



**UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC**

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**COMPARACIÓN ENTRE DIFERENTES MÉTODOS DE
PRETRATAMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE
AZÚCARES FERMENTABLES A PARTIR DEL RASTROJO
DE AMARANTO**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

Biol. DALIA YVETTE CHAVEZ VALERIO

DIRECTOR

Dra. MARÍA DE JESÚS GARCÍA GÓMEZ

CO-DIRECTOR

Dra. RUBÍ GUADALUPE UTRILLA COELLO

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca. Junio, 2021



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DL.PE2021/MB/011
ASUNTO	Asignación de jurado de examen de grado

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 13 de enero de 2021

C. DALIA YVETTE CHÁVEZ VALERIO
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de Maestría en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores.

Dr. Oscar Nuñez García	Universidad del Papaloapan	Presidente
Dr. Cirilo Nolasco Hipólito	Universidad del Papaloapan	Secretario
Dra. María de Jesús García Gómez	Universidad del Papaloapan	Vocal
Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia	Cátedra CONACyT	1er Suplente
Dr. Andrés Aguino Cruz	Universidad del Papaloapan	2do Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente

Atentamente, como siempre
Bco. Loarnic, ch'j'já



Adolfo López Torres
de la División de Estudios
de Posgrado

Cop. Dra. María de Jesús García Gómez – Director de tesis.
Cop. Dra. Jacqueline Casataz Isturi – Coordinadora de la Maestría en Biotecnología
Cop. M. E. Yesenia Esmeralda Arriaga – Jefa de Servicios Escolares
Cop. Archivo

M. en C. Héctor López Arriaga
Vice-rector Académico
Vo. Bu.



**VICE-RECTORÍA
ACADÉMICA**

CAMPUS TUXTEPEC

Av. Emilio Carrón S/N, 70600 Tuxtepec, Oaxaca
Tl. (52) 961 314 11 00 00
www.unpa.mx

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA

Av. Emilio Carrón S/N, 70600 Tuxtepec, Oaxaca
Tl. (52) 961 314 11 00 00
www.unpa.edu.mx



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2021/MBT/077
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 18 de junio de 2021

M. EN C. HÉCTOR LÓPEZ ARJONA
VICE-RECTOR ACADÉMICO
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestra en Biotecnología de la C. Dalia Yvette Chávez Valerio, matrícula 18140001, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título “Comparación de diferentes métodos de pretratamiento para la obtención de azúcares fermentables a partir del rastrojo de amaranto”, para su posterior presentación y defensa por parte de la sustentante.

De antemano agradezco su atención, sin más que agregar, quedo a sus órdenes

Atentamente
terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú

Dr. José Abad Zavaleta

Jefe de la División de Estudios de Posgrado



C.c.p. C. Dalia Yvette Chávez Valerio– Estudiante
C.c.p. Dra. María de Jesús García Gómez – Directora de Tesis
C.c.p. Dra. Jacqueline Capataz Tafur – Coordinadora de la maestría en Biotecnología
C.c.p. M.E. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa de Servicios Escolares
C.c.p. Archivo

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/ N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230

CARTA DE RESPONSABILIDAD

Por medio de la presente hacemos constar que el trabajo de tesis "**Comparación entre diferentes métodos de pretratamiento para la obtención de azúcares fermentables a partir del rastrojo de amaranto**" es responsabilidad de los C. **Dra. María de Jesús García Gómez** , **Dra. Rubi Guadalupe Utrilla Coello** y **Dalia Yvette Chávez Valerio**, y que ni los datos experimentales ni el texto han sido aceptados o empleados para el otorgamiento de título, grado diferente o adicional al actual en el país o en el extranjero. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas y ésta fue examinada por un comité tutorial, conformado por: *Dr. Andrés Aguirre Cruz, Dra. Rubi Guadalupe Utrilla Coello y Dra. María de Jesús García Gómez*; así como un jurado de examen conformado: *Dr. Oscar Núñez Gaona Marroquín, Dr. Cinilo Nolasco Hipólito y Dra. María de Jesús García Gómez* de acuerdo con el Reglamento General de Posgrado vigente, con la finalidad de darle seguimiento al estudiante, así como validar que es un trabajo de investigación original e inédito.

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca a 19 de junio del 2021.

ATENTAMENTE,



Biol. Dalia Yvette Chavez Valerio



Dra. María de Jesús García Gómez



Dra. Rubi Guadalupe Utrilla Coello

RECONOCIMIENTO

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Bioprocesos de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec bajo la dirección de la Dra. María De Jesús García Gómez y codirección de la Dra. Rubí Guadalupe Utrilla Coello.

Se contó con el apoyo de la beca CONACyT con número de becario 942292 en el marco del programa de Maestría en Biotecnología con registro PNPC 003131. Así mismo con el apoyo Complementario para Mujeres Indígenas Becarias CONACyT.

AGRADECIMIENTOS

A CONACyT por el apoyo otorgado

A la Dra. María de Jesús García Gómez por la paciencia y apoyo durante estos dos años y término de este proceso.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, que estuvieron conmigo durante este proceso, accediendo a mis dudas y apoyándome.

A mis padres por estar conmigo durante esta etapa

DEDICATORIA

A mi hija Dara, por motivarme cada día.

Espero que algún día leas este escrito y te sientas orgullosa de que sea tu mamá

Lograras todas tus metas, siempre y cuando te lo propongas, nunca desistas así
se presenten obstáculos en tu camino.

Estudia, prepárate para la vida, no existe mejor arma en el mundo que el
conocimiento.

LISTA DE ABREVIATURAS

%: Porcentaje

°C: Grado Celsius

DNS: Ácido dinitrosalicílico

g: Gramo

h: Hora

mg: Miligramo

mL: Mililitro

nm: Nanómetro

PSI: lb/pulg²

p/v: Peso/ volumen

rpm: Revoluciones por minuto

sp: Especie

US: Ultrasonido

INDICE DE CONTENIDO

I. Introducción	9
II. Marco teórico	11
2.1 Materiales lignocelulósicos.....	11
2.2 Componentes estructurales de la biomasa lignocelulósica.....	12
2.2.1 Componentes químicos.....	12
2.3 Rastrojo de amaranto (<i>Amaranthus hypochondriacus</i>).....	15
2.4 Procesos de transformación de materiales lignocelulosico.....	16
2.4.1 Pretratamiento del material lignocelulósico	17
2. 5 Aplicaciones del ultrasonido.....	21
2.5.1 Homogenización.	21
2.5.2 Ruptura celular por ultrasonido	22
2.5.3 Efecto del ultrasonido sobre el tratamiento alcalino.....	22
2.5.4 Reacciones secundarias ocurridas durante la degradación de material lignocelulósico.....	24
2.6 Hidrólisis enzimática	25
2.6.1 Enzimas comerciales para hidrólisis de celulosas y hemicelulosas	27
2.6.3 Factores clave en la hidrólisis enzimática.....	29
2.6.4 Carga de sólidos en la hidrólisis enzimática.	30
III. Justificación	31
IV. Hipótesis.....	32
V. Objetivos.....	32

5.1 Objetivo general	32
5.2 Objetivos específicos.....	32
VI. Materiales y métodos.....	33
6.1 Materiales	33
6.1.1 Rastrojo de amaranto.....	33
6.1.2 Enzima.....	33
6.2 Métodos	33
6.2.1 Análisis químico proximal	33
6.2.2 Métodos empleados para el pretratamiento de deslignificación del rastrojo de amaranto.....	34
6.3 Determinación de azúcares reductores.....	37
6.4 Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR)	37
6.5 Sacarificación del rastrojo de amaranto pretratado	37
6.5.1 Hidrólisis enzimática convencional	37
6.5.3 Hidrólisis enzimática asistida por ultrasonido	38
6.6 Análisis estadístico.....	38
VII. Resultados y discusiones	39
7.1 Análisis de la composición química proximal del rastrojo de amaranto	39
7.2 Obtención de azúcares reductores utilizando diferentes métodos de pretratamiento.....	40
7.2.3 Pretratamiento alcalino.....	44
7.3 Comparación de la productividad de los métodos empleados	50

7.4 Análisis estructural por Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR).....	51
7.4 Hidrólisis enzimática	55
7.4.1 Hidrólisis enzimática convencional	56
7.4.2 Rendimiento de la hidrólisis enzimática convencional del rastrojo de amaranto pretratado.....	57
7.4.3 Hidrólisis enzimática asistida por ultrasonido	59
VIII. Conclusiones	63
XIV. Perspectivas.....	64
X. Bibliografía.....	65
Anexo I.....	71

INDICE DE TABLAS

Núm.	Título	Pág.
1	Taxonomía de la planta de amaranto (<i>Amaranthus hypochondriacus</i>).....	16
2	Clasificación de los tipos de tratamientos	19
3	Microorganismos productores de enzimas comerciales.....	28
4	Parámetros utilizados para el tratamiento de ultrasonido.....	35
5	Análisis químico proximal de la harina de forraje de amaranto (tallos y hojas) obtenida después de la cosecha del grano.....	39
6	Efecto de la concentración del álcali sobre la obtención de azúcares reductores utilizando el enfoque asistido por ultrasonido.....	48
7	Resultados obtenidos durante el proceso de hidrólisis convencional del rastrojo de amaranto pretratado.....	58
8	Resultados obtenidos durante el proceso de hidrólisis convencional del rastrojo de amaranto pretratado.....	61

INDICE DE FIGURAS

Núm.	Título	Pág.
1	Componentes estructurales y no estructurales de la biomasa lignocelulósica.....	10
2	Estructura química de la celulosa.....	11
3	Estructura general de la lignina.....	13
4	Esquema del proceso de transformación de los materiales lignocelulósicos.....	15
5	Reacciones secundarias ocurridas durante la degradación de material lignocelulósico.....	24
6	Ecuación de la transformación de celulosa a unidades monoméricas de glucosa.....	26
8	Concentración de azúcares reductores obtenidos en el tratamiento con vapor.....	41
9	Efecto de los parámetros, ciclo de trabajo y amplitud de sonicación, sobre la obtención de azúcares reductores en el tratamiento de ultrasonido.....	43
10	Concentración de azúcares reductores obtenidos en el tratamiento químico (NaOH 3.5 N).....	45
11	Concentración de azúcares reductores obtenidos en el tratamiento combinado (NaOH 3.5 N + vapor).....	47
12	Efecto de la concentración de NaOH sobre la producción de azúcares reductores después de un tratamiento con ultrasonido.....	49
13	Comparación del efecto del ultrasonido sobre los diferentes pretratamientos probados.....	51
14	Espectros FT-IR de los diferentes pretratamientos aplicados al rastrojo de amaranto.....	52

15	Espectros de los tratamientos con mejor resultados en cuanto a obtención de azúcares reductores.....	54
16	Derivada del pico de absorción perteneciente al grupo carbonilo de la lignina.....	55
17	Azúcares reductores obtenidos durante el proceso de hidrólisis enzimática convencional.....	57
18	Azúcares reductores obtenidos durante el proceso de hidrólisis enzimática asistida por ultrasonido.....	60

RESUMEN

Los residuos agroindustriales están adquiriendo cada vez mayor importancia por su uso en diversos procesos fermentativos, incluyendo, la producción de sustancias con actividad biológica de valor industrial, para esto, los azúcares fermentables son un grupo de compuestos claves, para estos procesos, sin embargo, para obtener estos compuestos se debe llevar a cabo una serie de pasos que faciliten su liberación. El pretratamiento es un paso crucial para la obtención de estos compuestos. Por tal motivo el objetivo del presente trabajo de investigación fue encontrar el método adecuado para la deslignificación del rastrojo de amaranto y posterior producción de azúcares fermentables, para ello se probaron cinco métodos de pretratamiento, los cuales se clasificaron en, físico (I. vapor y II. ultrasonido), químico (III. Hidrólisis alcalina), y combinado (IV. Pretratamiento alcalino + vapor y V. NaOH (2, 2.5, 3, 3.5 N) + Ultrasonido), se utilizó el método de Miller (DNS) para determinar la concentración de azúcares reductores, lo que indicaría la degradación de la lignocelulosa; esto se corroboró por la técnica de espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR). Los métodos con los que se obtuvieron la mayor concentración de azúcares reductores fueron los pretratamientos, físico (II. Ultrasonido, 7.9 ± 0.12 mg/mL) y combinado (V. 3.5 N + ultrasonido, 8.1 ± 0.23). Una vez que se definió el método de pretratamiento, se realizó el proceso de sacarificación por hidrólisis enzimática convencional y asistida por ultrasonido, observándose mayor eficacia con esta última.

ABSTRACT

Agroindustrial residues are becoming increasingly important due to their use in various fermentation processes, including the production of substances with biological activity of industrial value, for this, fermentable sugars are a group of key compounds, for these processes, however, to obtain these compounds, a series of steps must be carried out to facilitate their release. Pretreatment is a crucial step in obtaining these compounds. For this reason, the objective of this research work was to find the appropriate method for the delignification of amaranth stubble and subsequent production of fermentable sugars, in this work, five pretreatment methods were tested, which were classified as physical (I. vapor and II. Ultrasound), chemical (III. Alkaline hydrolysis), and combined (IV. Alkaline pretreatment + steam and V. NaOH (2, 2.5, 3, 3.5 N) + Ultrasound), the Miller method (DNS) was used to determine the concentration of reducing sugars, which would indicate the degradation of lignocellulose; this was corroborated by the Fourier transform infrared transmission spectroscopy (FTIR) technique. The methods showed higher productivity in terms of reducing sugars were pretreatments, physical (II. Ultrasound, 7.87 ± 0.12 mg / mL) and combined (V. 3.5 N + ultrasound, 8.08 ± 0.23). Once the pretreatment method was defined, the saccharification process was carried out by conventional enzymatic hydrolysis and assisted by ultrasound, observing greater efficiency with the latter.

I.INTRODUCCIÓN

La crisis energética mundial y la contaminación ambiental derivada del uso de recursos fósiles convencionales, concretamente petróleo, carbón y gas natural, han llevado a la búsqueda y explotación de recursos alternativos renovables, sostenibles, eficientes y rentables para la fabricación de productos de interés y con mayor valor agregado, una de estas alternativas es el uso de residuos de biomasa lignocelulósica, ya que este tipo de recurso no compite directamente con los alimentos destinados al consumo humano o animal y, permite aprovechar las grandes cantidades generadas en los procesos agroindustriales. A su vez, esta biomasa adquiere mayor importancia por su uso en diversos procesos fermentativos, para la producción de sustancias con actividad biológica de valor industrial (Méndez - Arango, *et al.*, 2019). Por otro lado, el uso de materiales lignocelulósicos provenientes de las actividades agrícolas, contribuye a mitigar el proceso de contaminación ambiental, dado que estos residuos en sus diferentes etapas de producción son actualmente una problemática, debido a que en su mayoría no tienen un manejo o disposición final adecuada (Vargas y Pérez, 2018).

A pesar de que la biomasa lignocelulósica obtenida de residuos agroindustriales ofrece una alternativa considerable para la producción de sustancias de valor industrial, el proceso de transformación es complejo, constando de tres pasos fundamentales; pretratamiento, sacarificación y fermentación (Subhedar, *et al.*, 2016). Estos procesos proporcionan sostenibilidad económica, que se ve desafiada por la crisis energética y la contaminación ambiental.

El pretratamiento es un proceso importante para transformar la biomasa lignocelulósica en productos químicos de alto valor; aumentan significativamente la tasa de producción, debido a que provocan una liberación mayor de azúcares para la etapa de hidrólisis, removiendo la lignina y la hemicelulosa, dejando así el paso accesible al ataque enzimático, permitiendo llegar a obtener mejores rendimientos (Araújo., *et al.*, 2019), en comparación con la hidrólisis realizada a sustratos sin tratamiento previo. Hay que destacar; que, dependiendo el método de pretratamiento,

este puede ser costoso, requerir grandes cantidades de tiempo y originar posibles amenazas ambientales, en el caso del uso de químicos agresivos (Subhedar *et al.*, 2018).

La función principal de la sacarificación de los residuos lignocelulósicos pretratados es la obtención de azúcares solubles contenidos en sus fibras, los cuales son un compuesto intermediario clave para la producción de diversas sustancias. La sacarificación es llevada a cabo por medio de un proceso de hidrólisis enzimática el cual es más eficiente en comparación con otros métodos, como la hidrólisis ácida (Ponce, 2015).

Tanto el proceso de pretratamiento como el de hidrólisis se pueden mejorar mediante la aplicación de ultrasonido. Para el caso de los pretratamientos, el uso de ultrasonido mejora el contacto entre la biomasa y los reactivos, utilizando un menor tiempo y obteniendo mejores rendimientos, lo mismo sucede en el proceso de hidrólisis enzimática asistida por ultrasonido, se obtiene mayores rendimientos en menor tiempo (Subhedar *et al.*, 2018).

El objetivo general de este trabajo de investigación fue producir azúcares reductores a partir del rastrojo de amaranto mediante diferentes pretratamientos físicos y químicos.

II.- MARCO TEÓRICO

2.1 MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS

Los materiales lignocelulósicos; contienen un alto porcentaje de celulosa, hemicelulosa y lignina en su composición (Vargas y Pérez, 2018), lo cual favorece su uso como materia prima en diferentes procesos o en la elaboración de productos con un valor agregado, amigables con el ambiente y similares a los productos obtenidos con materias primas convencionales.

Son fuentes rentables, renovables y abundantes para una utilización eficiente como piensos, aunque cada año una gran parte de los residuos agrícolas se desechan sin darles otro uso. (Subhedar *et al.*, 2018).

García (2009) reportó que los compuestos lignocelulósicos tienen alto contenido de material fermentable, pero que el acceso a estos (pectina, hemicelulosa y celulosa) por hongos o enzimas constituye la principal limitante de la fermentación.

Los azúcares obtenidos de los materiales lignocelulósicos también se pueden transformar en productos químicos como la acetona, ácido láctico y aminoácidos utilizando microorganismos. Debido a la complejidad y resistencia de la biomasa lignocelulósica para la hidrólisis enzimática, es necesario aplicar un método de pretratamiento apropiado para el material, con la finalidad de proporcionar una mejora en la accesibilidad de las enzimas hacia los carbohidratos.

Para seleccionar la alternativa más apropiada para el aprovechamiento y posterior tratamiento de un residuo agroindustrial es necesario conocer su composición, la calidad de sus componentes, la cantidad que se genera y tener en cuenta que este proceso produce un nuevo residuo que puede tener otra aplicación o convertirse en un desecho (Taherzadeh y Karimi, 2015b).

