (3) níveis de ácido sulfúrico foram utilizados como tratamento, para alterar a estrutura lignocelulósica da biomassa, posteriormente, foi realizada uma hidrólise com enzimas celulase, analisando a presença de açúcares redutores por espectrofotometria. A fermentação foi realizada com duas (2) concentrações de levadura *Sacharomyces cerevisiae*, posteriormente, foi destilada e a presença de

compostos orgánicos volátiles determinada por cromatografía gasosa. Os açúcares reductores presentes em maior proporção foram: glicose ($26,6 \pm 0,77 \text{ g.L}^{-1}$) e frutose ($21,26 \pm 0,51 \text{ g.L}^{-1}$); o composto orgânico volátil com maior concentração foi o etanol (76,96%) e o índice com maior rendimento de bioálcool foi obtido com o tratamento com maior concentração de ácido sulfúrico e levedura ($12,72 \pm 0,65 \text{ g.L}^{-1}$); As cascas de laranja são subprodutos de origem vegetal que podem ser utilizados para a produção de bioálcool com percentuais de etanol superiores a 76%.

Palavras-chave: Biomassa lignocelulósica, hidrólise enzimática, subproduto vegetal.

Introducción

La producción de naranjas (*Citrus sinensis*) a nivel mundial, está estimada en 47,5 millones de toneladas métricas por año (USDA, 2021). El procesamiento y consumo de cítricos genera cantidades considerables de residuos debido a que más de la mitad del fruto son considerados desechos (cáscaras y semillas) (Pascual, 2019). Por lo general los residuos tienden a ser descartados directamente a los vertederos de desechos sin recibir un tratamiento adecuado que permita aprovecharlos de forma eficaz y eficiente (Ordoñez *et al.*, 2018).

Los residuos agrícolas presentan típicamente una composición rica en celulosa, hemicelulosa y lignina (Alata *et al.*, 2019). Esta estructura resulta idónea para ser aprovechada como fuente de energías alternativas, como puede ser la producción de bioalcohol (Benalcázar *et al.*, 2019). La producción de bioalcohol de fuentes vegetales en Europa y Asia se encuentra en una etapa creciente de experimentación y producción debido al gran interés de mitigar el impacto ambiental ocasionado por este tipo

Introduction

The worldwide oranges production (*Citrus sinensis*) is estimated at 47.5 million metric tons per year (USDA, 2021). The processing and consumption of citrus fruits generates considerable waste amounts because more than half of the fruit, are considered waste (peels and seeds) (Pascual, 2019). In general, waste tends to be discarded directly to dumps without receiving adequate treatment that allows it to be used effectively and efficiently (Ordoñez *et al.*, 2018).

Agricultural residues typically present a composition rich in cellulose, hemicellulose and lignin (Alata *et al.*, 2019). This structure is ideal to be used for an alternative energy source, such as the bioalcohol production (Benalcázar *et al.*, 2019). The bioalcohol production from vegetal sources in Europe and Asia is growing up for experimentation and production, due to the great interest in mitigating the environmental impact caused by this type of waste (Manrique, 2018). However, in Latin American countries this type of research is drastically limited by the lack of technological resources (Manrique, 2018).

de residuos (Manrique, 2018). Sin embargo, en países de América Latina este tipo de investigaciones están drásticamente limitadas por la falta de recursos tecnológicos (Manrique, 2018).

El proceso de obtención de bioalcohol de residuos producidos por la actividad agrícola se realiza por medio de la transformación de la biomasa celulósica en azúcares solubles mediante reacciones químicas o enzimáticas (Melo *et al.*, 2017), convirtiendo los hidratos de carbono fermentables en moléculas de metanol, etanol y propanol (Cando *et al.*, 2019), mediante la ruta enzimática de la glucólisis (degradación de glucosa por vía aerobia) o por la reacción entre la glucosa y el piruvato (ruta de Embden-Meyerhof, o Embden-Meyerhof-Parnas), (Carranza *et al.*, 2015).

La transformación parcial de la biomasa (cáscaras de naranjas) en bioalcohol consiste en aplicar la respectiva reducción de tamaño de la materia prima, separación de aceite esencial del residuo, para proceder a aplicar un tratamiento ácido - alcalino, y a la incorporación de enzimas para optimizar la etapa de sacarificación obteniendo así los eventuales azúcares reductores que serán sometidos a un proceso de fermentación con la incorporación de levaduras y consecuentemente la aplicación de una destilación simple para la obtención potencial de bioalcohol (Morales, 2015).

