

Comparación entre diferentes métodos de pretratamiento para la producción de azúcares fermentables a partir de rastrojo de amaranto

Comparison between different pretreatment methods to obtain fermentable sugars from amaranth stubble

María de Jesús García-Gómez^{1,3,4*}, Dalia Yvette Chávez-Valerio², Oscar Nuñez-Gaona^{1,2,3}, Cirilo Nolasco-Hipólito^{1,2,3}, Jesús Carrillo-Ahumada³

¹Centro de Investigaciones Científicas/²Maestría en Biotecnología/³Cuerpo Académico Biotecnología Sustentable, Universidad del Papaloapan. Tuxtepec, Oaxaca, México.

⁴Red Temática 12.3 para la Reducción de Pérdidas y Desperdicios de Alimentos, Durango, México

*Correspondencia: Correo electrónico: unpal7@gmail.com (María de Jesús García-Gómez)

DOI: <https://doi.org/10.54167/tch.v19i4.1765>

Recibido: 28 de noviembre de 2024; Aceptado: 24 marzo de 2025

Publicado por la Universidad Autónoma de Chihuahua, a través de la Dirección de Investigación y Posgrado.

Editora de Sección: Dra. Esther Pérez-Carrillo

Resumen

Los residuos agroindustriales adquieren cada vez mayor importancia por su utilización en diversos procesos fermentativos, incluyendo la producción de sustancias con actividad biológica de valor industrial. Los azúcares fermentables (AF) constituyen un grupo de compuestos clave para estos procesos. Sin embargo, se deben llevar a cabo una serie de pasos para su liberación. El pretratamiento es un paso crucial para la obtención de estos compuestos. Por ello, el objetivo de este trabajo de investigación fue establecer un método adecuado para la deslignificación del rastrojo de amaranto (RA) y la posterior producción de AF. Se evaluaron cinco pretratamientos: físico (I. vapor y II. ultrasonido), químico (III. NaOH 3.5 N) y combinado (IV. NaOH 3.5 N + vapor y V. NaOH (2, 2.5, 3, 3.5 N) + ultrasonido). Se utilizó el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) para azúcares reductores y así determinar la concentración de AF, lo que indicaría la degradación de la lignocelulosa. Esto fue corroborado mediante análisis FTIR. Los métodos que obtuvieron mayor concentración de AF fueron el II y el combinado V (3.5 N NaOH). Una vez definido el método de pretratamiento, se realizó el proceso de sacarificación mediante hidrólisis enzimática convencional e hidrólisis asistida por ultrasonidos, siendo esta última la que mostró mayor eficiencia.

Palabras clave: amaranto, rastrojo, pretratamiento, azúcares reductores, deslignificación.

Abstract

Agro-industrial residues are gaining increasing importance for their use in various fermentation processes, including the production of substances with the biological activity of industrial value. Fermentable sugars (FS) are a key group of compounds for these processes. However, a series of steps must be carried out to facilitate their release. Pretreatment is a crucial step in obtaining these compounds. Therefore, the objective of this research work was to find a suitable method for delignification of amaranth stubble and subsequent production of fermentable sugars. For this purpose, five pretreatment methods were tested, which were classified as follows: physical (I. steam and II. ultrasound), chemical (III. 3.5N NaOH), and combined (IV. 3.5N NaOH + steam and V. NaOH (2, 2.5, 3, 3.5 N) + ultrasound). The Miller method (DNS) for reducing sugars was used to determine the concentration of FS, which would indicate the degradation of lignocellulose. This was corroborated by FTIR analysis. The methods that obtained the highest concentration of FS were the physical pretreatment (II. ultrasound) and the combined pretreatment (V. 3.5 N + ultrasound). Once the pretreatment method was defined, the saccharification process was carried out through conventional enzymatic hydrolysis and ultrasound-assisted hydrolysis, with the latter showing greater efficiency.

Keywords: amaranth, stubble, pretreatment, reducing sugars, delignification.