2.2 COMPONENTES ESTRUCTURALES DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

Se denominan materiales lignocelulósicos o biomasa lignocelulósica a los materiales que tienen como característica común el estar formados en su mayor parte por polisacáridos (celulosa y hemicelulosas) y lignina (polímero de naturaleza fenólica), lo que les otorga sus propiedades características (Vega, *et al.*, 2018).

2.2.1 Componentes químicos. Los componentes químicos de la pared celular de los materiales lignocelulósicos se dividen en dos secciones como se puede apreciar en la figura 1.

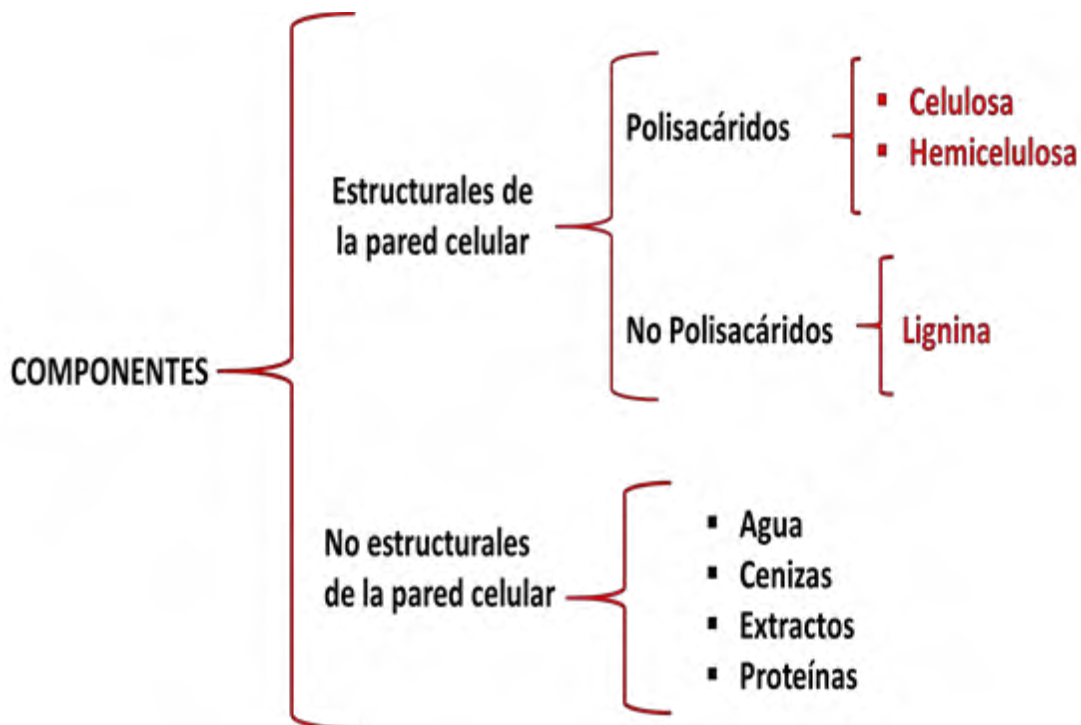


Figura 1. Componentes estructurales y no estructurales de la biomasa lignocelulósica (Modificada de Ares, 2015).

2.2.1.1 Polisacáridos

Celulosa. La celulosa es un polímero estructural presente como microfibrillas en las paredes celulares de las plantas. El polímero de celulosa se compone de unidades de celobiosa, dímeros de glucosa, con cada monómero orientado 180° entre sí.

La celulosa ($C_6H_{10}O_5$)_n, es el polímero más abundante en la tierra ya que es el componente mayoritario de las paredes celulares de las plantas, formado por unidades monoméricas de D-glucopiranosas unidas por enlaces β (1→4), que forman largas cadenas lineales altamente estables y resistentes llamadas microfibrillas, unidas por puentes de hidrógeno entre grupos hidroxilo. Normalmente cada cadena tiene entre 500 y 15000 unidades de glucosa dependiendo del tipo de planta. Las uniones por puente de hidrógeno entre las cadenas de celulosa hacen que los polímeros sean rígidos, lo que impide la flexión de las moléculas y dificulta la hidrólisis de los enlaces glucosídicos. (Ares, 2015). Es un polímero semi cristalino, ya que presenta regiones cristalinas donde las microfibrillas tienen una estructura altamente ordenada y regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática (figura 2).

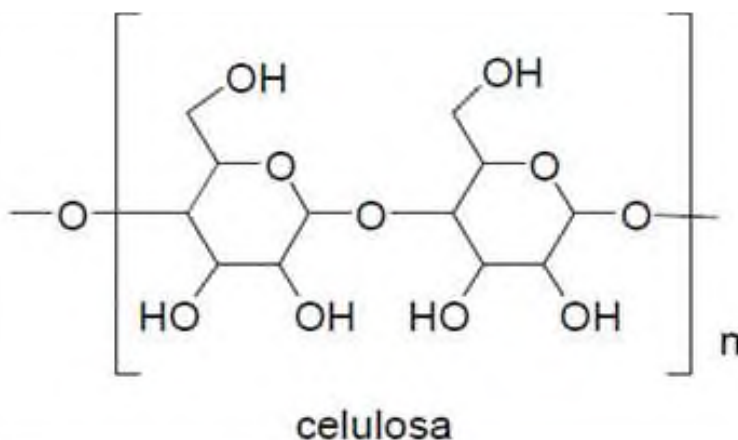


Figura 2. Estructura química de la celulosa (Modificada de Taherzadeh y Karimi, 2015a).

Cristalinidad de la celulosa: Las microfibrillas de celulosa tienen regiones tanto cristalinas como amorfas. Alrededor de 2/3 de la celulosa total se encuentra en la forma cristalina. Su área de superficie accesible y la protección con lignina y

hemicelulosa, los grados de polimerización y de acetilación de las hemicelulosas son los principales factores que afectan su velocidad de degradación biológica por las enzimas (Taherzadeh y Karimi, 2015a).

Hemicelulosa. La hemicelulosa $(C_5H_8O_4)_n$; es el segundo polímero más abundante de la tierra, forma las paredes celulares de las plantas, rodea las fibras de celulosa y la protege del ataque enzimático. La cadena principal puede estar constituida por una sola unidad (homopolímero) o varias unidades (heteropolímero), la clasificación de las hemicelulosas se hace con base a los monosacáridos que constituyen la cadena principal del polímero y sus ramificaciones, por ejemplo, se denominan xilanos, mananos, galactanos, glucanos, glucomananos, galactoglucomanano, etc., que a su vez puede presentar una gran variedad de ramificaciones (Serrato, 2018).

Los métodos de pretratamiento pueden eliminar las hemicelulosas y, en consecuencia, mejorar la hidrólisis enzimática, pero la mayoría de estos procesos también eliminan en parte la lignina, por lo que la mejora no resulta solo de la eliminación de la hemicelulosa, cabe mencionar que la superficie accesible para el ataque enzimático puede estar relacionada con la cristalinidad de la celulosa, la lignina y el contenido de hemicelulosa. La hemicelulosa se puede hidrolizar por hidrólisis enzimática por hemicelulasa, sin embargo, un tratamiento previo adecuado, por ejemplo, con ácido diluido se degrada la hemicelulosa, elimina o reduce la necesidad de utilizar mezclas de enzimas, hemicelulasas para degradar la biomasa (Cortínez, 2010).

2.2.2. No polisacáridos

Lignina. La lignina $(C_9H_{10}O_3(OCH_3)_{0,9-1,7})_n$, es una estructura compleja, después de la celulosa y la hemicelulosa, es el tercer polímero más abundante de la tierra que forma los materiales lignocelulósicos, formada por la polimerización de unidades de fenilpropano mediante la formación de diferentes tipos de enlaces entre unidades de forma aparentemente desordenada, por lo regular la lignina se encuentra situada en el espacio intercelular y en la pared primaria de la célula, ya que la celulosa y

hemicelulosa se encuentran fuertemente ligadas a la lignina; mientras mayor es la proporción de lignina, mayor es la resistencia a la degradación química y enzimática (Serrato, 2018).

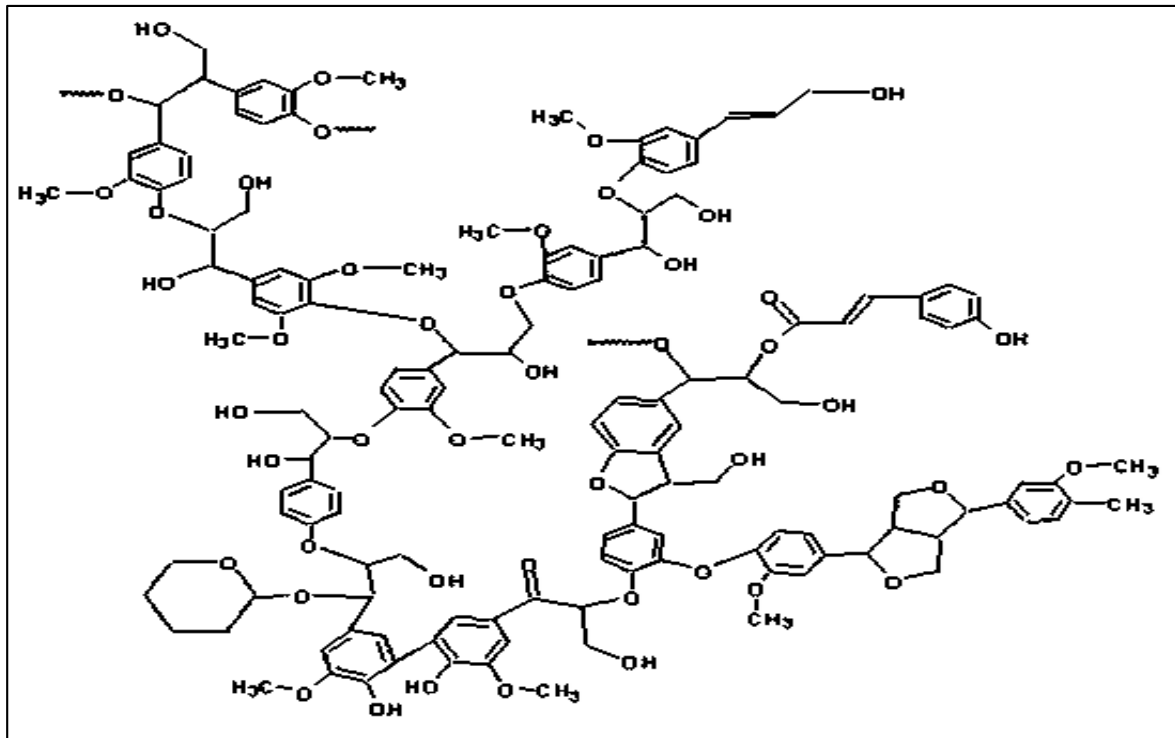


Figura 3. Estructura general de la lignina (Modificada de Taherzadeh y Karimi, 2015a).

2.3 RASTROJO DE AMARANTO (*Amaranthus hypochondriacus*)

El amaranto pertenece a las plantas herbáceas y anuales. Actualmente, sus especies se distribuyen en regiones de clima templado y cálido, dispersadas por el ser humano; varias de ellas son cultivadas tradicionalmente en Centro y Sudamérica para aprovechar sus semillas o sus hojas como alimento. De las 900 hectáreas sembradas en el país, los estados de Puebla y Tlaxcala ocupan el 51%, seguido de Morelos, Guanajuato, y Estado de México (CONABIO, 2017).

El rastrojo de amaranto puede utilizarse para producir moléculas con aplicaciones biotecnológicas debido a su composición química; de acuerdo a un estudio realizado en el 2019, el amaranto está compuesto de hemicelulosa 37.45 ± 0.59 , lignina 27.73 ± 0.11 , celulosa 33.34 ± 0.65 (Ramírez, 2019), esto podría brindar un valor agregado a este residuo, además de reducir la contaminación ambiental.

Tabla 1. Taxonomía de la planta de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*). (CONABIO, 2017).

Reino: <i>Plantae</i>	Orden: <i>Caryophyllales</i>
Subreino: <i>Tracheobionta</i>	Familia: <i>Amaranthaceae</i>
División: <i>Magnoliophyta</i>	Subfamilia: <i>Amaranthoideae</i>
Clase: <i>Magnoliopsida</i>	Tribu: <i>Amarantheae</i>
Subclase: <i>Caryophyllidae</i>	Género: <i>Amaranthus</i>

2.4 PROCESOS DE TRANSFORMACIÓN DE MATERIALES LIGNOCELULOSICO

El proceso de transformación de los materiales lignocelulósicos consta de tres pasos fundamentales: (1) pretratamiento de la biomasa, (2) hidrólisis de celulosa y hemicelulosa en azúcares fermentables y (3) fermentación de azúcares producidos. Los azúcares se pueden transformar en productos para la alimentación como, acetona, ácido láctico y aminoácidos utilizando técnicas microbianas (Bellido, 2015). El pretratamiento modifica la lignina y mejora el acceso de las enzimas a la celulosa y hemicelulosa, en la sacarificación se fracciona un carbohidrato complejo como el almidón o la celulosa en unidades monoméricas, en este paso se utilizan enzimas del tipo celulasas y ocasionalmente hemicelulasas para liberar los azúcares reductores,

por último en la fermentación con microorganismos de interés que utilizan los azúcares reductores obtenidos en la etapa anterior como fuente de carbono y posterior obtención de sustancias de interés (etanol, ácido láctico, etc.).

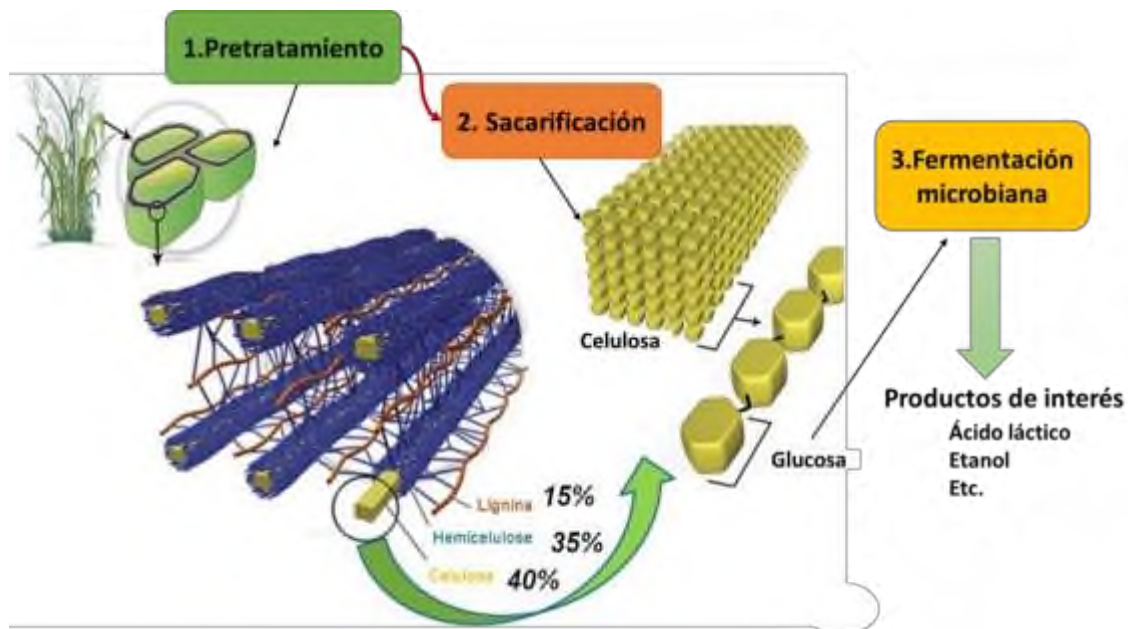


Figura 4. Esquema del proceso de transformación de los materiales lignocelulósicos (Modificada de Taherzadeh y Karimi, 2015a).

2.4.1 Pretratamiento del material lignocelulósico

Los pretratamientos incrementan la tasa de producción, debido a que permiten una mayor liberación de azúcares para la etapa de hidrólisis, a su vez removiendo o degradando la lignina y la hemicelulosa. Las cuales rodean a la celulosa.

Un método de pretratamiento apropiado es esencial para reducir la estructura recalcitrante del material vegetal, proporcionando una mejor accesibilidad de las enzimas a los carbohidratos (Subhedar, *et al.*, 2016).

Un tratamiento previo debe cumplir ciertos requisitos: (a) producción de fibra celulósica reactiva para el ataque enzimático, (b) evitar la destrucción de

hemicelulosa y celulosa (c) evitar la formación de posibles inhibidores para las enzimas hidrolíticas y microorganismos fermentadores, (d) minimizar la demanda de energía, (e) reducir el costo de reducción de tamaño para las materias primas, (f) reducir el costo del material para la construcción de reactores de pretratamiento, (g) producir menos residuos, (h) consumir poco o ningún producto químico y en caso de usarlo que sea un químico económicamente accesible (Tahezadeh y Karimi, 2015b). Existen diversos métodos de pretratamiento, utilizados en la industria (Físicos, químico y biológicos), que generalmente se basan en el uso de álcali, ácidos diluidos, vapor, amoníaco y solventes orgánicos, sin embargo, dependiendo de la biomasa vegetal y los fines de esta, se selecciona el tratamiento más adecuado.

El mecanismo de los pretratamientos es variado, pero su principal función es la de aumentar el área de contacto entre las enzimas celulolíticas y la celulosa, rompiendo la estructura cristalina de la celulosa, despolimerizándola parcialmente y solubilizando la lignina y/o hemicelulosa (Chen, *et al.*, 2015).

2.4.2 Clasificación de los tipos de pretratamiento

Existen diversos métodos de pretratamiento para el material lignocelulósico estos se clasifican de acuerdo a su origen en físicos, químicos, fisicoquímicos y biológicos como se puede apreciar en el Tabla 2.

Tabla 2. Clasificación de los tipos de tratamientos (Chen, *et al.*, 2017).