La biomasa de la naranja (*Citrus sinensis*) tiende a ser colocada directamente en los vertederos de basura sin recibir ningún tipo de

To produce bioalcohol from residues by agricultural activity, is carried out the transformation of cellulosic biomass into soluble sugars through chemical or enzymatic reactions (Melo *et al.*, 2017), converting fermentable carbohydrates into molecules of methanol, ethanol and propanol (Cando *et al.*, 2019), by the enzymatic pathway of glycolysis (glucose degradation aerobically) or the reaction between glucose and pyruvate (Embden-Meyerhof, or Embden-Meyerhof pathway -Parnas), (Carranza *et al.*, 2015).

The biomass partial transformation (orange peels) into bioalcohol consists to realize the respective reduction in the raw material size, then the essential oil separation from the residue to proceed to apply an acid-alkaline treatment besides the enzymes incorporation to optimize the saccharification stage with the purpose to produce the eventual reducing sugars that will be subjected to a fermentation process with yeasts incorporation and consequently the application of a simple distillation to obtain bioalcohol (Morales, 2015).

The oranges biomass (*Citrus sinensis*) tends to be placed directly into garbage dumps without receiving any type of treatment, and can be drawn on using the saccharification and fermentation technology of lignocellulosic residues for bioalcohol production, helping to small, medium and large producers, to have an option to make the most of their production. The objective of this research was the bioalcohol production from the saccharification and fermentation of

tratamiento, y puede ser aprovechada mediante la utilización de la tecnología de sacarificación y fermentación de residuos lignocelulósicos para la producción de bioalcohol, ayudando a los pequeños, medianos y grandes productores, a disponer de una opción para aprovechar al máximo su producción. El objetivo de la presente investigación fue obtener bioalcohol a partir de la sacarificación y fermentación de la biomasa lignocelulósica de la cáscara de la naranja (*Citrus sinensis*).

Materiales y métodos

Material vegetal

Las naranjas (*Citrus sinensis*) de tipo descarte comprendidas entre cuatro (4) y seis (6) cm de diámetro, con apariencia firme, color y olor característico utilizadas en el presente estudio se recolectaron en el centro de acopio Zambrano ubicado en el cantón Flavio Alfaro y el procedimiento experimental se realizó en los laboratorios de la Universidad Técnica de Manabí.

Obtención de los residuos lignocelulósicos

Una vez recibidas las naranjas se retiró la corteza de forma manual, se procedió a lavarlas con agua potable y se cortaron en forma de cuadros de aproximadamente 0,2-0,5 cm, posteriormente, se colocaron 325 g de las cortezas, en un balón de destilación, se adicionó 575 mL de agua destilada y se realizó la extracción de aceites esenciales, utilizando una manta de calentamiento y un equipo de hidrodestilación con una trampa de

oranges peel lignocellulosic biomass (*Citrus sinensis*).

Materials and methods

Vegetal material

In this study, Discard-type oranges (*Citrus sinensis*) with a diameter between four (4) and six (6) cm, firm appearance besides a characteristic color and smell were used. The oranges were picked up at the Zambrano collection center located in the Flavio Alfaro canton and the experimental procedure was carried out in the Universidad Técnica Manabí laboratories.

Obtaining lignocellulosic residues

Once the oranges were received, the rind was removed manually. They were washed with drinking water and were cut into squares of approximately 0.2-0.5 cm. Subsequently, 325 g of the rinds were placed into a distillation balloon; Then 575 mL of distilled water was added and the essential oils extraction was realized using a heating blanket and a hydrodistillation equipment with a Clevenger trap at a temperature of 90 °C during 170 minutes to eliminate compounds that could interfere with fermentation, the process was carried out three times.

After the hydrodistillation, the crusts were removed from the balloon and placed into an oven (Biobase Brand, BJPX-JUNEAU model) at a temperature of 105 °C for 24 hours in order to eliminate a water content part to obtain a relative humidity of 12%. Then, they were ground in a

Clevenger a una temperatura de 90°C por un tiempo de 170 minutos, con la finalidad de eliminar compuestos que pudieran interferir en la fermentación, el proceso se realizó por triplicado.