1. Introducción

Actualmente, los residuos agroindustriales no tienen una disposición final adecuada, y la mayoría terminan siendo quemados, lo que conduce a la liberación de CO₂, uno de los principales gases de efecto invernadero. La investigación actual se ha centrado en encontrar alternativas para la eliminación de estos residuos mediante su utilización en la producción de sustancias industriales valiosas. El uso de materiales lignocelulósicos derivados de actividades agrícolas contribuye a mitigar el proceso de contaminación ambiental, ya que estos residuos, en sus diferentes etapas de producción, son actualmente un problema debido a la falta de un manejo adecuado o disposición final (Vargas-Radillo *et al.*, 2016). Aunque la biomasa lignocelulósica obtenida a partir de residuos agroindustriales ofrece una alternativa considerable, el proceso de transformación es complejo y consta de tres pasos fundamentales: pretratamiento, sacarificación y fermentación (Subhedar *et al.*, 2018). Los AF son un grupo clave de compuestos intermedios, y el pretratamiento es el paso más crucial para la sacarificación de la lignocelulosa. Los pretratamientos aumentan significativamente el rendimiento al liberar una mayor concentración de azúcares para la etapa de hidrólisis. La eliminación de lignina y la hidrólisis de hemicelulosa hace que el sustrato sea más accesible al ataque enzimático, lo que resulta en mejores rendimientos (Araújo *et al.*, 2019) en comparación con la hidrólisis realizada en sustratos no tratados. Cabe destacar que, dependiendo del método de pretratamiento, éste puede ser costoso, consumir tiempo y representar incluso posibles amenazas ambientales, especialmente al usar productos químicos agresivos (Subhedar *et al.*, 2018). Por otro lado, la sacarificación se puede llevar a cabo mediante hidrólisis enzimática, que es más eficiente en comparación con otros métodos como la hidrólisis química (Chu *et al.*, 2020). Los procesos de pretratamiento pueden mejorarse mediante la aplicación de ultrasonido ya que mejora el contacto entre la biomasa y los reactivos, reduciendo el tiempo requerido y logrando mejores rendimientos. Lo mismo se aplica a la hidrólisis enzimática asistida por ultrasonido, que resulta en mayores

rendimientos en un tiempo de reacción más corto en comparación con el enfoque convencional (Shah y Mohanraj, 2014).

En el caso del cultivo de amaranto, sus residuos, como la paja que queda después de la cosecha de semillas, se tratan de diversas maneras, no sólo para producir biopéptidos activos (Nolasco-Hipólito *et al.*, 2022), sino también para producir AF (Gong *et al.*, 2020). Se ha dedicado una cantidad considerable de investigación a explorar la viabilidad para usar el RA mediante la implementación de diversas técnicas para convertir el material lignocelulósico en AF. En un estudio sobre la tecnología de proceso óptimo de biomasa de amaranto para la producción de biocombustibles, se determinó que los pretratamientos alcalinos (NaOH 1 %) y ácidos suaves (H₂SO₄ 2 %), seguidos de la hidrólisis enzimática, complementada con un 8 % de proteínas endógenas, lograron casi la completa sacarificación enzimática, alcanzando rendimientos de glucosa del 99 % y 97 %, respectivamente (basados en el contenido de celulosa) (Madadi *et al.*, 2022). Otro estudio se centró en la producción de AF a partir de las raíces y tallos del amaranto, que contenían 363.5 g kg⁻¹ de celulosa y 124.9 g kg⁻¹ de hemicelulosa. Los investigadores emplearon microondas con diferentes potencias y la presencia de diferentes catalizadores alcalinos como NaOH, KOH o Ca(OH)₂. Sus hallazgos revelaron que el KOH, seguido de la hidrólisis enzimática, resultó en el mayor rendimiento total de azúcar (488.23 g kg⁻¹ basado en la carga original de biomasa) (Marx *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta que el rendimiento nacional del cultivo de amaranto es de 1.1 a 2.3 ton de grano ha⁻¹ bs (base seca) y 3.8 a 4.1 ton de hoja ha⁻¹ bs, generando aproximadamente 271,100 ton de residuos agrícolas por ciclo de cultivo, cuya duración es de 150-180 días; si se tienen hasta 2 ciclos por año (riego y temporal), la producción de rastrojo de amaranto sería de aproximadamente 542,200 ton por año. (Arce, 2011). Se sabe que el amaranto no sólo contiene proteínas con características funcionales superiores para proporcionar nutrición humana (Bressani, 1989), sino que también es una fuente de materia prima para producir AF, razón clave del aumento en el interés de investigar y aprovechar el RA (Madadi *et al.*, 2022). Con este enfoque, el objetivo de este trabajo fue seleccionar un método de pretratamiento y sacarificación del rastrojo de amaranto con el que se obtuvieran la mayor concentración de AF.