Clasificación	Fundamento	Ejemplo
Físico	Reduce el tamaño de las partículas, la cristalinidad de la celulosa, y el grado de polimerización.	Molienda
		Irradiación
		Ultrasonido

Químico	Alta liberación de azúcares, degrada la lignina de manera efectiva, amplio rango de temperatura.	Hidrólisis ácida (H ₂ SO ₄)
		Hidrólisis alcalina (NaOH)
Físico-químico	No produce compuestos de inhibición, bajo consumo de energía, degrada la lignina y hemicelulosa, aumenta el área de contacto.	Explosión de vapor (autohidrólisis)
		Explosión de vapor con adición de SO ₂
		Explosión con amoníaco (90-100 °C)
Biológico	Los microorganismos aplicados degradan la lignina y la hemicelulosa, pero muy poca parte de la celulosa, ya que esta última es más resistente.	Hongos blancos y de pudrición blanda (son los microorganismos más eficaces para el tratamiento biológico de la lignocelulosa).

Pretratamiento físico. Se basa en una reducción del tamaño del material por fragmentación, triturado y molido para así reducir la cristalinidad desordenando las cristalitas presentes en la fase amorfa, este proceso facilita la accesibilidad de las enzimas aumentando la conversión de celulosa a azúcares reductores debido a un incremento del área superficial específica, también propicia una disminución del tiempo de digestión y del grado de polimerización lo que permite incrementar los rendimientos de la posterior hidrólisis (Cortínez, 2010).

Explosión a vapor. El proceso de explosión a vapor es un método de pretratamiento físico que consiste en la inyección de vapor a temperaturas elevadas. el material lignocelulosico se somete a este tratamiento por un tiempo determinado provocando de este modo el rompimiento de las fibras que entrelazan la celulosa y la hemicelulosa

en dicho material. El efecto de este método sobre la biomasa es una combinación de alteraciones físicas (desagregación y ruptura de las fibras) y químicas (despolimerización y rotura de enlaces). El efecto físico está causado por los rápidos cambios de presión los cuales provocan una evaporación del agua interna, creando unas fuerzas de cizalladura que producen la separación de las fibras, principalmente de las regiones de baja cristalinidad (celulosa amorfa). El efecto químico se debe al proceso de auto hidrólisis de los restos acetilos de la hemicelulosa produciendo ácido acético, que, a la temperatura del proceso, cataliza la hidrólisis de la hemicelulosa. Durante el tratamiento se destruyen parcialmente los enlaces lignina-carbohidrato. Como resultado, se obtiene un producto fibroso cuya celulosa es más accesible al ataque enzimático. La hemicelulosa se despolimeriza en mayor o menor medida dependiendo de las condiciones del tratamiento. La lignina, prácticamente sin alterar puede ser extraída y utilizada con diferentes fines (Shi, *et al.*, 2019).

Ultrasonido. El efecto que provoca el uso de ultrasonidos en el material vegetal se ve reflejado en la estructura de la pared celular, donde los ciclos de onda de alta y baja presión generados por este método forman burbujas pequeñas o micro burbujas (cavitación) que implotan debido a los cambios bruscos de presión, causando cizallamiento en el material vegetal, es decir, causando ruptura del material fibroso y celulósico (Subhedar, *et al.*, 2016). La aplicación de ultrasonido como pretratamiento, aumenta la tasa de deslignificación al aumentar la transferencia de masa debido a los efectos de transmisión acústica y a los efectos de corte.

Pretratamiento químico. Para estos métodos se utilizan agentes químicos tales como ozono, ácidos, bases, peróxidos y variedad de solventes orgánicos, el pretratamiento básico ha sido uno de los más relevantes debido a que el uso de hidróxidos como el hidróxido de sodio y de potasio permiten la disolución de lignina causando un aumento en el área de superficie de contacto y reduciendo de esta forma el grado de cristalinidad y polimerización de la celulosa (Carranza, 2015).

Hidrólisis alcalina. El tratamiento previo con álcali se refiere a la aplicación de soluciones alcalinas como NaOH, Ca (OH) (cal) o amoníaco para degradar la lignina y una parte de la hemicelulosa, y aumentar la accesibilidad de la enzima a la celulosa

de manera eficiente, dando como resultado una menor descomposición del azúcar, pero el uso excesivo de álcali y tiempos de tratamiento más largos son algunos de los inconvenientes asociados (Araújo *et al.*, 2019).

El hidróxido de sodio (el reactivo más utilizado) incrementa el área interna superficial del material por hinchamiento, causando una disminución en el grado de polimerización y una separación de hemicelulosa y lignina (Qing, *et al.*, 2017).

En comparación con los reactivos ácidos oxidativos, el tratamiento con álcali parece ser el método más eficaz para romper los enlaces éster entre la lignina, la hemicelulosa y la celulosa, y evitar la fragmentación de los polímeros de la hemicelulosa (Subhedar *et al.*, 2016). Sin embargo, el método de pretratamiento alcalino se puede mejorar con el enfoque asistido por ultrasonido.

Pretratamiento biológico. La deslignificación biológica en comparación a las técnicas tradicionales presenta un menor impacto ambiental, mayor rendimiento del producto debido a la selectividad lo que conlleva a una menor producción de reacciones secundarias, que puedan inhibir los procesos posteriores y una menor demanda energética (Cortínez, 2010).

2. 5 APLICACIONES DEL ULTRASONIDO

El ultrasonido tiene diversas aplicaciones, como homogeneizar, desintegrar, desgasificar, limpiar o uso en sonoquímica.

2.5.1 Homogenización. Los procesadores de ultrasonidos se utilizan como homogeneizadores con el objetivo de reducir el tamaño de las partículas dentro de un líquido, mejorando su homogeneidad y estabilidad. Estas partículas (fase dispersa) pueden encontrarse en estado sólido o líquido. La homogeneización mediante ultrasonido resulta muy eficaz para reducir tanto partículas blandas como duras.

2.5.1.1 Dispersión y desaglomeración por ultrasonido. La dispersión y desaglomeración de sólidos en líquidos es una importante aplicación de los dispositivos de ultrasonidos. Las ondas de ultrasonido generan elevadas fuerzas de cizallamiento o esfuerzo cortante que rompen los aglomerados de partículas dispersándolos en partículas individuales; esto se debe a la aplicación de estrés mecánico, lo cual rompe los aglomerados de partículas y, además, el líquido presiona contra las mismas. Cuando se sonicán líquidos, las ondas acústicas que se propagan por el medio líquido generan ciclos alternos de alta presión (compresión) y de baja presión (rarefacción). Esto ejerce un esfuerzo mecánico sobre las fuerzas electrostáticas de atracción (por ejemplo, fuerzas de van der Waals, o tensión superficial). El fenómeno de cavitación ultrasónica, en líquidos produce chorros a altas velocidades de hasta 1000 km/h, estos chorros inyectan líquido a alta presión entre las partículas, separándolas entre sí. Las más pequeñas son aceleradas por los chorros de líquido y chocan a altas velocidades con otras partículas. Esto hace del ultrasonido un medio eficaz para la dispersión y desaglomeración.

2.5.2 Ruptura celular por ultrasonido. Los ultrasonidos pueden fraccionar tejidos de celulosa y romper las paredes de la estructura celular, liberando así mayor cantidad de sustancias intracelulares, como almidón o azúcares. Además, las paredes celulares se fragmentan en pequeñas partículas fáciles de separar por sedimentación. Estos efectos pueden utilizarse en procesos de fermentación, digestión y otros procesos de conversión de materia orgánica. Después de romper las estructuras celulares, el ultrasonido permite aprovechar más eficientemente el material intracelular, puesto que, por ejemplo, celulosa y los restos de la pared celular están más disponibles para la acción de las enzimas hidrolíticas. El uso del ultrasonido aumenta la superficie de interacción para las enzimas durante los procesos de licuefacción o sacarificación, lo que, a su vez, incrementa la velocidad y el rendimiento.

2.5.3 Efecto del ultrasonido sobre el tratamiento alcalino

Los enfoques asistidos por ultrasonido reducen el tiempo de tratamiento y también reducen el requerimiento químico / enzimático (Rucha *et al.*,2019).

Se ha demostrado que el tratamiento alcalino asistido por ultrasonido aumenta la efectividad del tratamiento en comparación con el enfoque convencional, generalmente reduce el tiempo de procesamiento y disminuye el requerimiento de álcali (Torres, *et al.*, 2016) La aplicación de ultrasonido aumenta la tasa de deslignificación al incrementar la transferencia de masa debido a los efectos de transmisión acústica y a los cambios morfológicos favorables por la turbulencia intensa y los efectos de corte (Zumar y Romeela, 2017). Estos efectos se atribuyen a la cavitación transitoria obtenida a medida que las ondas ultrasónicas se propagan a través del medio líquido y provocan un colapso intenso de las cavidades generadas. La cavitación también promueve la descomposición de las moléculas de agua en radicales libres que ayudan a la escisión de las redes de lignina y xilano. Los efectos físicos y químicos de la cavitación desempeñan un papel decisivo en la determinación del grado de deslignificación. El efecto físico de ondas de choque da como resultado la degradación de la matriz de lignina y mejora la accesibilidad, mientras que los efectos químicos (formación de radical hidroxilo) conducen las diferentes reacciones que implican hidroxilación/oxidación y la eliminación de la cadena latera (Sasmal, *et al.*, 2012). Por lo tanto, la irradiación ultrasónica proporciona una deslignificación efectiva e intensificada (mayor grado de deslignificación y menor tiempo de tratamiento) en condiciones de temperatura ambiente con menor requerimiento de NaOH. Se ha demostrado que el tratamiento alcalino asistido por ultrasonido aumenta la efectividad del tratamiento en comparación con el enfoque convencional (Rucha, *et al.*, 2019). Se informó que la velocidad de liberación de azúcares reductores aumenta al incrementar la temperatura y la concentración de álcali, y al reducir el tamaño de partícula. El pretratamiento alcalino asistido por ultrasonido dio como resultado una deslignificación cercana al 99.6% y dio una mayor producción de azúcar reductora que el pretratamiento alcalino solo (Tahezadeh y Karimi, 2015a).

El efecto físico de ondas de choque da como resultado la degradación de la matriz de lignina y mejora la accesibilidad, mientras que los efectos químicos (formación de radicales hidroxilos) conducen las diferentes reacciones que implican hidroxilación/oxidación y la eliminación de la cadena lateral. En general, el enfoque asistido por ultrasonido se considera una técnica ecológica novedosa y respetuosa con el medio ambiente, que proporciona un grado significativo de intensificación.

2.5.4 Reacciones secundarias ocurridas durante la degradación de material lignocelulósico.

Algunos tipos de pretratamientos generan de manera indirecta algunos subproductos, de los cuales algunos son tóxicos para los microorganismos, (Carranza, 2015). Debido a esto se han realizado diversas investigaciones en el tema, las cuales se han centrado en resolver el problema de los inhibidores, por ejemplo, convirtiendo los materiales tóxicos en otros compuestos menos tóxicos para los microorganismos o aumentando la tolerancia de estos últimos. En la figura 5, se presentan algunas de las reacciones ocurridas durante la hidrólisis de materiales lignocelulósicos.

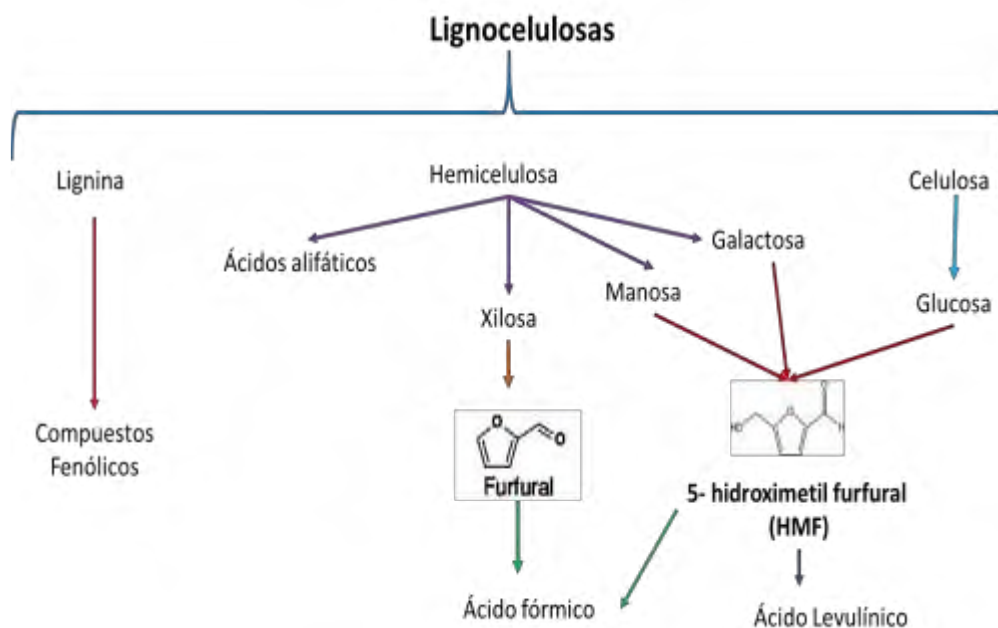


Figura 5. Reacciones secundarias ocurridas durante la degradación de material lignocelulósico (Modificada de Carranza, 2015).

La celulosa, hemicelulosa y lignina pueden romper sus enlaces para formar glucosa, xilosa, manosa, galactosa y compuestos fenólicos respectivamente (Figura 5). De los azúcares producidos, algunos de ellos se pueden descomponer durante el proceso y formar compuestos como 5-hidroxi metil furfural (HMF) a partir de las hexosas, y furfural desde las pentosas, a su vez, HMF y furfural pueden también descomponerse en ácido levulínico y ácido fórmico. Otro compuesto liberado es el ácido acético, el cual se forma a partir de los grupos acetilo contenidos en la hemicelulosa; a su vez la lignina al ser descompuesta puede liberar compuestos fenólicos (Carranza, 2015).

2.6 Hidrólisis enzimática

Después del proceso de pretratamiento, se tiene que llevar a cabo una hidrólisis para liberar los azúcares monoméricos fermentables del material vegetal; la hidrólisis enzimática tiene como propósito la degradación de la celulosa; rompe las cadenas químicas de lignina, celulosa y hemicelulosa, lo que produce oligómeros más solubles

(Luo, *et al.*, 2018); es decir, se produce la liberación de azúcares simples que provienen del material lignocelulósico degradado por enzimas específicas. La hidrólisis enzimática es más eficiente en comparación con otros métodos como el químico (hidrólisis ácida); ya que requiere menores costos de utilidad, además de ser una alternativa limpia y amigable con el ambiente debido a que genera una mínima cantidad de compuestos tóxicos, esta se lleva a cabo con valores de pH cercanos a la neutralidad y no requiere temperaturas elevadas, pero si requiere un mayor tiempo de procesamiento (Ponce, 2015).

Las enzimas capaces de hidrolizar tanto celulosa como hemicelulosa se engloban en celulasas y xilanasas, respectivamente. En el caso de las celulasas, existen tres tipos principales que actúan de forma conjunta para la liberación de azúcares fermentables:

- i) **Endoglucanasas (EGs) o Endo β -glucanasas.** Actúan hidrolizando las regiones amorfas de la celulosa generando oligosacáridos, causando acortamientos de las cadenas de celulosa, rompen los enlaces β -glucosídicos en forma aleatoria en el interior de las moléculas de celulosa.
- ii) **Exoglucanasas ó celobiohidrolasas (CBHs).** Atacan gradualmente las moléculas de celulosa de los extremos no reductores liberando subunidades de celobiosa.
- iii) **β -glucosidasas (BG) ó celobiosas.** Se encargan de hidrolizar una molécula de celobiosa para liberar dos moléculas de glucosa y de este modo evita que la celobiosa actúe de forma inhibitoria sobre los otros dos tipo de celulasas (figura 6) (Bellido, 2015).

Este tipo de hidrólisis (hidrólisis enzimática) requiere menores costos de utilidad y puede realizarse a temperaturas de reacción más bajas, pero requiere un mayor tiempo de procesamiento, aunque el material pretratado puede hidrolizarse mediante técnicas químicas, el enfoque de hidrólisis enzimática es más eficiente en comparación con los métodos químicos alternativos como la hidrólisis ácida. La razón principal es que la hidrólisis enzimática se realiza en condiciones de presión y temperatura moderadas, proporciona un mayor rendimiento del producto en función de la actividad específica hacia los productos deseados e implica un requerimiento

de energía menor (Vega *et al.*,2018). Sin embargo, un inconveniente son los largos tiempos de tratamiento.

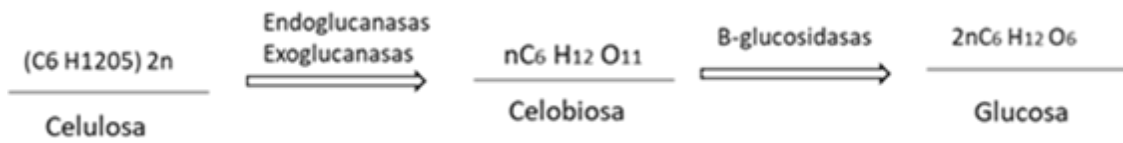


Figura 6. Ecuación de la transformación de celulosa a unidades monoméricas de glucosa (Modifica de Bellido, 2015).

2.6.1 Enzimas comerciales para hidrólisis de celulosas y hemicelulosas

Las enzimas comerciales son preparados celulíticos ó hemicelulíticos obtenidos a partir de microorganismos (M.O) como hongos y bacterias, aeróbicos o anaeróbicos, mesófilos o termófilos (Tabla 3).

En la actualidad existen numerosos preparados enzimáticos comerciales grado alimenticio que contienen principalmente actividad celulolítica (endo- β -1,4-glucanasa, exo- β -1,4-glucanasa, β 1,4-glucosidasa). Algunos de estos preparados enzimáticos son: Crystalzyme PML-MX de Valley Research Inc., Biocellulase A de Quest Intl., Celluclast 1.5 L de Novo Nordisk, Econase Ce-S de Enzyme Development Co., Cellulase AP30K de Amano Enzyme, Stonenzyme Plus, Zymafilt L-300 y Macerex de Enmex S.A. de C.V., Novozym 342 de Novo Industries, Cellubrix L de Novo Nordisk y Cellulase de Bio-Cat Inc. Todos son solubles en agua y su presentación es en estado líquido, excepto el preparado Cellulase que es en polvo. Así también, Crystalzyme PML-MX, Macerex y Cellulase son preparados enzimáticos con actividad mixta porque además de actividad celulasa contienen actividad pectinasa y hemicelulasa (Waliszewski y Osvando-Chacón, 2005).