Una vez realizada la hidroddestilación, las cortezas se retiraron del balón y se colocaron en una estufa (Marca Biobase, modelo BJPX-JUNEAU) a una temperatura de 105 °C por lapso de tiempo de 24 horas, con la finalidad de eliminar parte del contenido de agua y obtener una humedad relativa de 12 %. Posteriormente, se molieron en un molino (Marca Pulverisette 11) con un disco de abertura de 4,5 mm y una velocidad de rotación de 1700 rpm y se tamizaron en un equipo (Marca AISI 304) con una luz de malla de 0,420 mm (diámetro de 210 mm), hasta obtener un sólido pulverulento.

Análisis fisicoquímico de los residuos lignocelulósicos

El análisis fisicoquímico de los residuos lignocelulósicos de la cáscara de naranja se realizó de acuerdo al Método Oficial (AOAC, 2002). Para efectos de este trabajo se determinó, humedad, pH y fibra no soluble.

Tratamiento ácido – alcalino e hidrolisis enzimática

Se pesaron por triplicado 50 g de los residuos lignocelulósicos de la cáscara de naranja y se colocaron en los reactores discontinuos (Matraces Erlenmeyer de 1000 mL), en dos etapas simultáneas, respectivamente, tratamiento ácido (T1) y tratamiento alcalino (T2). El (T1) consistió en incorporar en los reactores ácido sulfúrico en tres concentraciones (2%, 4% y 6%, respectivamente), se adicionó

mill (Pulverisette 11 Brand) with a 4.5 mm aperture disc with a rotation speed of 1700 rpm and were sieved in an equipment (Brand AISI 304) with a mesh size of 0.420 mm (diameter of 210 mm), until obtained a powdery solid.

Physicochemical analysis of lignocellulosic residues

Was carried out according to the Official Method (AOAC, 2002). For the purposes of this research, the following parameters were determined: humidity, pH and insoluble fiber.

Acid-alkaline treatment and enzymatic hydrolysis

Initially, 50 g of the orange peel residues were weighed at three times and placed into the discontinuous reactors (Erlenmeyer flasks of 1000 mL), in two simultaneous stages, respectively, acid treatment (T1) and alkaline treatment (T2). The (T1) was carried out with sulfuric acid in three concentrations (2%, 4% and 6%, respectively) that were set into the reactors, then distilled water was added in a solid / liquid ratio 1:5 (m/v) and proceeded to heat to 150 °C for 30 min under an atmospheric pressure. For (T2) 0.74 g of calcium hydroxide were added for each gram of lignocellulosic residue in the three reactors. Then, the reactors were leveled to a volume of 720 mL with distilled water. The residues were placed in a 1000 mL beaker, covered with aluminum foil and placed in an oven at a temperature of 90 °C for 26 hours. Once cooled, they were washed several times with distilled water until a clear filtrate was obtained. The washed residues were placed

agua destilada en una relación sólido/líquido 1:5 (m/v) y se procedió a calentar a 150 °C por 30 min a una atmósfera de presión. El (T2) consistió en adicionar en los tres reactores 0,74 g de hidróxido de calcio por cada gramo de residuo lignocelulósico y se enrazó a un volumen 720 mL con agua destilada. Los residuos fueron colocados en un vaso de precipitado de 1000 mL, tapados con papel de aluminio y colocados en una estufa a una temperatura de 90°C por 26 horas. Una vez enfriado, se lavaron por sucesivas ocasiones con agua destilada hasta obtener un filtrado claro. Los residuos lavados se colocaron en vasos de precipitado y se neutralizaron con ácido cítrico al 20 % m/v, para nuevamente lavarlos con agua destilada, con el fin de eliminar los excedentes de hidróxido de calcio presente en la biomasa y proceder a ajustar el pH a 5,3.

Mediante el protocolo descrito, la biomasa se colocó en el reactor, en el cual se adicionaron las enzimas celulasas 12 UI.g⁻¹ de residuos lignocelulósicos y se incubaron a una temperatura de 50°C por 48 horas, posteriormente, se filtraron con papel Whatman de grado 1 (11 µm) obteniéndose un líquido de color pardo que contenía los azúcares fermentables.

Determinación de azúcares reductores

Para determinar el índice de sacarificación de los residuos lignocelulósicos se realizó la determinación de azúcares reductores, empleando el método colorimétrico con ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS), para lo cual se tomó una muestra

in beakers and neutralized with citric acid at 20% m/v, to be washed again with distilled water in order to eliminate the excess of calcium hydroxide present in the biomass and proceed to adjust the pH to 5.3.

Trough the described process, the biomass was placed into the reactor, in which cellulose enzymes 12 IU.g⁻¹ of lignocellulosic residues were added and incubated at a temperature of 50 °C for 48 hours. Subsequently, they were filtered with paper Whatman grade 1 (11 µm), obtaining a brown liquid with fermentable sugars.