2. Materiales y métodos

2.1 Reactivos y material de estudio

Los reactivos utilizados fueron: NaOH (J.T. Baker, México), celulasas de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich, EE. UU). La celulasa de *Aspergillus niger* cataliza la hidrólisis de los enlaces endo-1,4-β-D-glucosídicos en la celulosa. Una unidad libera 1.0 μmol de glucosa de la celulosa en una hora a pH 5.0 a 37 °C.

2.2 Biomasa (Rastrojo de amaranto, RA)

El RA (*Amaranthus hypochondriacus*) se recolectó en parcelas ubicadas en el municipio de Santa Apolonia Teacalco (19°13'48.7"N 98°18'12.8"W) sembradas en el ciclo de temporal (abril-junio) en el estado de Tlaxcala, México. Las hojas y tallos de la planta se recolectaron después del proceso de trilla en sacos y se secaron al sol. Posteriormente, el material se trituro en un molino agrícola No.

20 (marca Swissmex turbo, México). El rastrojo triturado se tamizó con una malla No. 18 (Tyler, EE. UU) para obtener una homogeneización del tamaño de partícula (1 mm) y se depositó en bolsas de plástico.

2.3 Composición química proximal

La composición química proximal de la harina de RA se determinó de acuerdo con la metodología de la NORMA OFICIAL MEXICANA: Humedad (NMX-116 SSA1-1994), cenizas (NMX-F-607-NORMEX-2013), proteínas (NOM-155-SCFI-2012), extracto etéreo (contenido lipídico) (NOM-086-SSA1-1994), finalmente los carbohidratos totales se determinaron por diferencia.

2.4 Tratamientos físicos

a) Vapor (Rastrojo + Agua)

Se preparó una suspensión (RA/agua destilada) en una proporción de 1:10 p/v, ésta se molió mecánicamente durante 5 minutos. Posteriormente, se colocó en una autoclave a una temperatura de 121 °C y una presión de 1.05 kg cm⁻² por 5 horas. Se tomaron muestras de 2 mL a intervalos de una hora, y las muestras obtenidas se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 minutos a 25 °C (Subhedar y Gogate, 2016). La concentración de AF se determinó utilizando el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) con glucosa como estándar (Miller, 1959), para lo cual 1 mL de sobrenadante se mezcló con 1 mL de reactivo DNS. La mezcla de reacción se calentó a 100 °C por 10 minutos hasta obtener un color rojo-marrón, se dejó enfriar y se le añadieron 8 ml de agua destilada; finalmente, se midió la absorbancia a 540 nm.

b) Ultrasonido (Rastrojo + Agua)

Todos los experimentos con pretratamiento de ultrasonido se llevaron a cabo utilizando agua destilada para la suspensión 1:10 p/v (RA/agua destilada). Se utilizó un dispositivo ultrasónico Cole Parmer CPX 750, con frecuencia de 20 kHzv, potencia nominal de 750 W, sonda de titanio con diámetro de 1 cm. La sonda se insertó, aproximadamente, 2 cm en la mezcla de reacción (Subhedar et al., 2018). Los parámetros utilizados para el tratamiento de ultrasonido se resumen en la Tabla 1. Se tomaron muestras de 2 mL a intervalos regulares de 10 minutos por 60 minutos. Las muestras se centrifugaron 10 minutos a 10,000 rpm y 25 °C (Subhedar y Gogate, 2016), el sobrenadante se utilizó para determinar los AF.

Tabla 1. Parámetros utilizados en el tratamiento por ultrasonido.

Table 1. Parameters used in ultrasound treatment.

Parámetro	Valor
Tiempo de tratamiento	60 min
Potencia ultrasónica	100 W
Temperatura	50°C
Profundidad de inserción	≈2 cm
Ciclo de trabajo ^(a)	50 %, 70 %, 90 %
Amplitud ^(b)	75 %, 50 %
Intervalo de muestra	10 min

- (a) Se refiere a los ciclos de compresión y descompresión de la onda ultrasónica, ya sea continua (100 %) o pulsada (porcentajes)
- (b) Se refiere a la altura máxima de una onda, es decir, punto en el que la onda experimenta su alargamiento o distensión máximo desde la posición de equilibrio (75 % mayor alargamiento de onda que 50 %) (García, 2007).