Tabla 3. Microorganismos productores de enzimas comerciales (Modenbach y Nokes, 2014)

Tipo de M.O	Características	Nombre del M.O
Bacteria	Aeróbicas mesofílicas y termofílicas	<i>Cellulomonas sp.</i> , <i>Cellvibrio sp.</i> , <i>Microbispora bispora</i> y <i>Thermomonospora sp.</i>
	Anaeróbicas mesofílicas y termofílicas	<i>Acetivibrio cellulolyticus</i> , <i>Bacteroides succinogenes</i> , <i>Ruminococcus albus</i> , <i>Ruminococcus flavefaciens</i> y <i>Clostridium thermocellum</i>
Hongo	Aeróbicos	<i>Trichoderma viride</i> , <i>Trichoderma reesei</i> , <i>Penicillium pinophilum</i> , <i>Sporotrichum pulverulentum</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Talaromyces emersonii</i> y <i>Trichoderma koningi</i>
	Aeróbicos Termofílicos	<i>Sporotrichum thermophile</i> , <i>Thermoascus aurantiacus</i> y <i>Humicola insolens</i>
	Anaeróbicos mesofílicos	<i>Neocallimastix frontalis</i> , <i>Piromonas communis</i> , <i>Sphaeromonas communis</i>

2.6.2 Hidrólisis enzimática asistida por ultrasonido

El uso del ultrasonido puede considerarse como una fuente auxiliar de energía (agitación y/o calentamiento) en reacciones enzimáticas, mediante la formación de microburbujas durante los tratamientos de debido al fenómeno de cavitación. Este fenómeno de cavitación implica un aumento localizado de temperatura y presión en la interfaz sólido-disolvente, que puede ser excelente para la intensificación de las reacciones enzimáticas (tiempos de reacción más bajos, temperaturas más baja y

cantidad más bajos), debido a la eliminación de las resistencias de transferencia de masa basadas en la turbulencia y la transmisión acústica generada por cavitación inducida por ultrasonido, dando como resultado una mayor tasa de reducción de la producción de azúcares con una reducción significativa del tiempo de reacción (Rucha *et al.*,2019). En general la cavitación modifica la estructura de la enzima, lo que conduce a un mayor contacto de la superficie entre los complejos enzimáticos del sustrato junto con mayores tasas de transferencia de masa para los sustratos hacia las enzimas (Subhedar y Gogate, 2016).

2.6.3 Factores clave en la hidrólisis enzimática

El tipo de pretratamiento utilizado es el factor clave en la hidrólisis enzimática, ya que como ha sido mencionado, es el paso donde ocurren las modificaciones estructurales necesarias para dejar accesible el paso al ataque enzimático. Por otro lado, se debe hacer mención de los factores que afectan la hidrólisis enzimática de celulosa, dentro de los cuales se incluyen el sustrato, la actividad enzimática, y las condiciones de reacción (temperatura, pH, entre otros parámetros).

- a) Sustrato: La concentración de sustrato es uno de los principales factores que afectan el rendimiento y la velocidad inicial de hidrólisis de celulosa. Un incremento en la concentración de sustrato incrementa el rendimiento y la velocidad de hidrólisis. Sin embargo, una alta concentración de sustrato puede causar inhibición por sustrato, la cual disminuye sustancialmente el rendimiento y la velocidad de hidrólisis. Esto va a depender de las características estructurales del material vegetal, tales como la cristalinidad, el grado de polimerización de la celulosa, el área superficial y el contenido de lignina. Como se mencionó anteriormente la accesibilidad de las enzimas al sustrato es uno de los factores que tienen más efecto en la hidrólisis. Por lo tanto, se debe elegir un pretratamiento que aumente el área superficial y que deje expuesta la celulosa al ataque enzimático (Gutierrez-Rojas, *et al.*, 2014).
- b) Celulosa: es importante tener en cuenta que el incrementando de la dosis de enzima hasta cierto punto, pueden incrementar el rendimiento y la velocidad de

hidrólisis, sin embargo, esto significaría un aumento en el costo del proceso. La actividad enzimática disminuye durante la hidrólisis debido a la adsorción irreversible de la celulasa en la celulosa (Gutierrez-Rojas, *et al.*, 2014).

2.6.4 Carga de sólidos en la hidrólisis enzimática.

La alta carga de sólidos es un desafío para la hidrólisis enzimática debido a la falta de agua disponible en el reactor. El agua es esencial para una hidrólisis efectiva por dos razones: transferencia de masa y lubricidad, aumenta la efectividad de la enzima y de las reacciones químicas. Por otro lado, el agua también reduce la viscosidad de la suspensión al aumentar la lubricidad de las partículas, lo que disminuye el cizallamiento requerido (tensión necesaria para producir una velocidad de corte dada, lo que permite una menor potencia para mezclar). A medida que las cargas de sólidos se acercan al 20% (p/p), el líquido se absorbe completamente en la biomasa dejando poca cantidad de agua libre, aumentando la viscosidad de la mezcla y, en consecuencia, la mezcla y el manejo del material se vuelve más difícil. (Yan y Yajun, 2018).

III. JUSTIFICACIÓN

Actualmente los residuos agroindustriales no tienen una disposición final adecuada, la gran mayoría terminan siendo quemados, provocando una liberación de CO₂, uno de los principales gases de efecto invernadero, por lo tanto, las investigaciones actuales se han enfocado en la búsqueda de alternativas para la disposición de estos residuos, a través de su utilización en la producción de sustancias de valor industrial (Vargas y Pérez,2018). Para esto se debe llevar a cabo una serie de procesos de acondicionamiento; empezando por la adecuación de un pretratamiento que degrade eficazmente la lignocelulosa del material vegetal; sin embargo, a pesar de que se han estudiado diversos métodos de pretratamiento para diferentes materiales lignocelulósicos, no hay un método estandarizado para el proceso de deslignificación, ya que el pretratamiento se realiza de acuerdo a la composición química de la biomasa vegetal y el uso final de los productos resultantes (Subhedar, *et al.*, 2018).

Por lo tanto, en esta investigación se exploraron diversos métodos de pretratamiento para la deslignificación del rastrojo de amaranto, comprobando la eficacia del método seleccionado en el proceso de sacarificación.

IV. HIPÓTESIS

La selección del método de pretratamiento del rastrojo de amaranto permitirá un mayor rendimiento de azúcares reductores.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Producir azúcares reductores a partir del rastrojo de amaranto mediante diferentes pretratamientos físicos y químicos.

5.2 Objetivos específicos

1. Determinar la composición química proximal del rastrojo de amaranto.
2. Comparar distintos métodos de pretratamiento para la deslignificación del rastrojo de amaranto, utilizando la técnica de espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR).
3. Determinar la concentración de azúcares reductores para deducir el método que produce mejores resultados en cuanto a concentración de azúcares.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MATERIALES

6.1.1 Rastrojo de amaranto. Se recolectó en parcelas ubicadas en el municipio de Santa Apolonia Teacalco (19°13'48.7N°98°18'12.8"W) en el estado de Tlaxcala, México, noviembre 2018. Las hojas y tallo de la planta se colectaron después del proceso del trillado en costales y se pusieron a secar al sol. Posteriormente el material se molió en un molino agrícola No. 20 (Swissmex turbo), el rastrojo molido se depositó en bolsas de plástico. Se tamizó con una malla del No. 40 para obtener una homogenización en el tamaño de partícula.

6.1.2 Enzima. Se utilizó la enzima celulasa de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). La celulasa de *Aspergillus niger* cataliza la hidrólisis de los enlaces endo-1,4-β-D-glucosídicos en celulosa. Una unidad libera 1.0 μmol de glucosa de la celulosa en una hora a pH 5.0 a 37 °C.

6.2 MÉTODOS

6.2.1 Análisis químico proximal

La composición química de la harina de rastrojo de amaranto, se realizó de acuerdo a la metodología de la NORMA OFICIAL MEXICANA:

Humedad (NOM-116-SSA1-1994). Se realizó por el método de gasa o arena, por pérdida de peso al calentar una muestra de harina a 110°C en una estufa durante 4 h a presión atmosférica.

Cenizas (NMX-F-607-NORMEX-2013). Se obtuvo por calcinación lenta, incrementando la temperatura hasta 550°C, donde se mantuvo por 6 horas.

Proteínas (NOM-155-SCFI-2012). Se basó en el método Kjeldahl para la cuantificación del nitrógeno total presente en la muestra, utilizando el coeficiente 6.25 como factor de conversión a proteínas.

Extracto etéreo (NOM-086-SSA1-1994). Se cuantificó después de una extracción de la muestra durante 4 h con éter de petróleo en un sistema Soxhlet.

Carbohidratos totales se determinaron por cálculo indirecto, mediante la diferencia de, %H = porcentaje de humedad de la muestra; %G = porcentaje de grasa; %C = porcentaje de ceniza; y % P = porcentaje de proteína.

6.2.2 Métodos empleados para el pretratamiento de deslignificación del rastrojo de amaranto

6.2.2.1 Métodos físicos

I. Vapor (presión y temperatura)

El tratamiento se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 200 mL, los cuales contenían 100 ml de agua destilada y 10 g de rastrojo de amaranto, obteniendo una suspensión en una relación 1:10 p/v (rastrojo de amaranto/agua destilada), posteriormente se depositó en una autoclave a una temperatura de 120 °C y una presión de 15 PSI, por un tiempo total de 5 horas, tomando una muestra de 2 mL cada hora durante 5 horas, las muestras obtenidas se centrifugaron a 10 000 rpm, por 10 min, a 25°C (Subhedar, 2016), para la obtención del sobrenadante el cual se utilizó para la determinación de la concentración de azúcares reductores (DNS) (Miller, 1959).

II. Ultrasonido (rastrojo + agua)

El pretratamiento se realizó utilizando agua destilada para una suspensión 1:10 p/v (rastrojo de amaranto/agua destilada). El procesador ultrasónico (*Cole Parmer modelo CPX 750*, USA) utilizado en el estudio tiene una frecuencia de 20 kHz y una

disipación de potencia nominal de 750 W. El diámetro de la punta de la bocina ultrasónica fue de 1 cm y el material de la punta de la bocina fue de titanio. La bocina se introdujo a aproximadamente 2 cm de profundidad en la mezcla de reacción (la profundidad de 2 cm se ha seleccionado en función de la distancia óptima para minimizar las zonas muertas en la sección sobre la punta de la bocina y maximizar las interacciones entre las ondas (Subhedar *et al.*, 2018). El tiempo empleado fue de 60 minutos a una potencia constante de 100 W y temperatura de 50 °C (Tabla 4), la cual se controló con baño maría y se monitoreó a intervalos regulares con ayuda de un termómetro convencional.

En este tratamiento se evaluaron las variables ciclo de trabajo y amplitud; el efecto del ciclo de trabajo se estudió en los rangos de 50, 70 y 90%, el ciclo de trabajo se refiere a los intervalos de exposición y paro (ON/OFF) del sonicador expresados en segundos (por ejemplo, un ciclo del 50%, hace referencia a 25 s de encendido y 25 s de apagado), y la amplitud en los porcentajes del 75 y 50% (tabla 4). Se tomaron muestras de 2 mL a intervalos regulares de 10 min, durante los 60 minutos que duró el pretratamiento, las muestras obtenidas se centrifugaron a 10 000 rpm, durante 10 min, a 25°C, al sobrenadante obtenido se realizó la determinación de azúcares reductores por el método de Miller (DNS) (Miller, 1959).

Tabla 4. Parámetros utilizados para el tratamiento de ultrasonido

Parámetro	valor
Potencia	100 W
Temperatura	50 °C
Sustrato	1:10 p/v

6.2.2.2 Métodos químicos

III. Hidrólisis alcalina

El tratamiento se realizó en matraces Erlenmeyer de 200 mL, utilizando 100 mL de hidróxido de sodio (NaOH) 3.5 N. obteniendo una suspensión 1:10 p/v (rastroy de amaranto/solución alcalina), la cual se puso en agitación a una velocidad de 1 050 rpm, se tomaron muestras de 2 mL, a intervalos de tiempo de una hora durante 5 horas continuas (Torres, *et al.*, 2016) Las muestras se centrifugaron a 10 000 rpm a 25°C durante 10 min, este método se realizó de acuerdo a lo reportado por Subhedar, *et al.*, (2016) . El sobrenadante se utilizó para la determinación de azúcares reductores (Miller, 1959).

6.2.2.3 Métodos combinados

IV. Pretratamiento alcalino + vapor

Se elaboró una suspensión en una relación 1:10 p/v (rastroy de amaranto/solución alcalina), la cual se molió mecánicamente por 5 minutos, posteriormente se depositó en una autoclave a una temperatura de 120 °C y 15 PSI de presión, tomando una muestra de 2 mL cada hora, durante las 5 horas del tratamiento; las muestras obtenidas se centrifugaron a 10 000 rpm a 25°C durante 10 min, para recuperar el sobrenadante el cual se utilizó para la determinación de la concentración de azúcares reductores (Miller, 1959); cabe mencionar que este método se realizó de acuerdo a Subhedar (2016).

V. Pretratamiento alcalino + ultrasonido

En este tratamiento se estudió el efecto de la concentración de álcali (2 N, 2.5 N, 3 N, 3.5 N), sobre la obtención de azúcares reductores, utilizando un procesador ultrasónico (Cole Parmer modelo CPX 750 USA) con una frecuencia de 20 kHz y una disipación de potencia nominal de 750 W. El diámetro de la punta del sonotrodo fue de 1 cm. Las condiciones de operación utilizadas se muestran en la tabla 4.

Para el análisis del tratamiento se extrajeron muestras de 2 mL a intervalos regulares (cada 10 min durante 60 minutos). Todas las muestras se centrifugaron a 10 000 rpm

durante 10 min a 25 °C; el sobrenadante se usó para determinar la concentración de azúcares reductores y el precipitado para el análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

6.3 Determinación de azúcares reductores.

Se determinaron utilizando el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). Se siguió un protocolo estándar de DNS para determinar el contenido de glucosa.

6.4 Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR)

Se utilizó un equipo de espectroscopia infrarroja (Dynascan modelo Spectrum 100. Perkin Elmer, USA), el cual utilizó el software IR solution empleandose la metodología de transformada de Fourier (FT-IR), que ofrece la relación señal/ruido para convertir las vibraciones en espectros. El análisis se realizó tomando 2 mg del precipitado de cada muestra. Los espectros fueron obtenidos a una resolución de 4 cm⁻¹, en un rango de 4000-550 cm⁻¹ (Seyed y Fan, 2013).

6.5 Sacarificación del rastrojo de amaranto pretratado

6.5.1 Hidrólisis enzimática convencional

Después de la etapa de pretratamiento para la deslignificación, las muestras obtenidas se sometieron a un proceso de hidrólisis enzimática, utilizando la enzima comercial celulasa de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich. USA) a un pH de 5.0, para la producción de azúcares reductores.

El tratamiento se realizó en un matraz Erlenmeyer (100 ml) con agitación a una velocidad de 300 rpm, se utilizó una carga de muestra del rastrojo pretratado al 5% (p/v) y una carga enzimática de 0.5% (p/v) para la hidrólisis convencional. La temperatura de la mezcla de reacción se ajustó a 50 °C usando un baño de temperatura controlada. La reacción se mantuvo durante 8 h tomando muestras cada hora durante 8 horas (tiempo en el cual se mantuvo constante la cantidad de azúcares

liberados). Todas las muestras retiradas se centrifugaron a 10 000 rpm durante 10 minutos para la separación de sólidos (Rucha, *et al.*, 2019). El sobrenadante obtenido se analizó para la concentración de azúcares reductores por el método del ácido dinitrosalicílico (Miller, 1959).

6.5.3 Hidrólisis enzimática asistida por ultrasonido

Para estudiar el efecto de ultrasonido sobre la hidrólisis enzimática del rastrojo de amaranto pretratado se utilizó un dispositivo ultrasónico (*Cole Parmer* modelo CPX 750. USA) con una frecuencia de 20 kHz y una disipación de potencia nominal de 750 W. El diámetro de la punta de la bocina ultrasónica fue de 1 cm y el material de la punta de la bocina fue de titanio. Las condiciones de la sonicación se seleccionaron de acuerdo a los resultados presentados por Rucha *et al.*, (2019) y por Subhedar *et al.* (2018); potencia 50 W, temperatura 50°C, ciclo de trabajo del 50%, amplitud del 75%. La carga del sustrato fue del 5% p/v y la carga enzimática fue del 0.2% p/v. Para el análisis del progreso de la reacción, se tomaron muestras cada 15 min, durante 120 min. Todas las muestras retiradas se centrifugarán a 10 000 rpm durante 10 min, a 25°C. El sobrenadante obtenido se utilizó para la determinación de azúcares reductores (Miller, 1959).

6.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software Minitab 18. Se realizó un análisis de varianza para cada tratamiento, se utilizó ANOVA de una vía, para los tratamientos con una variable; (I. Vapor, III. Hidrólisis alcalina, IV. Pretratamiento alcalino + vapor, V. pretratamiento alcalino + ultrasonido) y factorial 2³, para el tratamiento II. Ultrasonido (donde se probaron 2 factores (amplitud (75 y 50%) y ciclos de trabajo (50,70,90%)), se utilizó la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 0.5%, para probar la diferencia de medias.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1 Análisis de la composición química proximal del rastrojo de amaranto

En la Tabla 5, se muestra la composición química de la harina de rastrojo de amaranto de la especie *Amaranthus hypochondriacus*.

Tabla 5. Análisis químico proximal de la harina de forraje de amaranto (tallos y hojas) obtenida después de la cosecha del grano.

Humedad	Cenizas	Grasas	Proteína	Carbohidratos
%	%	%	%	totales %
9.6 ± 0.05	5.9 ± 0.00	0.3 ± 0.02	9.6 ± 0.09	74.6 ± 0.6

La composición proximal de la harina de rastrojo de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) mostró valores similares a los reportados por Méndez-Arango, et al., (2019), quienes mostraron porcentajes de 10-11% de proteína, 69-72% de carbohidratos, 0.7 -1 % de lípidos y 12 % de cenizas cuando utilizaron tallo y hoja de la planta. Sin embargo, algunos porcentajes difieren con lo encontrado en este estudio, esto se puede acreditar a la presencia de microorganismos en las muestras tomadas, ya que esto provocaría un incremento en la composición de las muestras, por ejemplo, aumentaría el contenido de minerales y proteínas. Por otro lado, Gómez-Gómez (2014), utilizaron la misma especie de planta, pero cultivada en Loma Bonita, Oaxaca, México en los meses de febrero a mayo (temperatura promedio de 28 °C y 66 % de humedad), obteniendo 24.75 % de proteína, 4.24 % de extracto etéreo y 15.33 % de cenizas; todos estos valores son mayores a los obtenidos en este estudio; pero menores en carbohidratos totales (45.69 %), cabe mencionar, que en el porcentaje de carbohidratos totales, se incluye la fibra dietética soluble e insoluble,

dentro de la cual se clasifica las lignocelulosas, hemicelulosas y celulosas. Por su parte García- Pereyra, *et al.*, (2009) reportaron porcentajes de 12-15% de proteína, 63-71 % de carbohidratos, 1-5 % de lípidos y 18-23 % de cenizas y 5 -10% humedad, cuando utilizaron tallo y hoja de la planta de amaranto de diferentes especies.