Determination of reducing sugars

To determine the saccharification index of lignocellulosic residues, the determination of reducing sugars was carried out, using the colorimetric method with 3,5 dinitrosalicylic acid (DNS), for which a sample of four (4) mL was taken and placed in a test tube with 40 mL of distilled water, then was centrifuged at 10,000 rpm for 10 minutes. Once centrifuged, 0.5 mL of the dilution and 0.5 mL of the DNS reagent were added in a test tube, and placed in a bain Marie at 100 °C for a period of five (5) minutes. After It cooled, to room temperature, five (5) mL of distilled water was added. The absorbance measurement was realized on a SPECTRONIC 200 spectrophotometer (Thermo Scientific) at a wavelength of 540 nm. For quantification, a reducing sugars calibration curve was prepared using glucose (200-1000 mg.L⁻¹) as standard, and distilled water was used as a blank.

de cuatro (4) mL y se colocó en un tubo de ensayo con 40 mL de agua destilada, seguidamente, se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos. Una vez centrifugada, se adicionó 0,5 mL de la dilución y 0,5 mL del reactivo DNS en un tubo de ensayo y se colocó en un baño maría a 100 °C por un lapso de tiempo de cinco (5) minutos, se enfrió hasta temperatura ambiente y se le adicionó cinco (5) mL de agua destilada. La medición de la absorbancia se realizó en un espectrofotómetro SPECTRONIC 200 (Thermo Scientific) a una longitud de onda de 540 nm. Para la cuantificación se preparó una curva de calibración de azúcares reductores empleando como estándar glucosa (200-1000 mg.L⁻¹), y se utilizó agua destilada como blanco.

Fermentación alcohólica y destilación

El proceso de fermentación alcohólica se realizó en biorreactores adaptados a escala de laboratorio a una temperatura de 30°C durante nueve (9) días. Para ello, el líquido pardo obtenido de la hidrólisis de los tres biorreactores de aproximadamente seis (6) °Brix, se pasteurizó a 90 °C por 10 minutos para lograr inactivar las enzimas, luego se procedió a separar cada uno de los contenidos de los reactores en dos partes iguales para proceder a incorporar en cada reactor previamente adecuado 3 % y 6 % de levadura (*Sacharomyces cerevisiae*) y nutrientes (urea 0,48 g.L⁻¹ y fosfato ácido de potasio 0,24 g.L⁻¹), de acuerdo al procedimiento descrito por Paredes (2016). Al finalizar el proceso de fermentación se procedió a realizar la respectiva destilación utilizando un

Alcoholic fermentation and distillation

Was carried out in bioreactors adapted to a laboratory scale at a temperature of 30 °C for nine (9) days. The brown liquid obtained from the hydrolysis of the three bioreactors with approximately six (6) °Brix, was pasteurized at 90 °C for 10 minutes to inactivate the enzymes. Then it proceeded to separate each of the reactors contents in two equal parts, to incorporate in each reactor, previously adequate with 3% and 6% of yeast (*Sacharomyces cerevisiae*) and nutrients (urea 0.48 g.L⁻¹ and potassium acid phosphate 0.24 g.L⁻¹), according to the procedure described by Paredes (2016). At the end of the fermentation process, the respective distillation was realized using a laboratory distillation equipment to produce the bioalcohol.

Volatile organic compounds determination

The volatile organic compounds determination and the levels of ethanol, methanol, ethyl ether, and acetic acid was performed by gas chromatography using a gas chromatograph (Shimadzu brand, GC-2014 model) under controlled conditions of injection temperature on isocratic conditions at 250 °C for 60 min. The sample injection volume was 2 µL on an RTX 1701 column (30 m x 0.25 µm x 0.32 mm ID) and helium was used as a stripping gas. The quantification was carried out with the external standard method, using pure standards of ethanol, methanol and higher alcohols.

equipo de destilación de laboratorio obteniendo así el bioalcohol.

Determinación de compuestos orgánicos volátiles

La determinación directa de compuestos orgánicos volátiles y niveles de etanol, metanol, éter etílico y ácido acético; se realizó por cromatografía de gases empleando un cromatógrafo de gases (Marca Shimadzu, modelo GC-2014) en condiciones controladas de: temperatura de inyección en condiciones isocráticas a 250 °C por un lapso de tiempo de 60 min. El volumen de inyección de muestra fue de 2 μ L en una columna RTX 1701 (30 m x 0,25 μ m x 0,32 mm ID) y se usó helio como gas de arrastre. La cuantificación se realizó con el método de estándar externo, utilizando estándares puros de etanol, metanol y alcoholes superiores.