2.5 Tratamiento químico

Se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 200 mL, utilizando 100 mL de NaOH 3.5 N, obteniendo una suspensión 1:10 p/v (RA/solución alcalina). La suspensión se agitó a una velocidad de 200 rpm, se tomaron muestras de 2 mL a intervalos de 1 hora durante 5 horas continuas (Torres *et al.*, 2016). Las muestras se centrifugaron 10 minutos a 10,000 rpm y 25 °C, el sobrenadante se utilizó para determinar los AF.

2.6 Tratamientos combinados

a) Pretratamiento alcalino con vapor

Se preparó una suspensión en una proporción de 1:10 p/v (RA/NaOH 3.5 N), que se trituró mecánicamente durante 5 minutos. Posteriormente, se colocó en una autoclave (120 °C, presión 1.06 kg cm⁻²) (Subhedar y Gogate, 2016). Se tomó una muestra de 2 mL cada hora durante el período de tratamiento de 5 horas. Las muestras se centrifugaron 10 minutos a 10,000 rpm y 25 °C, el sobrenadante se utilizó para determinar los AF.

b) Pretratamiento alcalino-ultrasónico

En este tratamiento, se estudió el efecto de la concentración de NaOH (2 N, 2.5 N, 3 N y 3.5 N) en la producción de AF utilizando ultrasonido bajo las condiciones mencionadas en la Tabla 1. Se extrajeron muestras de 2 mL a intervalos regulares (cada 10 minutos por 60 minutos). Todas las muestras se centrifugaron 10 minutos a 10,000 rpm y 25 °C, el sobrenadante se utilizó para determinar los AF; mientras que el precipitado se utilizó para el análisis de FTIR.

2.7 Análisis FTIR

El análisis de la estructura de las muestras de RA pretratadas se realizó utilizando un espectroscopio FTIR (modelo Dynascan Spectrum 100, Perkin Elmer, EE. UU.) empleando 2 mg del material de cada uno de los pretratamientos descritos. Los espectros se obtuvieron con una resolución de 4 cm⁻¹, en un rango de 4000-550 cm⁻¹ (Luo *et al.*, 2018).

2.8 Sacarificación del RA pretratado

a) Hidrólisis enzimática convencional

Después del pretratamiento, las muestras se hidrolizaron enzimáticamente con celulasa de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich, EE. UU.) a pH 5.0. En un matraz Erlenmeyer de 100 mL se agregaron el RA pretratados (5 % p/v) y la enzima (0.5 % p/v). La mezcla se agitó a 300 rpm a 50 °C

por 8 horas con muestreo cada hora (Patil *et al.*, 2019). Las muestras se centrifugaron 10 minutos a 10,000 rpm y 25 °C utilizando el sobrenadante para determinar los AF (azúcares reductores) por el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico, DNS (Miller, 1959).

b) Hidrólisis enzimática asistida por ultrasonido

Para investigar el efecto del ultrasonido en la hidrólisis enzimática del RA pretratado, se utilizó un dispositivo de ultrasonido a una frecuencia de 20 kHz y una potencia nominal de 750 W. Las condiciones específicas empleadas fueron: potencia de 50 W, 50 °C, ciclo de trabajo del 50 %, y amplitud del 75 % (Patil *et al.*, 2019; Subhedar *et al.*, 2018). La concentración del sustrato fue del 5 % p/v, mientras que la de la enzima fue del 0.5 % p/v. Se muestreó cada 15 minutos durante 120 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron 10 minutos a 10,000 rpm y 25 °C, el sobrenadante se utilizó para determinar los AF.

2.9 Diseño experimental y análisis de datos

El análisis estadístico se realizó utilizando el software Minitab 18. Cada análisis se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como la media de estos. Se realizó un análisis de varianza para cada tratamiento, utilizando un ANOVA de una vía para tratamientos con una sola variable (I. Vapor, III. Hidrólisis alcalina, IV. Pretratamiento alcalino + vapor, V. Pretratamiento alcalino + ultrasonido). Se utilizó un diseño factorial 2³ para el tratamiento II, ultrasonido, donde se probaron 2 factores (amplitud (75 % y 50 %) y ciclos de trabajo (50 %, 70 %, 90 %)), para probar la diferencia de medias se utilizó la prueba de Tukey con un nivel de significancia ≤ al 0.05 %.