Se considera que la variación en los porcentajes de la composición química del rastrojo de amaranto en los estudios mencionados puede deberse a diversos factores como la especie de la planta, las condiciones ambientales y fisiográficas de las localidades donde se siembren los cultivos (García, *et al.*, 2009).

7.2 Obtención de azúcares reductores utilizando diferentes métodos de pretratamiento

Un criterio importante para medir la efectividad de los pretratamientos es la determinación del contenido de azúcares reductores, el cual se puede tomar como un indicador parcial de la degradación de la lignocelulosa.

7.2.1 Vapor (presión y temperatura)

En la figura 8 se muestran los resultados obtenidos en el pretratamiento con vapor donde se obtuvo una concentración de 6.3 mg/mL de azúcares reductores en 5 horas de tratamiento, donde se observó que no existen diferencias significativas entre las 4 y 5 horas, por tal motivo no se consideró prolongar el tiempo del tratamiento, fijándolo en 5 horas de exposición al vapor, como se puede apreciar en la gráfica, los tratamientos de 1 y 2 h presentan diferencias significativas respecto a los demás.

La presión y la temperatura son los factores claves de este tratamiento (103 KPa, 121°C), ya que, de acuerdo a la literatura, este método tiene se define por provocar una auto hidrólisis ácida, esto debido a la liberación de restos acetilos de las hemicelulosas, los cuales, producirán ácido acético, que, debido a las temperaturas del proceso, catalizarán la hidrólisis de la hemicelulosa. Como resultado, se obtiene

un producto cuya celulosa es más accesible a la hidrólisis enzimática (Negro, *et al.*, 2011).

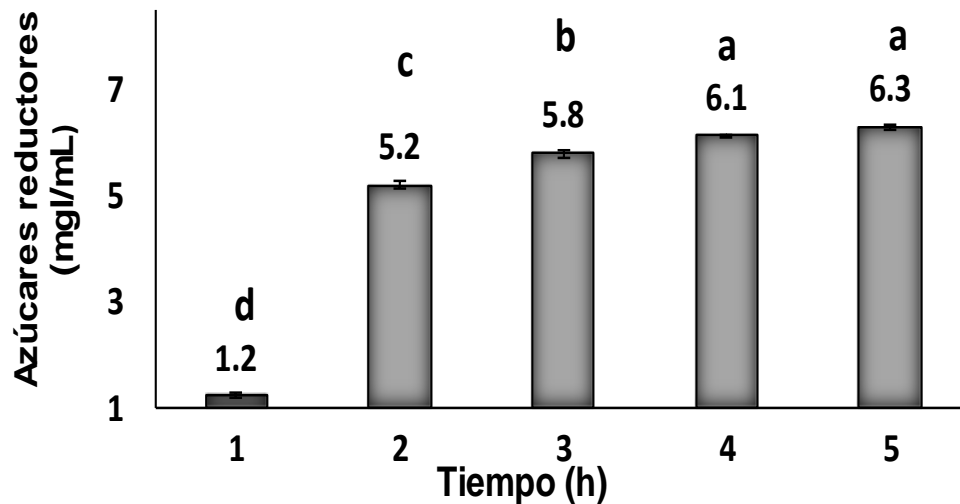


Figura 8. Concentración de azúcares reductores obtenidos en el tratamiento con vapor. Las medias que no comparten letra son significativamente diferentes.

Existen diversos estudios donde utilizan la presión del vapor como método de pretratamiento, ya que es uno de los métodos industriales más utilizados para el ablandamiento de maderas, y otros materiales.

Shi, *et al.*, (2019), utilizaron mazorcas de maíz como sustrato para la obtención de azúcares fermentables, utilizando presiones y temperaturas más elevadas (165°C, 188 MPa), que las utilizadas en este estudio, obteniendo como resultado 3 mg/mL de azúcares reductores en 25 min de tratamiento. De modo similar; Luisi, *et al.*, (2015), ocuparon una variedad de pasto elefante (*Pennisetum purpureum Schum*) como sustrato para la obtención de azúcares fermentables, probaron una temperatura de 190°C, con un tiempo de exposición de 35 min, obteniendo 0.11 mg/mL de azúcares bajo estas condiciones. En un estudio con bagazo de sorgo (Negro, *et al.*, 2011), se probaron tres temperaturas (190, 210 y 230 °C) y dos tiempos para cada una de ellas,

encontrando el tratamiento a 210 °C durante dos minutos como el ideal para este sustrato ya que el rendimiento de celulosa fue 41 % más alto respecto a los otros tratamientos.

Por otra parte; la temperatura y presión utilizada en este estudio fueron menores a las presentadas en las investigaciones mencionadas, por lo que el tiempo de exposición fue mayor, de ahí que se hayan obtenido resultados similares e inclusive mayores a los presentados por otros autores. Cabe mencionar que las condiciones del pretratamiento van a variar dependiendo el material vegetal utilizado.

7.2.2 Pretratamiento con ultrasonido

En el pretratamiento con ultrasonido, se estudió el efecto del ciclo de trabajo y amplitud de onda sobre la obtención de azúcares reductores, los resultados se pueden observar en la figura 9, donde se muestran los tratamientos con las combinaciones de ciclo de trabajo y amplitud, obtenidos en una hora de tratamiento.

La mayor concentración de azúcares reductores se obtuvo con la combinación II-A (ciclo de trabajo del 50% (ON 25 s, Off 25 s) y amplitud de onda del 75%); sin embargo, no existen diferencias significativas con los resultados obtenidos en la combinación II-B (70% ciclo de trabajo y 75% amplitud) y II-C (90% ciclo de trabajo, 75% amplitud), pero sí con II-D (50% ciclo de trabajo, 50% amplitud), los tratamientos II-E y II-F son significativamente similares al tratamiento II-C. Por otro lado, se encontraron diferencias significativas entre los dos porcentajes de amplitud probados (75% y 50%).

El efecto que provoca el uso de ultrasonidos en el material vegetal se ve reflejado en la estructura de la pared celular, donde los ciclos de onda de alta y baja presión generados forman burbujas pequeñas o micro burbujas (cavitación) que implosionan debido a los cambios bruscos de presión, causando cizallamiento en el material vegetal, es decir, causando una ruptura del material fibroso y celulósico (Subhedar, *et al.*, 2016).

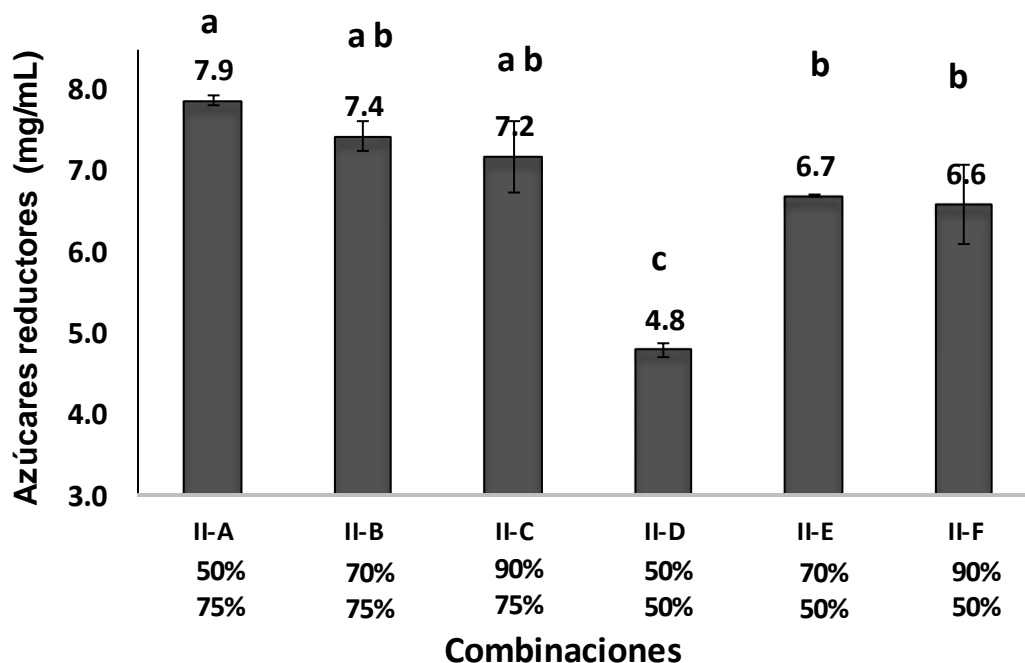


Figura 9. Efecto de los parámetros, ciclo de trabajo y amplitud de sonicación, sobre la obtención de azúcares reductores en el tratamiento de ultrasonido. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Los porcentajes de ciclo de trabajo empleados (50%, 70% y 90%) se determinaron de acuerdo a lo reportado por Rucha, *et al.*, (2019) y Subhedar, *et al.*, (2018). Como se menciona anteriormente el efecto del ciclo de trabajo del 50% (II-A) en combinación con la amplitud del 75% fue el adecuado para el proceso de pretratamiento del rastrojo de amaranto, los resultados obtenidos respecto al porcentaje del ciclo de trabajo (50%) difieren de lo presentado por Rucha, *et al.*, (2019), quienes investigaron el efecto del ciclo de trabajo sobre la sonicación del aserrín para la obtención de azúcares reductores, encontrando el ciclo de trabajo del 70% como el adecuado para este material vegetal, sin embargo, para el rastrojo de amaranto el ciclo de trabajo del 70% no se considera el adecuado ya que dio un resultado menor (7.4 mg/mL), en comparación con el ciclo del 50%, aunque estadísticamente no presentan diferencias significativas, por otro lado, Subhedar, *et al.* (2018), investigaron la obtención de azúcares fermentables de cáscara de nuez,

coco, y pistacho, utilizando el mismo ciclo de trabajo (70%) reportado por Rucha, *et al.*(2019), obteniendo resultados variados dependiendo del material vegetal utilizado (Subhedar, *et al.*, 2018); sin embargo, Nagula y Pandit (2015), estudiaron diversas técnicas de deslignificación incluyendo el uso del ultrasonido sobre el tratamiento alcalino del césped Napier, encontraron que el ciclo de trabajo del 50% es el mejor para este material, concordando con lo encontrado en este trabajo; por lo tanto, se considera que el tipo de material vegetal influye en la selección de parámetros del proceso, Velázquez *et al.*, (2015), mencionan que mientras más grande es la partícula mayor será la energía y el tiempo necesario para que las ondas penetren. Se debe mencionar, que el ciclo de trabajo es uno de los factores determinantes para el proceso de sonicación. Es importante tener en cuenta que el uso de un ciclo de trabajo demasiado alto causará problemas, como el aumento de la temperatura de reacción y la disipación de energía, así como la erosión de los transductores y formación de espuma, por lo tanto, debe evitarse (Rucha, *et al.*, 2019).

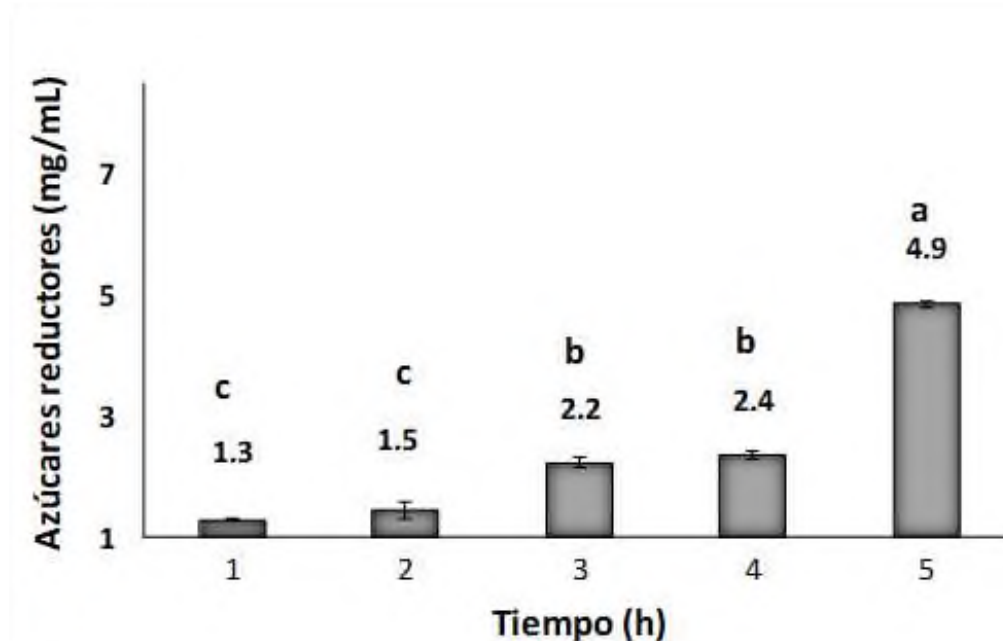
7.2.3 Pretratamiento alcalino

En la figura 10 se muestran los resultados obtenidos en el pretratamiento con hidróxido de sodio (3.5 N) en un tiempo total de 5 horas de tratamiento. Se observa que no existen diferencias significativas entre los tiempos de 1 y 2 h y entre los tiempos de 3 y 4 h, sin embargo, en el tiempo de 5 h, hubo un incremento en cuanto a la obtención de azúcares reductores, siendo este tiempo (5 h) significativamente diferente de los demás. En diversos estudios (Jiang, *et al.*, 2020, Qing, *et al.*, 2017, Araújo *et al.*,2019) se ha reportado que el grado de deslignificación aumenta proporcionalmente a la concentración de álcali, confirmando que un valor elevado de pH es favorable para el tratamiento previo del material lignocelulosico (Subhedar, *et*

al., 2018), sin embargo, uno de los inconvenientes de este método es la utilización de químicos, a comparación de otros tipos de pretratamiento.

Figura 10. Concentración de azúcares reductores obtenidos en el tratamiento químico (NaOH 3.5 N). Medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

El NaOH provoca un hinchamiento de la biomasa por la cantidad de iones generados, así mismo saponifica los enlaces éster de lignina y hemicelulosa, rompiendo los



enlaces lignina-carbohidrato (C-O), dando como resultado un incremento en el área superficial interna, provocando una disminución del área cristalina de la celulosa, dejando más accesible el paso a las enzimas (Cheng, *et al.*, 2011).

Este método es uno de los más utilizados; Cheng, *et al.*, (2011) trabajaron con paja de arroz como sustrato para la obtención de azúcares fermentables, probaron diferentes concentraciones de NaOH (2-6% p/v), con una temperatura controlada de 55°C, durante 3 horas, determinando el 6% p/v como la mejor concentración de NaOH con un resultado de 18 mg/mL de glucosa, por otro lado, Meléndez *et al.*, (2016) probaron dos concentraciones de NaOH, para el pretratamiento de bagazo de caña utilizando 60 g de bagazo natural y 35 ml de NaOH al 50 % p/v, obteniendo en 8 horas

de tratamiento una concentración de 25 mg/mL de azúcares reductores, valores más elevados que los obtenidos en este estudio, no obstante, la concentración de álcali y el tiempo de tratamiento fue menor.

7.2.4 Pretratamiento alcalino + vapor

En la figura 11 se presentan los resultados obtenidos en este tratamiento. En la primera hora de exposición al vapor se obtuvo una concentración de 1.9 mg/mL de azúcares reductores, lo cual se incrementó al transcurrir 3 horas de tratamiento donde el resultado fue de 2.4 mg/mL de azúcares reductores, sin embargo, estadísticamente no se encontraron diferencias significativas entre estos tiempos. En un estudio realizado por Gómez, *et al.*, (2013), donde utilizaron residuos de madera de pino (*Pinus patula* y *Eucalyptus camaldulensis*) para la obtención de azúcares fermentables, probaron la misma temperatura que en este estudio (120°C), pero una mayor presión (29 PSI), la relación sólido líquido que emplearon fue de 1:15 p/v, concentración de NaOH de 1% p/p por 30 min, obteniendo respectivamente 2.17 y 2.61 mg/mL de azúcares reductores.

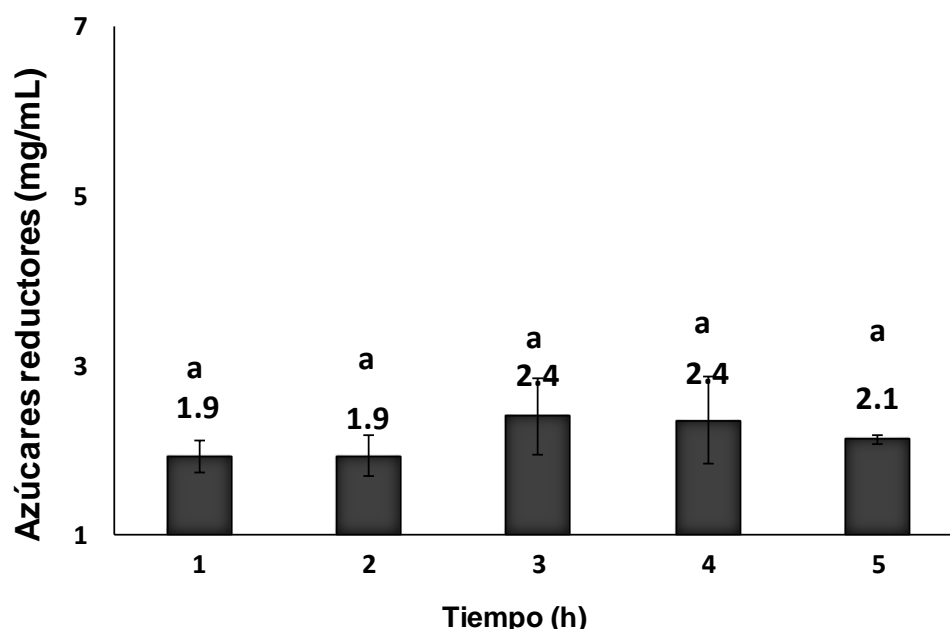


Figura 11. Concentración de azúcares reductores obtenidos en el tratamiento combinado (NaOH 3.5 N + vapor). Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Al ser un método combinado se esperaban mejores resultados ya que en teoría el vapor causaría una ruptura de las paredes celulares por hinchamiento y habría una mejor penetración del NaOH, el cual solubilizaría la lignina y aumentaría la digestibilidad de las moléculas de celulosa, sin embargo, se considera que en este método ocurrió una reacción de Maillard, ya que se presentaron las condiciones necesarias para esta reacción, presencia de un compuesto carbonílico (azúcar reductor) y una amina (aminoácido, péptido o proteína), ya que el rastrojo de amaranto presenta ambas moléculas, otro factor que propicio el que haya ocurrido esta reacción es el pH el cual fue alcalino (13.5), (Arias y López, 2019). Uno de los factores físicos que se atribuyen a que haya ocurrido esta reacción es la apariencia oscura que tomo la suspensión; así como el olor a pan horneado que desprendió (Arias y López, 2019). Por lo tanto, este método no se consideró viable para ser utilizado como pretratamiento del rastrojo de amaranto.