El contenido de bioalcohol expresado en grados Gaylusac se determinó mediante la utilización de un alcoholímetro digital (Marca Alcoscan Profesional, modelo Al 6000 Fda). Se determinó el rendimiento mediante un balance de masa considerando la cantidad de cáscaras de naranjas y la cantidad de bioalcohol obtenido.

Diseño experimental y análisis estadístico

Para el desarrollo experimental se utilizó un diseño factorial A*B con tres repeticiones por cada uno de los tratamientos. Los factores fueron las tres concentraciones de ácido sulfúrico (2 %, 4 % y 6 %) y dos niveles de levaduras (3 % y 6 %) por cada 100 g de cáscaras de naranja. Los datos se analizaron mediante el paquete

The bioalcohol content expressed in Gaylusac degrees was determined by using a digital breathalyzer (Alcoscan Professional Brand, Al 6000 Fda model). The yield was determined through a mass balance considering the orange peels quantity and the bioalcohol obtained quantity.

Experimental design and statistical analysis

For the experimental development, a factorial design A * B was used, three times for each of the treatments. The factors were the three concentrations of sulfuric acid (2%, 4% and 6%) and two levels of yeast (3% and 6%) per 100 g of orange peels. The data were analyzed using the IBM SPSS STATISTIC 21 statistical package, the averages were compared using the Tukey test (Multiple Range Test) and the interaction of two factors by the Microsoft Office Excel 2016 program.

Results and discussion

The physicochemical analysis results of the orange peels lignocellulosic residues are showed in Table 1.

The results made it possible to establish the ideal conditions that allowed altering not soluble fiber structure in reducing sugars. The insoluble fibers fraction present in the biomass is compound of 21.9% cellulose, hemicellulose and lignin. These results contrast with the orange peels characterization carried out by Angulo (2018), in which factors; pH, humidity and fiber of this type of biomass are similar.

estadístico IBM SPSS STATISTIC 21, los promedios se compararon mediante la prueba de Tukey (Múltiple Range Test) y la interacción de los dos factores mediante el programa de Microsoft Office Excel 2016.

Resultados y discusión

Los resultados de los análisis físico-químicos de los residuos lignocelulósicos de las cáscaras de la naranja se presentan en el cuadro 1.

Cuadro 1. Análisis físico-químicos de los residuos lignocelulósicos de la cáscara de naranja.

Table 1. Physico-chemical analysis of the orange peel lignocellulosic residues.

Párametro	Valor
pH	2,8 ± 0,02
Humedad (%)	12 ± 0,3
Fibra no soluble (%)	21,9 ± 0,48

Los resultados posibilitaron establecer las condiciones idóneas que permitieron alterar la estructura de la fibra no soluble en azúcares reductores. La fracción de fibras no solubles presente en la biomasa, está comprendido por 21,9 % de celulosa, hemicelulosa y lignina.

Estos resultados contrastan con la caracterización de cáscaras de naranja realizada por Angulo (2018), en la cual los factores; pH, humedad y fibra de este tipo de biomasa son similares.

La inclusión simultánea de un tratamiento ácido-alcalino a la hidrolisis enzimática, favorece significativamente la producción de azúcares reductores

The simultaneous inclusion of an acid-alkaline treatment to the enzymatic hydrolysis significantly favors the production of reducing sugars specifically when the concentration of sulfuric acid is increased to six (6) %, as shows table 2, differing from the results of the research realized by Padilla (2019), who only obtained levels of reducing sugars such as glucose in the range of 2.45 g.L⁻¹ - 4.90 g.L⁻¹, without applying any type of treatment prior

to enzymatic hydrolysis. However, is important to mention that, in the saccharification stage, similar conditions of time (48h), temperature (50 °C) and pH (5.3) were used.