7.2.5 Pretratamiento alcalino + ultrasonido

En este método se evaluó el efecto de la concentración del álcali (2N, 2.5 N, 3N, 3.5 N) y del poder del ultrasonido en la obtención de azúcares reductores. Los resultados obtenidos con las diferentes concentraciones de NaOH se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Efecto de la concentración del álcali sobre la obtención de azúcares reductores utilizando el enfoque asistido por ultrasonido.

NaOH (N)	2 N	2.5 N	3 N	3.5 N
Glucosa (mg/mL)	5.0	5.5	6.5	8.1

Como se puede observar en la figura 12, no existieron diferencias significativas entre las concentraciones de NaOH 2 N y 2.5 N, a diferencia de las concentraciones de 3 y 3.5 N, en donde se encontraron diferencias significativas, entre estas concentraciones; el contenido de celulosa del rastrojo de amaranto aumentó con la concentración creciente de NaOH, siendo la concentración mayor (3.5 N) la que dio mejores resultados en cuanto a la obtención de azúcares reductores, de manera que estos resultados coinciden con lo mencionado por, Wu, *et al.*,(2017), quienes mencionan que a mayor concentración alcalina, habrá una mayor deslignificación.

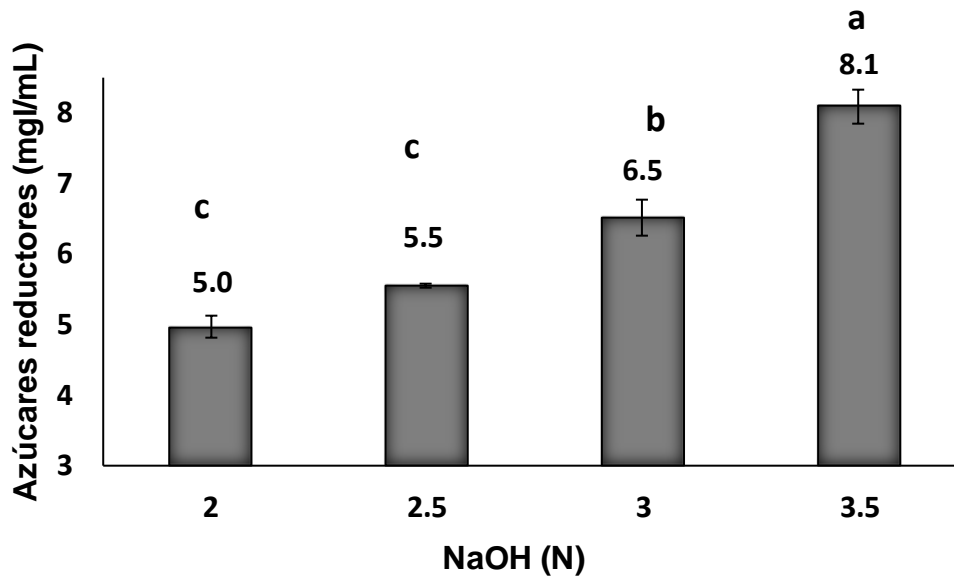


Figura 12. Efecto de la concentración de NaOH sobre la producción de azúcares reductores después de un tratamiento con ultrasonido. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

En otros estudios donde utilizaron bagazo de caña de azúcar (Torres, *et al.*, 2016) como sustrato, encontraron que con 0.125 g de hidróxido de sodio y una potencia de 140 W, durante 30 min, se podían obtener 24 mg/mL de azúcares fermentables. Wu, *et al.*, (2017), utilizaron como sustrato la paja de arroz, probando diversas concentraciones de NaOH 0.4%, 0.6%, 0.8% y 1.0% p/v, al igual que dos temperaturas 23°C y 50 °C, mantuvieron el tratamiento de ultrasonido durante una hora, utilizando un sonicador programable tipo bocina (VOSHIN-501D, Wuxi VoshinInstruments) operado a 22 kHz, el tiempo de encendido y apagado fue de 2 y 4 s, cabe señalar; que la potencia utilizada (300 W) fue mayor a la empleada en este estudio; así mismo se debe hacer mención de que el material de la punta de bocina fue de titanio.

En el mismo año, Wang, *et al.*, (2017), utilizaron residuos de pastos podados, ocupando NaOH al 5% p/p y una frecuencia ultrasonica de 25 kHz, (mayor a la

utilizada en este estudio (20 kHz), así mismo; la potencia que emplearon fue de 60 W, obteniendo 2.8 mg/mL de glucosa.

No hay que olvidar que con este pretratamiento (alcalino asistido por ultrasonido) se obtuvieron los valores más altos de azúcares reductores en este estudio, esto se puede atribuir a la alta concentración de hidróxido de sodio utilizada; ya que a medida que aumenta la concentración de NaOH, aumentan los iones hidroxilo y esto ayuda a degradar la lignina, por otro lado, de acuerdo a la literatura, se debe mencionar que los iones de Na⁺ tiene un diámetro como para penetrar los poros más pequeños de la matriz lignocelulósica y por su capacidad oxidativa actúan sobre los enlaces éster y éter de la lignina (Subhedar, *et al.*, 2018).

En diversos estudios enfocados en el proceso de deslignificación se ha informado que el requerimiento de carga alcalina es menor en los procesos asistidos por ultrasonidos, en comparación con el proceso convencional, sin embargo, esto no se observa en el experimento probado; la asistencia por ultrasonido provoca que se abra la matriz lignocelulósica del material vegetal, lo que favorece la penetración del reactivo alcalino, y facilita la degradación de la lignocelulosa, junto con un menor tiempo de reacción (Rucha, *et al.*, 2019). Es importante mencionar que esto depende de la biomasa vegetal con la que se vaya a trabajar.

Por otro lado, el control de la temperatura es un factor importante en este tipo de tratamientos, ya que el NaOH junto con la potencia del sonicador favorece el incremento de temperatura, y esto puede afectar a la liberación de azúcares reductores (Arias y López, 2019); por tal motivo, en este trabajo la temperatura se mantuvo constante a 50 °C.

7.3 Comparación de la productividad de los métodos empleados

En la figura 13 se muestran los resultados obtenidos en los diferentes tratamientos aplicados al rastrojo de amaranto. se muestra la concentración de azúcares reductores obtenida con cada tratamiento en una hora de reacción. Se observaron diferencias significativas, en los tratamientos con ultrasonido (ultrasonido y químico

asistido por ultrasonido) en comparación con los métodos convencionales (vapor, alcalino, alcalino + vapor), concordando con lo reportado en la literatura referente al uso de ultrasonido; ya que de acuerdo a lo mencionado por Subhedar *et al.*, (2016), el tratamiento asistido por ultrasonido generalmente reduce el tiempo de procesamiento y otorga mejores resultados a comparación de los métodos convencionales.

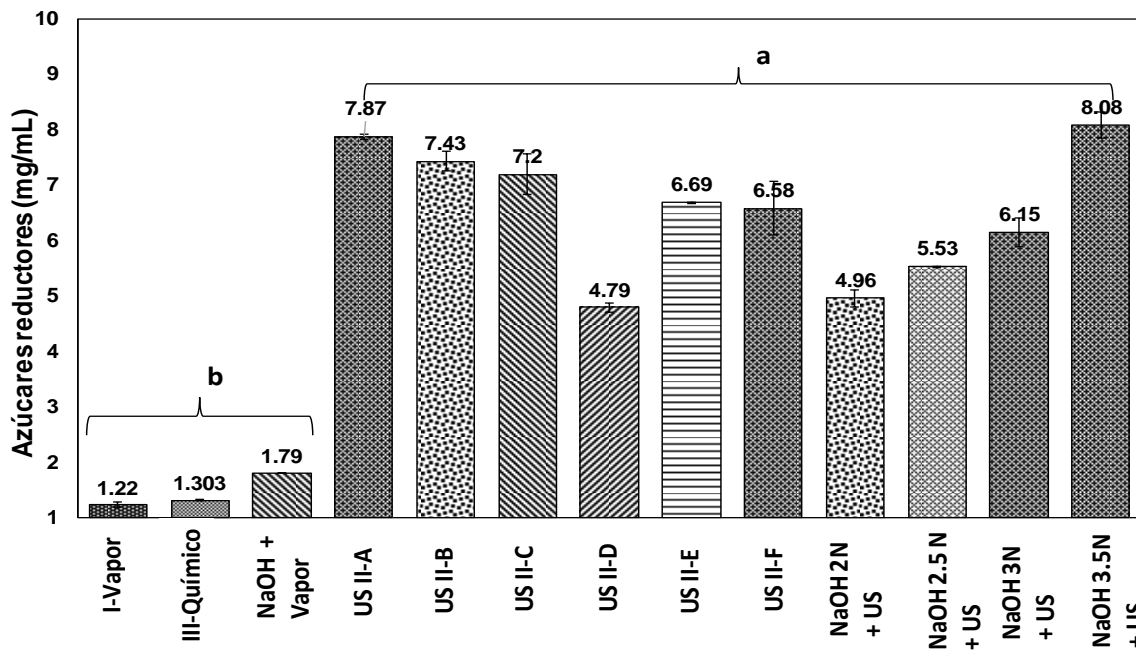


Figura 13. Comparación del efecto del ultrasonido sobre los diferentes pretratamientos probados

7.4 Análisis estructural por espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR).

Los espectros FT-IR del rastrojo de amaranto (figura 14), muestra que los perfiles espectrales de la mayoría de las bandas son similares, indicando que las muestras del rastrojo de amaranto con los distintos pretratamientos mantienen los mismos grupos funcionales, sin embargo, se visualiza una diferencia significativa entre los

picos de los tratamientos químicos con ultrasonido y los físicos con ultrasonido; utilizando como blanco el rastrojo sin pretratamiento.

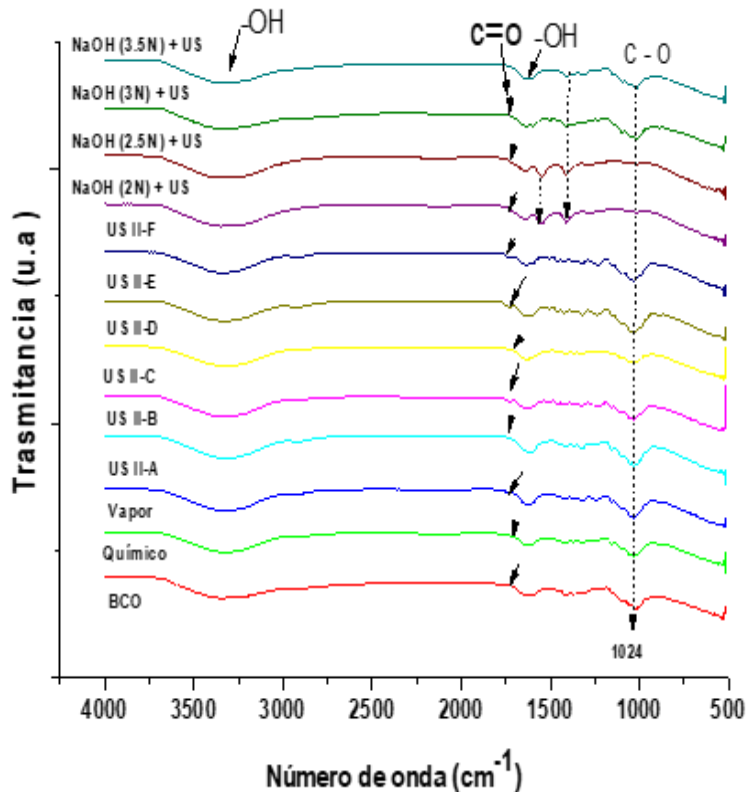


Figura 14. Espectros FTIR de los diferentes pretratamientos aplicados al rastrojo de amaranto.

Se observa (figura 14) que todas las muestras, incluido el blanco, presentan una banda ancha entre 3200 y 3400 cm^{-1} , la cual es atribuida a las vibraciones de tensión del grupo hidroxilo, aunque otros autores (Luo, *et al.*, 2018; Seyed y Fan, 2013), señalan este grupo en la posición 3310-3350 cm^{-1} , originado principalmente por la asociación entre la celulosa y hemicelulosa, influenciada por la concentración de las mismos en las muestras analizadas (Yan y Yajun, 2018), Xianliang *et al.*,(2018), ubican este grupo funcional entre el intervalo 3000-3650 cm^{-1} ; y en la posición 2934 cm^{-1} el grupo metilo (CH_3) (Xianliang, *et al.*, 2018). Los picos ubicados en la banda

1634.91 cm^{-1} y 1024 cm^{-1} corresponden al estiramiento característico de los grupos carbonilo, que están interconectados con cadenas de celulosa formando enlaces de hidrógeno, se puede notar la presencia de este grupo en la mayoría de las muestras, excepto, en los tratamientos con NaOH N + ultrasonido, siendo más notorio en el tratamiento de NaOH 3.5 N +ultrasonido, este resultado puede ser indicador de la eficiencia de este método, estos resultados se pueden corroborar en la figura 15 donde se presentan únicamente los espectros de los tratamientos con los mejores resultados en cuanto a liberación de azúcares reductores (US T1 y NaOH 3.5 N + ultrasonido).

La banda de absorción en 1015-1027 cm^{-1} asociada a la hemicelulosa, se atribuye a la flexión del grupo carbonilo (C=O). El pico en 1024.15 cm^{-1} , es atribuido al estiramiento del enlace C-O y las bandas de deformación en celulosa y hemicelulosa.

En los tratamientos con hidróxido de sodio 2 N y 2.5 N, se observa la presencia de dos picos poco prolongados en las bandas 1570-1414 cm^{-1} , estos picos no se visualizan en las otras concentraciones (3 y 3.5 N). Las asignaciones de bandas de absorción para la lignina normalmente incluyen la vibración del anillo aromático en 1606, 1507 y 1434 cm^{-1} , en la cual la vibración aromática en semicírculo (una vibración que involucra estiramiento C-C y un cambio del ángulo de enlace H-C-C, es asignado en 1507 cm^{-1} , el grupo carbonilo y cetona no conjugada y carboxilo se extiende en 1732 cm^{-1} (Seyed y Fan, 2013).

En las bandas 1606, 1645 -1507 Xianliang, *et al.*, (2018) sitúan el anillo aromático de la lignina, sin embargo, Seyed y Fan (2013), lo ubican en la banda 1434 cm^{-1} .

También se detectó una banda semiaguda en 897- 918 cm^{-1} , que es típica de los enlaces β -glucosídicos entre las unidades de azúcar de la hemicelulosa, en la región anomérica (Xianliang, *et al.*, 2018). Los picos inferiores a los 500 cm^{-1} , corresponden a los compuestos inorgánicos presentes en la muestra.

En la figura 15, se muestran únicamente los espectros de los tratamientos donde se obtuvieron mejores resultados y el espectro del blanco (rastreo sin pretratar) para fines comparativos.

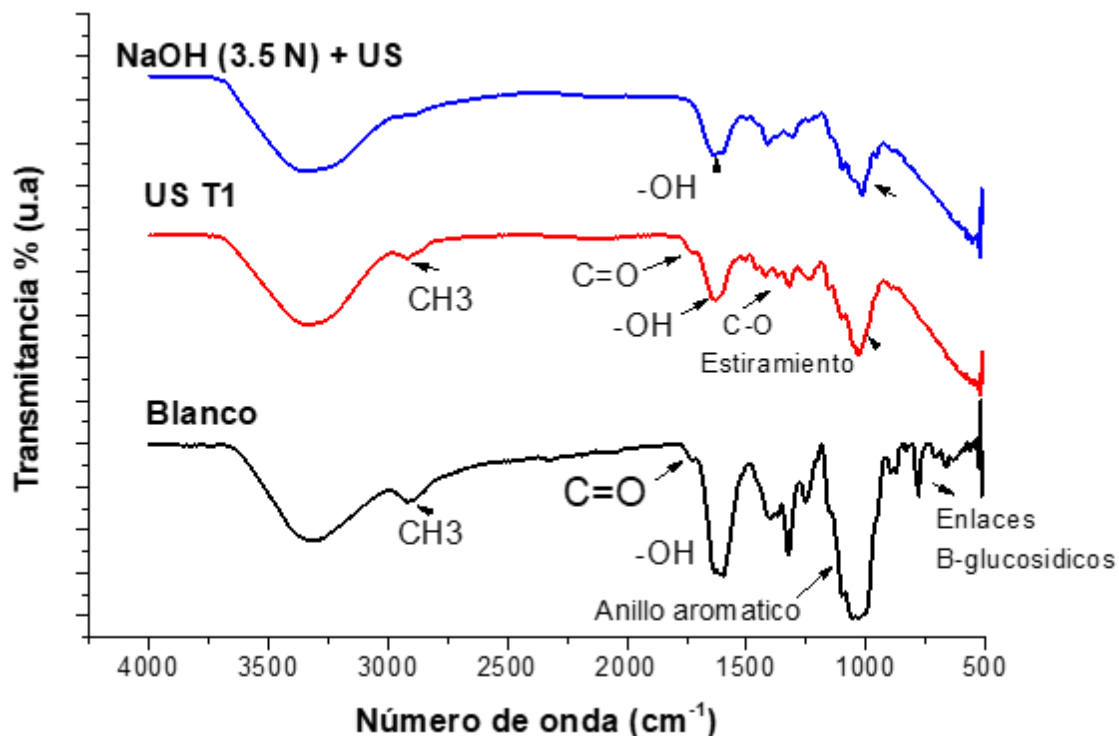


Figura 15. Espectros de los tratamientos con mejores resultados en cuanto a obtención de azúcares reductores

En la banda 2934 cm^{-1} se observa el pico del grupo metilo (CH_3), en la posición 1737 cm^{-1} , se encuentra el grupo carbonilo, grupo representativo de la lignina, el cual se presenta en el blanco y en el tratamiento con ultrasonido, pero no en el químico con ultrasonido; así mismo, en la posición 1636 cm^{-1} , se muestra la presencia de grupos hidroxilo seguido de los picos de tensión de los enlaces Carbono-Oxígeno (C-O).

Con estos espectros se puede corroborar que, si hubo cambios en cuanto a la estructura del material lignocelulósico y estos cambios fueron más notorios en el tratamiento con NaOH más ultrasonido, donde de manera cualitativa, de acuerdo a los resultados de las derivadas obtenidas en el programa *Origin 8.5.1* (OriginLab Corporation, EUA), se pudo estimar que la lignina se redujo un 70% con el tratamiento de ultrasonido más agua destilada y un 99% con el tratamiento de NaOH 3.5 N + ultrasonido (Figura 16).

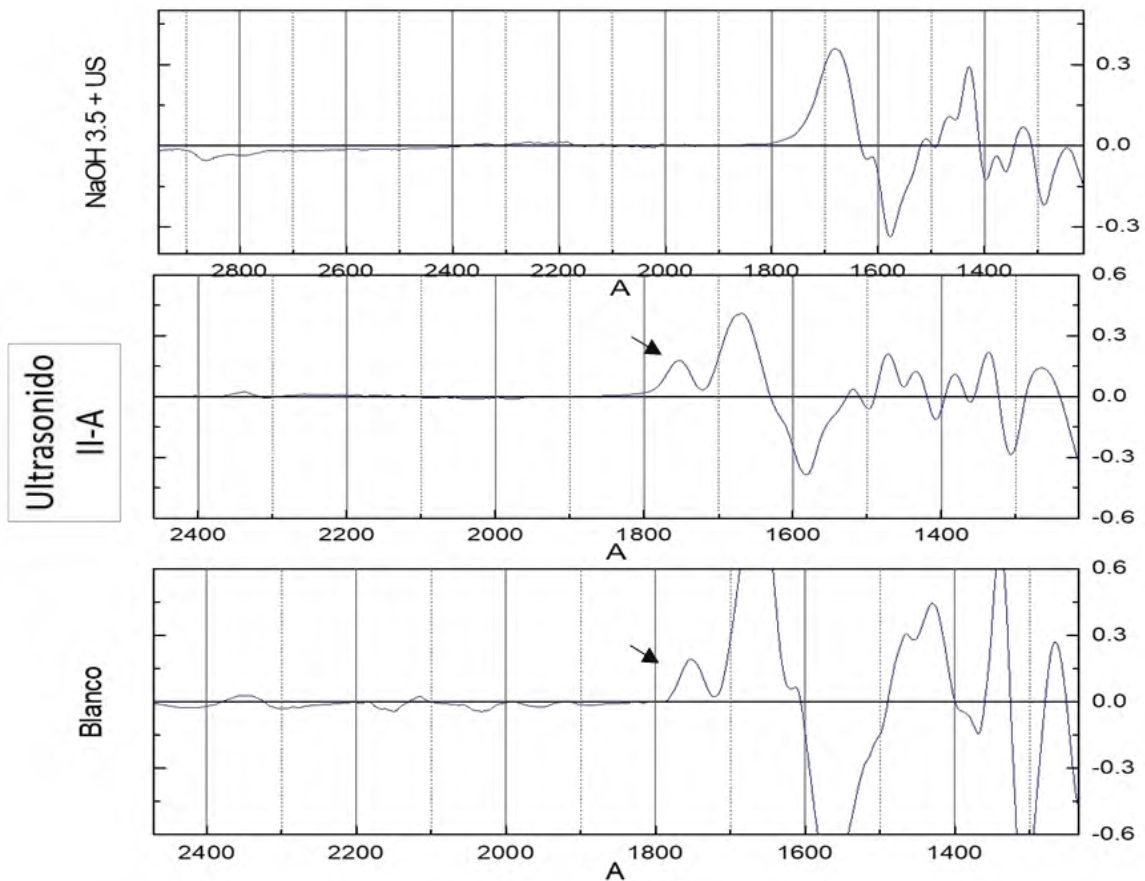


Figura 16. Derivada del pico de absorción perteneciente al grupo carbonilo de la lignina.

Dentro de los estudios donde se ha utilizado la asistencia de ultrasonido como pretratamiento se encuentra el de Sasmal, *et al.*, (2012)., quienes informaron la eliminación de lignina del 68% en semilla de bon bogori (*Ziziphus rugosa*), 65% en cáscara de nuez de areca (*Areca catechu*) y 64% en semilla de moj (*Albizia lucida*) después del pretratamiento de NaOH con ayuda de ultrasonido de la biomasa. Subhedar, *et al.*, (2018) señalaron la eficiencia de deslignificación de 70.4% (cáscara de maní), 80.0% (fibra de coco) y 78.9% (cáscaras de pistacho), después del pretratamiento alcalino asistido por ultrasonido de estos sustratos. Mohapatra, *et al.*, (2017), informaron eficiencias de eliminación de lignina de 80.4% y 82.1% para hierba Denanath y hierba Napier híbrida respectivamente después del pretratamiento con ácido asistido por ultrasonido. Los autores también observaron que un aumento en el poder de sonicación mejoró la eficiencia de deslignificación.

7.4.1 Hidrólisis enzimática convencional

La degradación efectiva de la lignocelulosa es un paso fundamental para la liberación de azúcares fermentables en la etapa de hidrólisis, ya que el rendimiento dependerá de la eficacia del pretratamiento.

Los resultados de la cinética enzimática de la degradación del rastrojo pretratado para su conversión a azúcares reductores se muestra en la figura 17. La carga enzimática utilizada fue de 0.5% (p/v), carga de sustrato de 5% (p/v), y la temperatura se mantuvo constante a 50 °C.

El tratamiento se realizó durante 8 horas, sin embargo, se llegó al punto máximo de reacción a las 4 horas de inicio obteniéndose 4.8 mg/mL de azúcares reductores, en otros estudios se reportaron tiempos de reacción de 4.5 y 6 h, los cuales son comparables con lo obtenido en este estudio (Patil, *et al.*, 2019., Subhedar, *et al.*, 2018).

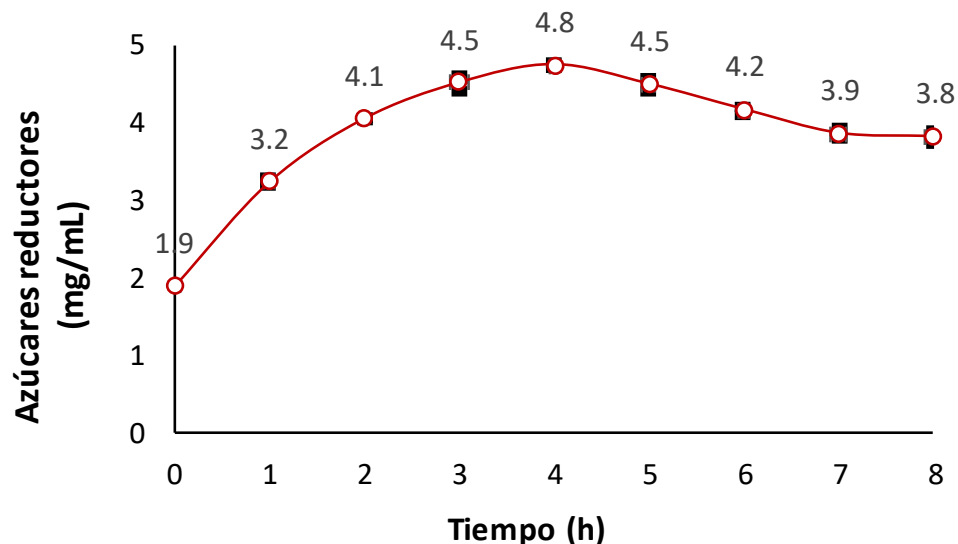


Figura 17. Azúcares reductores obtenidos durante el proceso de hidrólisis enzimática convencional.

7.4.2 Rendimiento de la hidrólisis enzimática convencional del rastrojo de amaranto pretratado

El rendimiento de la hidrólisis enzimática convencional del rastrojo de amaranto pretratado se muestra en la tabla 7. La composición química del sustrato, influye en el rendimiento de la hidrólisis, así como en la cantidad de azúcares liberados; así mismo, la concentración, tipo de sustrato, y el tamaño de partícula, son factores que influyen en la eficacia del proceso, aunado a esto, se debe mencionar, que en algunas investigaciones (Subhedad, *et al.*, 2016, Sasmal, *et al.*, 2012) parten de tamaños de partículas definidos, que probablemente, son inferiores a los utilizados en este estudio.

Tabla 7. Resultados obtenidos durante el proceso de hidrólisis convencional del rastrojo de amaranto pretratado.

Tiempo (h)	Azúcares reductores (mg/mL)	Rendimiento* (g/g)
0	1.90	0.04
1	3.20	0.06
2	4.10	0.08
3	4.50	0.09
4	4.80	0.10
5	4.50	0.09
6	4.20	0.08
75	3.90	0.08
80	3.80	0.08

* g A.R (gramo de azúcar reductor)

g R.A (gramo de rastrojo de amaranto)

García, *et al.*, (2019) evaluaron la hidrólisis de la cascarilla de arroz, utilizando celulasas comerciales (Sigma, USA), con un valor de pH de 5.0, a 50 °C, igual a la utilizada en este estudio, sin embargo, el tiempo de reacción fue de 72 h de hidrólisis, carga de sustrato del 5% p/v y carga enzimática de 0.3 mL/g, ellos obtuvieron 39.89 mg/mL de azúcares reductores, con un rendimiento del 73.2%; por otro lado, Cardona, *et al.*, (2019), utilizaron residuos de cebada como sustrato, ellos evaluaron distintas enzimas para el proceso hidrolítico, las cuales fueron Viscozyme L (complejo multienzimático que contiene β -glucanasa, celulasa, hemicelulasa y xilanasa; derivado de *A. aculeatus*, actividad 100 FBG/g); Celluclast 1.5L (derivado de *T. reesei*, actividad ≥ 700 U/g); Hemicelulasa (derivado de *A. niger* 0.3-3.0 U/mg); y Xilanasa (derivado de *A. oryzae* ≥ 2500 U/g). Los tratamientos enzimáticos los realizaron con agitación constante a 250 rpm, pH 5.0 (amortiguador de acetatos 0.1 M), 50 °C, la concentración de sustrato que utilizaron fue igual a la empleada en este estudio y en el estudio antes mencionado, del 5% p/v, el máximo valor de glucosa que obtuvieron fue de 16.5 mg/mL para Viscozyme L; así mismo, los residuos de las podas de pastos es otro de los sustratos utilizados para la obtención de azúcares fermentables. Cardona, *et al.*, (2019), utilizaron dos variedades de pastos, elefante (*Pennisetum sp*) y King (*Pennisetum hybridum*), empleando la enzima comercial Accellerase 1500 (Genecor), con una carga de 30 FPU/g de biomasa, a una temperatura de 50°C, 180 rpm, pH 4.8; cabe mencionar que la carga de sustrato fue superior a la utilizada en este trabajo, ellos utilizaron el 11% (p/v) de sustrato, los resultados obtenidos fueron 515.6 mg de azúcares reductores/g de biomasa para pasto elefante y para la hidrólisis de pasto king el mayor rendimiento a azúcares reductores fue de 563.3 mg/g de biomasa; ellos mencionaron que las variables más influyentes en el proceso de hidrólisis fueron la temperatura y cantidad de sustrato utilizado. Se debe mencionar que la carga de sustrato empleado en este estudio es similar a la utilizada en las investigaciones antes mencionadas (García, *et al.*, 2019) (Rucha, *et al.*, 2019), sin embargo, la composición química del material vegetal utilizado, se verá reflejada en la cantidad de material celulósico disponible, así mismo, como se mencionó anteriormente, la accesibilidad del sustrato al ataque enzimático es un factor fundamental para la eficacia de la hidrólisis.

7.4.3 Hidrólisis enzimática asistida por ultrasonido

En el caso de la hidrólisis enzimática asistida por ultrasonido para la liberación de azúcares reductores, se utilizó una carga enzimática menor en comparación con el enfoque convencional (Rucha, *et al.*, 2019). Los resultados obtenidos por hidrólisis asistida por ultrasonido se presentan en la figura 18; donde se puede apreciar un incremento de la liberación de azúcares reductores conforme aumenta el tiempo de reacción, sin embargo, a los 75 min se obtuvo la mayor liberación, a partir del minuto 90 la liberación de azúcares reductores permaneció constante, Por otro lado, el uso del ultrasonido mostró un incremento y una reducción significativa en la concentración de azúcares reductores y el tiempo, respectivamente, requerido para su liberación en comparación con el enfoque convencional. Estos resultados se atribuyen al efecto de las ondas de ultrasonido, las cuales provocan una mejor homogenización del medio, debido a la dispersión y desaglomeración de sólidos en el líquido, esto causado por el efecto de cavitación ultrasónica, el cual actúa generando elevadas fuerzas de cizallamiento que rompen los aglomerados de partículas dispersándolos en partículas individuales, y favoreciendo la acción de la enzima en el sustrato (Garcia , *et al.*, 2019).

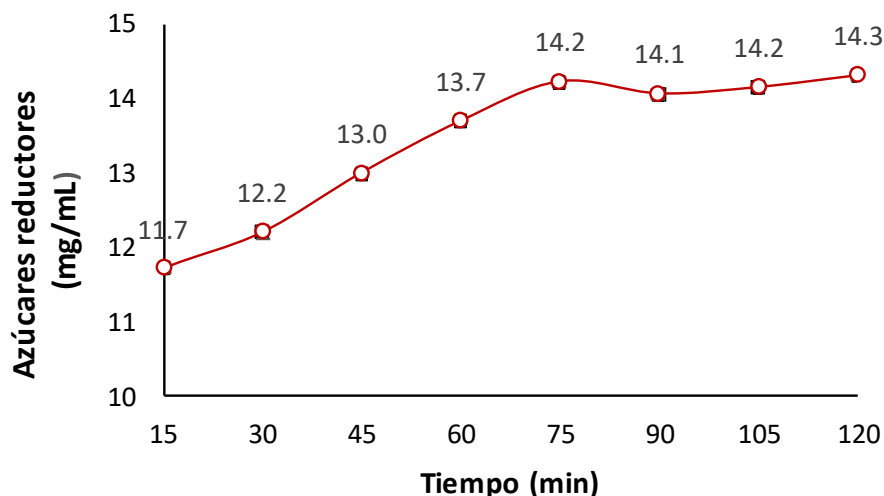


Figura 18. Azúcares reductores obtenidos durante el proceso de hidrólisis enzimática asistida por ultrasonido.

7.4.4 Rendimiento obtenido mediante hidrólisis enzimática asistida por ultrasonido del rastrojo de amaranto pretratado

Como se puede observar en la tabla 8 se muestra el rendimiento obtenido por hidrólisis enzimática asistida por ultrasonido del rastrojo de amaranto pretratado, con respecto a la cantidad de sustrato inicial, dicho rendimiento se presenta en gramo de azúcar reductor (g A.R) /gramo de rastrojo de amaranto (g. R.A).

Tabla 8. Resultados obtenidos durante el proceso de hidrólisis enzimática asistida por ultrasonido del rastrojo de amaranto pretratado

Tiempo (min)	Azúcares reductores (mg/mL)	Rendimiento* (g/g)
0	11.10	0.22
15	11.70	0.23
30	12.20	0.24
45	13.00	0.26
60	13.70	0.27
75	14.20	0.28
90	14.10	0.28
105	14.20	0.28
120	14.30	0.29

* g A.R (gramo de azúcar reductor)

g R.A (gramo de rastrojo de amaranto)

Como se aprecia en la tabla 8, el rendimiento fue mayor en comparación con el obtenido con el enfoque convencional, esto puede deberse a la asistencia del ultrasonido; sin embargo, sí se compara con otros sustratos empleados en estudios

diferentes, los resultados son menores, esto se debe a la composición de cada material vegetal, ya que no todos los sustratos están conformados por la misma cantidad de celulosa, por lo tanto, aunque se utilicen las mismas condiciones, los resultados en cuanto a la liberación de azúcares va a variar.

En los últimos años se ha estudiado el uso de ultrasonido para optimizar o mejorar el rendimiento de producción de diversos procesos, dentro de los estudios para la obtención de azúcares fermentables donde se utiliza como método de pretratamiento o para asistir el proceso de sacarificación, se encuentra el de Jiang, *et al.*, (2020), quienes utilizaron mazorcas de maíz como sustrato, así como una celulasa comercial, ellos obtuvieron 3.1 mg/mL de concentrado de glucosa en 24 horas de tratamiento, mencionan que el sustrato con pretratamiento de ultrasonido dio un rendimiento mayor de glucosa (45.5-52.1 %), comparado con el sustrato sin tratamiento previo (19.9%); del mismo modo; Lunelli, *et al.*, (2014), utilizaron bagazo de caña de azúcar como sustrato, obteniendo un rendimiento de 0.26 g/g de azúcares fermentables, así mismo, Subhedar, *et al.*,(2018) investigaron las condiciones adecuadas para la obtención de azúcares fermentables, de tres sustratos, el rendimiento de azúcar reductor obtenido fue 10.2, 12.1 y 8.1 mg /mL para cáscaras de cacahuete, coco y cáscaras de pistacho, ellos mencionan en su estudio que el ultrasonido ayuda a mejorar la actividad catalítica y a disminuir la barrera limitante de la difusión que rodea el sustrato, lo que conduce a una intensificación en las velocidades de reacción de hidrólisis (Subhedar, *et al.*, 2018), conviene especificar que las condiciones (temperatura, potencia, ciclo de trabajo) utilizadas en su investigación son similares a las de este estudio; Así mismo, Machado, *et al.*,(2015), probaron el uso de ultrasonido para mejorar el rendimiento de la hidrólisis del bagazo de caña de azúcar, utilizando una celulasa comercial (Sigma USA) ellos mencionaron que la aplicación del ultrasonido mejora la hidrólisis enzimática ya que condujo a una concentración mayor de azúcares reductores, en su caso, 89.37% más alta en comparación con el control (muestra no sonicada); concordando con lo encontrado en los estudios antes mencionados, donde hicieron mención de que con la asistencia del ultrasonido ocurre una mejor difusión de la enzima sobre el material vegetal, facilitando la acción enzimática, lo que mejora el rendimiento de la hidrólisis enzimática. Por otro lado,

Meléndez, *et al.*, (2017), obtuvieron un rendimiento de 62.69%, trabajando de igual manera con bagazo de caña de azúcar, y una temperatura cercana a la de este estudio (47 °C), sin embargo, la cantidad de azúcares fermentables fue de 24.99 mg/mL, se debe mencionar que en su estudio trabajaron bajo condiciones óptimas para ese sustrato.