According to Seogn *et al.* (2015), the use of sugars release (glucose, fructose and galactose) present in the hydrolyzate by the usage of a single variety of enzyme (cellulases), could increase their levels. Additionally, the author points out that it is more convenient to inoculate a mixture of specific enzymes (pectins, cellulases, glucosidases) to release a spectrum of greater reducing sugars variety (mannose, xylose, arabinose and

específicamente cuando se aumenta la concentración de ácido sulfúrico al seis (6) % como se puede evidenciar en el cuadro 2, diferenciándose de los resultados de la investigación realizada por Padilla (2019), quién sólo obtuvo niveles de azúcares reductores como la glucosa en el rango de 2,45 g.L⁻¹ - 4,90 g.L⁻¹, sin aplicar ningún tipo de tratamiento previo a la hidrolisis enzimática; cabe destacar que, en la etapa de sacarificación se utilizaron condiciones similares de tiempo (48h), temperatura (50°C) y pH (5,3).

rhamnose) that directly influence bioalcohol levels in fermentation process.

The results obtained in the fermentation process with two levels of *Sacharomyces cerevisiae* yeast, under standardized temperatures (30 °C) for 9 days and subjected to a simple distillation, to produce bioalcohol from orange peels, are presented in Table 3.

Comparing the different treatments in this research, it can be observing that with treatment B3 (6% sulfuric acid and 6% yeast) the highest bioalcohol production was

Cuadro 2. Contenido de azúcares reductores (g.L⁻¹) en los residuos lignocelulósicos de la cáscara de naranja.

Table 2. Reducing sugars content (g.L⁻¹) in the lignocellulosic orange peel residues.

Tratamiento	Glucosa	Fructosa	Galactosa	Arabinosa	Xilosa
2% (m ^o)	19,07a ± 0,51	20,35a ± 0,50	0,44a ± 0,21	0,48a ± 0,14	0,16a ± 0,08
4% (m ^o)	20,08b ± 0,60	21,34b ± 0,56	0,51a ± 0,15	5,69b ± 0,28	1,25b ± 0,53
6% (m ^o)	26,4c ± 0,77	21,26b ± 0,51	2,25b ± 0,18	6,01c ± 0,27	1,56c ± 0,25
ANOVA P(0,05)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Los valores son medias (n=3) con su desviación típica y las medias que poseen las mismas letras no representan una diferencia significativa a P (0,05) según la prueba de Tukey.

The values are means (n = 3) with their standard deviation and the means that have the same letter; Do not represent a significant difference at P (0.05), according to the Tukey test.

Según los datos obtenidos en el cuadro 2 es notable que el tratamiento ácido-alcalino favorece drásticamente el proceso de sacarificación producida por las enzimas celulasas, las cuales, al ser adicionadas en cada residuo previamente tratado, garantizan un índice positivo de ruptura de celulosa (liberación de azúcares) en condiciones estandarizadas de tiempo, temperatura y pH.

obtained (12.72 g.L⁻¹), which directly influenced the processes fermentation and distillation. These results are lower than those obtained in the research carried out by Seogn *et al.* (2015), who using an immobilized cell reactor (ICR) in the fermentation obtained ethanol concentrations of 29.5 g. L⁻¹.

In relation to the rest of the evaluated treatments, the treatment

De acuerdo con Seogn *et al.* (2015), el aprovechamiento de la liberación de azúcares (glucosa, fructosa y galactosa) presentes en el hidrolizado por la utilización de una sola variedad de enzima (celulasas), podría incrementar sus niveles. Adicionalmente, el autor señala que es de mayor conveniencia inocular una mezcla de enzimas específicas (pectinadas, celulasas, glucosidasas) para liberar un espectro de mayor variedad de azúcares reductores (manosa, xilosa, arabinosa y ramnosa) que influyen directamente en los niveles de bioalcohol en el proceso de fermentación.

Los resultados obtenidos en el proceso de fermentación con dos niveles de levadura *Sacharomyces cerevisiae*, por un lapso de tiempo (9 días) y temperaturas (30°C) estandarizados y sometidos a una destilación simple para la obtención de bioalcohol de las cáscaras de naranja, se presentan en el cuadro 3.

Cuadro 3. Rendimiento de bioalcohol (g.L⁻¹) de los residuos lignocelósicos de cáscara de naranja.

Table 3. Bioalcohol yield (g.L⁻¹) of the orange peel lignocelulosic residues.

Tratamiento	Contenido de alcohol (g.L ⁻¹)
A1 (3 % lev) (2 % acd)	8,56a ± 0,52
A2 (3 % lev) (4 % acd)	9,8b ± 0,61
A3 (3 % lev) (6 % acd)	11,52c ± 0,09
B1 (6 % lev) (2 % acd)	8,63a ± 0,36
B2 (6 % lev) (4 % acd)	10,43d ± 0,48
B3 (6 % lev) (6 % acd)	12,72e ± 0,65
ANOVA P(0,05)	<0,001

Los valores son medias (n=3) con su desviación típica y las medias que poseen las mismas letras no representan una diferencia significativa a P (0,05) según la prueba de Tukey. lev = Levadura *Sacharomyces cerevisiae*. acd = ácido sulfúrico.