No hay que olvidar, que en este tipo de hidrólisis las concentraciones de azúcares reductores fueron mayores en comparación con la hidrólisis convencional, además de la notable disminución del tiempo de reacción.

VIII. CONCLUSIONES

- Los mejores resultados se obtuvieron con los pretratamientos asistidos por ultrasonido. El proceso de deslignificación se ve favorecido con la asistencia de ultrasonido.
- No se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de azúcares reductores obtenidas con los métodos físicos (rastrojo + agua con ultrasonido) y el combinado (NaOH 3.5 N y ultrasonido) ($p \geq 0.5$)
- Los espectros FTIR mostraron que la modificación del material con los métodos físico (Ultrasonido II-A) y combinado (NaOH 3.5 N + Ultrasonido) presentaron diferencias en cuanto al porcentaje de deslignificación; sin embargo, conviene especificar que, desde el punto de vista ecológico y económico, el método adecuado para el de rastrojo de amaranto es el físico (rastrojo + agua con ultrasonido).
- De acuerdo a lo obtenido en el proceso de sacarificación, se sugiere utilizar en estudios posteriores, el enfoque de hidrólisis enzimática asistida por ultrasonido para la sacarificación del rastrojo de amaranto.

XIV. PERSPECTIVAS

- Optimizar el método de pretratamiento de ultrasonido para aumentar el porcentaje de deslignificación; incrementando la potencia de ultrasonido y la temperatura.
- Utilizar como método de pretratamiento el NaOH con ultrasonido para la deslignificación del rastrojo de amaranto y la posterior sacarificación.
- Caracterizar los productos obtenidos en el proceso de deslignificación con la finalidad de obtener el contenido de glucosa, hidroximetilfurfural y furfural. Esto con el objeto de entender los rendimientos obtenidos de celulosa en el sustrato sólido ya pretratado.
- Caracterizar los productos obtenidos en el proceso de sacarificación
- El sustrato del rastrojo de amaranto pretratado con el pretratamiento seleccionado en este trabajo, puede ser utilizado como medio de cultivo para hongos de interés.

X. BIBLIOGRAFIA

Araújo, D., *et al.*, 2019. Efecto de los pretratamientos combinados alcalinos diluidos y verdes en el fraccionamiento de la mazorca de maíz: caracterización de biomasa pretratada y producción de película de celulosa regenerada. *Cultivos industriales y productos*, pp. 47-60.

Ares, I. P., 2015. *Bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos*, España: Universidad de Vigo.

Arias, S. G. y López, D. V., 2019. Reacciones químicas de los azúcares simples empleados en la industria alimentaria. *Lámpsakos*, Volumen 22, pp. 123-136.

Bellido, C. D., 2015. Obtención de bioetanol 2g a partir de hidrolizados de paja de trigo., Valladolid, Mex.: Universidad de Valladolid.

Cardona, Y. C., Chamorro, E. C. y Tobón, J. C. A., 2019. Procesamiento de la Cascarilla de Cebada Cervecera por Vía Enzimática para la Obtención de Azúcares Fermentables. *Información Tecnológica*, 30(4), pp. 41-50.

Carranza, A. R., 2015. "Obtención de glucosa a partir de aserrín de encino pretratado con reactivos alcalinos, seguido por hidrólisis enzimática", Chihuahua, Méx.: Cimav. Centro de Investigación en Materiales Avanzados S.C. .

Cheng, y.-S., Zheng, Y., Yu, C. W. y Dooley, T., 2011. Evaluación del pretratamiento alcalino con alto contenido de sólidos de la paja de arroz. *Aplicada Bioquímica y Biotecnología* , Volumen 162, pp. 1768-1784.

Chen, Hongyan; Liu, Jinbao; Xi, Chang; Chen, Daming; Xue, Yuan; Han, Sheng., 2017. A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. *Fuel Processing Technology*. Volumen 160, pp. 196-206

Chen, Y., Jiang , S., Yuan, . H. y Zhou, Q., 2015. Hydrolysis and acidification of waste activated sludge at different pHs.. *Water Res.*41, pp. 683-795.

Conabio, 2017. Amaranthus. [En línea] Available at: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/amaranthaceae/amaranthus-hybridus/fichas/ficha.htm> [Último acceso: 12 Marzo 2020].

Cortínez, V. A. V., 2010. Comparación de pretratamientos en residuos forestales para la producción de bioetanol de segunda generación: Hidrólisis ácida y líquidos iónicos, Santiago de Chile: Facultad de ciencias físicas y matemáticas.

García, C. y Franklin, R., 2018. Obtención de azúcares reductores a partir de cáscara de papa (*Solanum tuberosum*) por hidrólisis química y enzimática, Perú: Universidad Señor De Sipán.

García, Y., C., Morales, J., Montalvo, P. y Figueroa, L., 2019. Pretratamiento e hidrólisis enzimática de la cascarilla de arroz. *Rev Soc Quím Perú*, 85(4), pp. 476-485.

García, Y. G., Contreras, J. C. M., Hernández, J. A. y Dueñas, R. S., 2015. Procurement of fermentable sugars from cardboard waste for the cultivation of yeasts for biotechnological use. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 6(28), pp. 88-105.

García, J. Pereyra.; Valdés, C. Lozano; Olivares, E. Saenz; Alvarado, O. Gómez; Medrano, H. Roldán, 2009. Rendimiento de grano y calidad del forraje de amaranto (*Amaranthus spp.*) cultivado a diferentes densidades en el noroeste de México. *Revista internacional de bótanica experimental*.78, pp. 53-60.

Gómez- Gómez, A., 2014. Obtención de péptidos con actividad inhibitoria de la enzima convertidora de la angiotensina I a partir de hidrolizados proteínicos de la fracción vegetal del amaranto (*Amaranthus hypocondriacus L.*), Oaxaca, México: Universidad del Papaloapan.

Gómez, E. A., Ríos, L. A. y Peña, J. D., 2013. Effect of Pretreatment of Woody Biomass on Ethanol Yield. *Información tecnológica*, 24(5).

Gutierrez-Rojas, I., Moreno-Sarmiento, N. y Montoya, D., 2014. Mechanism And Regulation Of Cellulose Enzymatic Hydrolysis In Filamentous Fungi: Classic Cases And New Models. *Revista Iberoamericana de micología*, pp. 1-12.

Jiang, L.-q., Zhong, H.-q., Zhao, Z.-l. y Zhang, F., 2020. Selective saccharification of microwave-assisted glycerol pretreated corncobs via fast pyrolysis and enzymatic hydrolysis. *Fuel*, Volumen 265, pp. 0016-2361.

Luisi, A., Menegol, D., Pitarelo, A. P. y Camassola, M., 2015. Elephant grass (*Pennisetum purpureum Schum.*) pretreated via steam explosion as a carbon source for cellulases and xylanases in submerged cultivation. *Industrial Crops and Products*, Volumen 70, pp. 289-291

Lunelli, Felipe C; Sfalcin, Pamela; Souza, Matheus; Zimmermann, Eduardo; Mazutti, Marcio A., 2014. Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for the production of fermentable sugars. *ScienceDirect*, Volumen 124, pp. 24-28.

Luo, X; Wang, Q.; Fang, D; Zhuang, W.; Chen , C; Jiang, W; Zheng, Y, 2018. Modification of insoluble dietary fibers from bamboo shoot shell: Structural characterization and functional properties. *International Journal of Biological Macromolecules* (120), pp. 1461-1467.

Machado, J. G. y otros, 2015. Ultrasound-assisted Hydrolysis of sugarcane bagasse using cellulolytic enzymes by direct and indirect sonication. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2(15), pp. 81-87.

Meléndez , P. A. H., Hernández, J. U. B. y Morales, R. R., 2016. Análisis del pretratamiento de residuos lignocelulósicos para la producción de biocombustibles y bioproductos de alto valor agregado. *Jovenes en la ciencia*, 2(1), pp. 508-512.

Méndez - Arango, M. F., López, D. S., Núñez, O. G. y García, M. d. j. G., 2019. Evaluación del crecimiento radial sobre forraje de amaranto de hongos filamentosos aislados de hojas de café. *Mexican Journal of Biotechnology*, 4(2), pp. 47-59.

Miller, G., 1959. se of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 31, pp. 426-428.

Modenbach, A. A. y Nokes, S. E., 2014. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings- A review. *Biomass and bioenergy*, Volumen 56, pp. 526-544.

Mohapatra, S., Dandapat, S. y Thatoi, H., 2017. Physicochemical characterization, modelling and optimization of ultrasono-assisted acid pretreatment of two Pennisetum sp. using Taguchi and artificial neural networking for enhanced delignification. J. Environ manage, Volumen 18, p. 537–549.

Nagula, K. y Pandit, A., 2015. Intensificación del proceso de designificación e hidrólisis enzimática de biomasa celulósica designificada utilizando diversas técnicas de intensificación del proceso, incluida la cavitación. Biorresour. Technol, Volumen 213, pp. 162-168.

Negro, M., Martínez, J., Manero, J. y Martín, C., 2011. Efecto del pretratamiento con explosión por vapor en la hidrolisis enzimatica de madera de eucalipto y bagazo de sorgo, Madrid: Centro de Investigaciones Energeticas, Medioambientales y Tecnologicas.

NMX-F-607-NORMEX-2013, 2013. Determinación de cenizas en alimentos. En: México: Normas mexicanas, p. 2.

NOM-086-SSA1-1994, 2006. Determinación de extracto etéreo (método soxhlet). En: Normas mexicanas dirección general de normas. México: s.n., p. 2.

NOM-116-SSA1-1994, 2006. Determinación de humedad en productos. En: Normas mexicanas dirección general de normas. s.l.:s.n., p. 2.

NOM-155-SCFI-2012, 2012. Medición de nitrógeno total kjeldahl. En: Norma mexicana. s.l.:s.n., p. 12.

Patil, R. S., Joshi, S. M. y Gogate, P. R., 2019. Intensificación de la designificación del aserrín y posterior hidrólisis enzimática mediante ultrasonido. Ultrasonido sonoquímica, Volumen 58.

Ponce, N. M. T., 2015. La sacarificacion enzimatica en la produccion de bioetanol. Mexico, Ciinvestav-lpn, Pp. 1-2.

Qing, Qing; Guo, Qi; Zhou, Linlin; Gao, Xiaohang; Zhang, Yue, 2017. Comparison of alkaline and acid pretreatments for enzymatic hydrolysis of soybean hull and soybean

straw to produce fermentable sugars. *Industrial Crops y Products*, Volumen 109, pp. 391-397.

Ramírez, L. F. R., 2019. "Extracción y caracterización del xilano del residuo lignocelulósico de *Amaranthus hypochondriacus*, para utilizarlo como fuente de carbono en la evaluación del crecimiento de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus oryzae*", Tuxtepec, Oaxaca.: Universidad del Papaloapan.

Romeela, M., 2017. Ultrasound-assisted biological conversion of biomass and waste materials to biofuels: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2(17).

Sasmal, S. V., Goud , V. y Mohanty, K., 2012. Ultrasound Assisted Lime Pretreatment of Lignocellulosic Biomass toward Bioethanol Production. *Energy y Fuels*, Volumen 26, pp. 3777-3784.

Serrato, J. H. S., 2018. Revisión del estado del arte de los diferentes tipos de pretratamientos usados en residuos de poda para ser aprovechados posteriormente, Manizales, Colombia: Universidad católica de Manizales.

Seyed, H. G. y Fan, M., 2013. Structural analysis for lignin characteristics in biomass straw. *Scivese ScienceDirect*, Volumen 57, pp. 264-279.

Shi, Qicheng; Li, Yuqi; Li, Yuanfei; Cheng, Yanfen; Zhu, Weiyung, 2019. Effects of steam explosion on lignocellulosic degradation of, and methanogen. *Bioresource Technology*, Volumen 290, pp. 0960-8524.

Subhedar, P. B., Pearl , R. y Gogate, P. R., 2018. Intensificación de la designificación y posterior hidrólisis para la producción de azúcar fermentable a partir de biomasa lignocelulósica mediante irradiación ultrasónica. *Ultrasonics Soochemistry*, 40(2), pp. 140-150.

Subhedad, P. y Gogate, P., 2016. Use of Ultrasound for Pretreatment of Biomass and Subsequent Hydrolysis and Fermentation. *Institute of Chemical Technology*, pp. 127-149.

Taherzadeh, M. y Karimi, K., 2015a. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials. A review. *BioResources* .2, pp. 707-738.

Taherzadeh, M. J. y Karimi, K., 2015b. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*.9, pp. 1621-1651.

Torres, G. S., Chiarello, L. M., Lima, E. M. y Ramos, L. P., 2016. Pretratamiento alcalino asistido por eco de bagazo de caña de azúcar para la producción de etanol celulósico. *Catálisis hoy*, Volumen 269, pp. 21-28.

Vargas, Y. A. C. y Pérez, L. I., 2018. Aprovechamientos de residuos agroindustriales para el mejoramiento de la calidad del ambiente. *Facultad de Ciencias Básicas*, Vol. 14 (1), pp. 59-72.

Vega, A. M., Martínez-Risco, P. y Jácome, M. S., 2018. Obtención y determinación de aspectos estructurales de xilooligosacáridos del *Ulex*, España: Universidad de Coruña.

Velazquez, L. J., 2015. Producción de xilo-oligosacáridos por un proceso hidrotérmico por microondas usan el concepto de biorefinería integrada, Coahuila: Universidad de Coahuila.

Waliszewski, K. y Osvando-Chacón, S., 2005. Commercial cellulases preparations and their applications in extractives processes. *Universidad y Ciencia*, 21(42), pp. 111-120.

Wang, Siqi; Zhang, Panyue; Tao, Xue; Ye, Junpei; Nabi, Mohammad; Wang, Hongjie, 2017. Ultrasound assisted alkaline pretreatment to enhance enzymatic saccharification of grass clipping. *Energy Conversion and Management*, 149(1), pp. 409-415.

Wu, Han; Dai, Xiao; Gan, Yu-Yan; Ma, Jiayu; Wu, Zai-Klun; Wang, Wei-Guo; Wang, Cun-Wen, 2017. Ultrasound-assisted alkaline pretreatment for enhancing the enzymatic hydrolysis of rice straw by using the heat energy dissipated from ultrasonication. *Bioresource Technology*, Volumen 241, pp. 70-74.

Xianliang, L.; Qi, W.; Dongya, F.; Weijing, Z.; Canhui, C.; Yafeng, Z., 2018. Modificaction of insoluble dietary fibers from bamboo shoot shell: Structural

characterization and functional properties. International Journal of Biological Macromolecules, pp. 1461-1467.

Yan, L. y Yajun, Z., 2018. Physico chemical and functional properties of coconut (*cocos nucifera*) cake dietary fibres: effects of cellulase hydrolysis, acid treatment and particle size distribution. Food Chemistry, Pp. 135-142.

ANEXO I

Análisis estadístico de los tratamientos

Análisis de Varianza. Tratamiento I. Vapor

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
--------	----	-----------	-----------	---------	---------

Tiempo	4	35.7926	8.94816	2107.48	0.000
Error	5	0.0212	0.00425		
Total	9	35.8139			

Tukey confianza de 95%

Tiempo	N	Media	Agrupación
5	2	6.2980	A
4	2	6.1300	A
3	2	5.7995	B
2	2	5.2055	C
1	2	1.2215	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Análisis de Varianza. Tratamiento II. Ultrasonido

Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
ciclo	2	1.1513	9.61%	1.1513	0.57563	7.40	0.024
amplitud	1	6.4739	54.07%	6.4739	6.47388	83.18	0.000
ciclo*amplitud	2	3.8816	32.42%	3.8816	1.94078	24.94	0.001
Error	6	0.4670	3.90%	0.4670	0.07783		
Total	11	11.9737	100.00%				

Tukey confianza de 95%

ciclo*amplitud	N	Media	Agrupación
50 75	2	7.8705	A

70 75	2	7.4290	A	B
90 75	2	7.1800	A	B
70 50	2	6.6915		B
90 50	2	6.5860		B
50 50	2	4.7950		C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Análisis de Varianza.Tratamiento III. Químico

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tiempo	4	16.3937	4.09842	594.72	0.000
Error	5	0.0345	0.00689		
Total	9	16.4282			

Tukey confianza de 95%

Tiempo	N	Media	Agrupación
5	2	4.8695	A
4	2	2.3720	B
3	2	2.2425	B
2	2	1.4610	C
1	2	1.3030	C

**Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

Análisis de Varianza. Tratamiento IV. Combinado NaOH+Vapor

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
tiemp	4	0.3378	0.08444	0.33	0.847
Error	5	1.2791	0.25582		
Total	9	1.6168			

Tukey confianza de 95%

tiempo	N	Media	Agrupación
3	2	2.400	A
2	2	2.380	A
4	2	2.355	A
5	2	2.134	A
1	2	1.925	A

**Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

Análisis de Varianza. Tratamiento V. NaOH (2,2.5,3,3.5N) + Ultrasonido

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tiempo	5	15.582	3.1164	29.57	0.000
Tratamiento concentración alcal	3	33.748	11.2494	106.74	0.000
Tratamiento concentración alcal*Tiempo	15	7.739	0.5159	4.90	0.000
Error	24	2.529	0.1054		
Total	47	59.598			

Tukey confianza de 95%

Tratamiento			
concentración			
álcali	N	Media	Agrupación
4	12	6.74250	A
3	12	5.78367	B
2	12	4.74575	C
1	12	4.71308	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.