The values are means (n = 3) with their standard deviation and the means that have the same letter; Do not represent a significant difference at P (0.05), according to the Tukey test. lev = *Sacharomyces cerevisiae* yeast. acd = sulfuric acid.

Puede observarse que, de los diferentes tratamientos en estudio, con el tratamiento B3 (6 % de ácido sulfúrico y 6% de levadura) se obtuvo la mayor producción de bioalcohol (12,72 g.L⁻¹), lo cual influyó directamente en los procesos de fermentación y destilación. Estos resultados son menores a los obtenidos en la investigación realizada por Seogn *et al.* (2015), quien al utilizar un reactor celular inmovilizado (ICR) en la fermentación obtuvo concentraciones de etanol de 29,5 g.L⁻¹.

Con respecto al resto de los tratamientos evaluados, con el tratamiento A1 (2% de ácido sulfúrico y 3 % de levadura), se obtuvo el menor contenido de bioalcohol (8,56 g.L⁻¹), contrastando con los resultados obtenidos por Padilla (2019), en el cual los índices de rendimiento de producción de bioalcohol están en el rango de 1,65 g.L⁻¹ a 4,16 g.L⁻¹ sin aplicar un tratamiento ácido – alcalino.

El bioalcohol obtenido de los residuos lignocelulósicos de la cáscara de naranja (*Citrus Sinensis*) fue sometido a la determinación de la graduación alcohólica y el contenido de sustancias orgánicas mediante cromatografía de gases. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 4.

El bioalcohol obtenido de los residuos lignocelulósicos de la naranja por sacarificación y fermentación posee 43 grados Gay Lussac (°GL) y está constituido principalmente por etanol (76,96 %), siendo este valor superior al reportado por Benalcázar (2019), en la generación de un biocombustible de cáscaras

generation from orange and potato peels had an ethanol percentage of 73.92%. This difference could be on the hydrolysis stage, in which a greater quantity of reducing sugars was produced and therefore a greater quantity of ethanol was obtained.

Other organic substances such as 2,3 dihydrofuran, methanol, ethyl ether are present in a lower proportion.

Conclusion

Lignocellulosic residues constitute one of the main vegetable by-products that tend to be disposed without receiving any type of treatment within the agri-food industry and for being carbohydrates with high molecular weight, they are not brought under an adequate process to be used. In this case, the orange peels (*Citrus sinensis*) were subjected to an acid-alkaline treatment, saccharified by enzymatic hydrolysis with cellulose enzymes, fermented with *Saccharomyces cerevisiae* yeasts and distilled. Obtaining as a result bioalcohol with a 76.96% ethanol, which allows to propose this process as an alternative to maximize the use not only of the orange peels, otherwise all types of vegetal biomass that has within its compositional structure a high fiber content that can be used as a by-product taking into account that the research is the first step to carry out an agro-industrial process.

End of English Version

de naranja y papa, en el cual el porcentaje de etanol es de 73,92 %. Esta diferencia pudiera radicar en la etapa de hidrólisis, en las cuales se produjo una mayor cantidad de

azúcares reductores y por ende se obtuvo una mayor cantidad de etanol.

Otras sustancias orgánicas como 2,3 dihydrofuran, metanol, éter etílico están presentes en menor proporción

Cuadro 4. Contenido de sustancias orgánicas (%).

Table 4. Organic substances content (%).

Descripción	Cantidad %
Etanol	76,96
2,3 Dihydrofuran	21,86
Metanol	0,71
Éter etílico	0,47
Ácido acético	0,00

Conclusión

Los residuos lignocelulósicos constituyen unos de los principales subproductos vegetales que tiende a ser desechados directamente sin recibir ningún tipo de tratamiento dentro de la industria agroalimentaria y por ser carbohidratos de alto peso molecular no son sometidos a un proceso adecuado para ser aprovechados dentro de la industria, ante lo cual una vez sometida la cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*) a un tratamiento ácido-alcalino, sacarificado mediante hidrólisis enzimáticas con enzimas celulasas, fermentado con levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y destilado se obtuvo un bioalcohol con un 76,96% de etanol, lo cual permite plantear como una alternativa para el aprovechamiento máximo no solo de las cáscaras de naranja sino de todo tipo de biomasa vegetal que posee dentro de su estructura composicional un alto contenido de

fibra que puede ser aprovechada como subproducto Teniendo en cuenta que la investigación es el primer paso para realizar un proceso agroindustrial.

Literatura citada

- Alata, E., Y. Cuadros, L. Miranda, y E. Medina. 2019. Biopelículas Producidas con Cáscaras de Naranja y Reforzadas con Celulosa Bacteriana. Rev. Soc. Quím. Perú. 85(2), 231-241. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v85n2/a10v85n2.pdf>
- Angulo, V. 2018. Caracterización de subproductos agroindustriales: naranja y maracuyá. Rev. Ingeniería y Región. 20: 59-66. Disponible en: <https://journalusco.edu.co/index.php/region/article/view/1916>.
- AOAC. 2002. Official Methods of Analysis. 17 ed. USA. Disponible en: www.aoac.org.
- Benalcázar, H., M. Benavides, D. Córdoba y P. Ortega. 2019. Generación de un biocombustible, producto de la cáscara de naranja y papa. Boletín Informativo CEI. 6(1), 89-96. Disponible en: <http://editorial.umariana.edu.co/revistas/index.php/BoletinInformativoCEI/article/download/1953/2032>

- USDA, United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service. 2021. Citrus: World Markets and Trade. Available in: en: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>
- Cando, S., R. Fernández y K. Cando. 2019. Los biocombustibles: análisis de los cultivos energéticos y la biomasa lignocelulósica. Universidad Ciencia y Tecnología. 1(3):132-138. Disponible en: <http://uctunexpo.autanabooks.com/index.php/uct/article/view/96/95>
- Carranza, D., J. Alvarado, D. Méndez, C. Valenzuela y J. Solanilla. 2015. Pretratamiento de residuos de banano para la obtención de azúcares fermentables. Rev. venez. cienc. tecnol. Alimento. 6(1): 22. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/298524897_Pretreatment_of_residues_from_plantain_Musa_paradisica_L_AAB_and_arracacha_Arracacia_xanthorrhiza_Bancroft_for_obtaining_fermentable_sugars
- Manrique, A. 2018. Visión general del aprovechamiento de residuos cítricos como materia prima de biorrefinerías. Cuadernos del Tomás, (10): 153-168. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/6573031.pdf>
- Melo, J., S. Saavedra, A. Jacipt. 2017. Evaluación de la adsorción de Cu⁺² y azul de metileno en biosorbentes de bajo costo obtenidos a partir de biomasa residual de la agroindustria de cítricos. Revista Ambiental Agua, Aire y Suelo 8(2):15-26. Disponible en: http://revistas.unipamplona.edu.co/ojs_viceinves/index.php/RA/article/view/3277/1911
- Morales, S. 2015. Hidrólisis ácida de celulosa y biomasa lignocelulósica asistida con líquidos iónicos. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias, Departamento de Química-Física Aplicada. Tesis doctoral. Disponible en: https://digital.csic.es/bitstream/10261/132717/1/morales_de_la_rosa_silvia.pdf
- Ordoñez, E., D. Reátegui y J. Villanueva. 2018. Polifenoles totales y capacidad antioxidante en cáscara y hojas de doce cítricos. Sci. agropecu. 9(1), 113-121 Padilla, R. 2019. Obtención de bioetanol a partir de residuos de naranja (*Citrus sinensis*) y limón (*Citrus aurantifolia*) mediante enzimas celulolíticas. Universidad Tecnológica Equinoccial. Facultad Ciencias de la Ingeniería e Industrias, Ingeniería Ambiental y Manejo de Riesgos Naturales. Tesis - UIO <http://repositorio.ute.edu.ec/handle/123456789/20705>
- Paredes, D. 2016. Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos para ser utilizadas en el proceso de obtención de bioalcohol de residuos del cultivo de banano. Revista Tecnológica-ESPOL, 23(1): 81-88
- Pascual, I. 2019. Producción Biotecnológica de Ácido D-Láctico a partir de residuos de naranja. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Ingeniería Química y de Materiales. Tesis doctoral. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/id/eprint/58053/1/T41519.pdf>
- Seogn, Ch., Y. Lee, S. Kumar, B. Jae y H. Jong. 2015. A low-energy, cost-effective approach to fruit and citrus peel waste processing for bioethanol production. Applied Energy. 140, 65-74.