3. Resultados y discusión

3.1 Composición química proximal del RA

La composición química proximal de la harina de RA (Tabla 2) mostró valores similares a los reportados por Méndez-Arango *et al.* (2019), que encontraron porcentajes de proteínas carbohidratos, lípidos y cenizas de 10-11 %, 69-72 %, 0.7-1 % y 12 % respectivamente; al utilizar el tallo y las hojas de la planta. También informaron un mayor contenido proteico y de minerales que podría atribuirse a la presencia de microorganismos en las muestras. En otro estudio, se analizaron variedades de *Amaranthus hypochondriacus* (variedad No. 1008) para determinar su valor nutricional; el período experimental abarcó desde la emergencia de la inflorescencia hasta la maduración completa del grano, es decir, del día 80 hasta el día 120 del cultivo (Tabla 3). En este periodo, el contenido de proteína bruta y de ceniza cruda disminuyeron significativamente; mientras que el contenido de extracto etéreo y el de la fibra cruda aumentaron significativamente. La cantidad de proteína en el período entre los días 80 y 90 de cultivo sugiere que las plantas podrían usarse como sustituto de nutrientes para forrajes convencionales (Písaříková *et al.*, 2006). Del mismo modo, Nogoy *et al.* (2020) mostraron contenidos de 11.95–14.19 % de proteína bruta, 45.53–70.88 % de fibra detergente neutro (FDN) y 34.17–49.83 % de fibra detergente ácida (FDA) en forraje de amaranto. La alta composición de nutrientes, la degradabilidad efectiva de la materia seca y la proteína bruta, junto con las características de fermentación favorables, sugieren que el forraje de amaranto permitiría una calidad de alimentación de buena a excelente para el ganado. La variación en los

porcentajes de composición química observados en estos estudios puede atribuirse a factores como la especie de planta, las condiciones ambientales y las características fisiográficas de los lugares de cultivo (García-Pereyra *et al.*, 2009).

Tabla 2. Composición química en porcentaje base seca de los rastrojos de amaranto de la especie *Amaranthus hypochondriacus*.

Table 2. Chemical composition in dry percentage of amaranth stubble of the species *Amaranthus hypochondriacus*

Parámetro	Contenido (%)*
Humedad	9.6 ± 0.05
Cenizas	5.9 ± 0.00
Grasa	0.3 ± 0.02
Proteína	9.6 ± 0.09
Carbohidratos totales	74.6 ± 0.6

*Media ± desviación estándar, n=3.

Tabla 3. Valor nutricional de variedades de *Amaranthus hypochondriacus* (variedad No. 1008) desde la emergencia de la inflorescencia hasta la maduración completa del grano

Table 3. Nutritional value of *Amaranthus hypochondriacus* varieties (variety No. 1008) from inflorescence emergence to full grain maturation

Parámetro	Emergencia de la inflorescencia Contenido (%)	Maduración completa del grano Contenido (%)
Cenizas	16.99 ± 0.014 – 19.22 ± 0.042	12.97 ± 0.014 – 13.84 ± 0.021
Grasa	1.22 ± 0.014 – 1.59 ± 0.028	2.80 ± 0.028 – 3.64 ± 0.014
Proteína	15.82 ± 0.120 – 18.54 ± 0.233	10.38 ± 0.120 – 11.31 ± 0.001
Fibra cruda	14.49 ± 0.212 – 17.00 ± 0.368	18.36 ± 0.70 – 27.60 ± 0.120

(Písaříková *et al.*, 2006)

3.2 AF de diferentes métodos de pretratamiento

Un criterio importante para medir la efectividad de los pretratamientos es la determinación del contenido de AF, que puede tomarse como un indicador indirecto de la degradación lignocelulósica (Reales *et al.*, 2016).

a) Vapor (presión y temperatura)

La Fig. 1 muestra los resultados obtenidos en el pretratamiento con vapor, donde se logró una concentración de 6.3 mg mL⁻¹ de AF en 5 horas de tratamiento. Se observó que no hubo diferencias significativas en la concentración de AF a las 4 y 5 horas, por lo que no se consideró necesario prolongar el tiempo de tratamiento y se fijó en 5 horas de exposición al vapor. Los tratamientos de 1, 2 y 3 horas exhiben diferencias significativas en comparación con los demás (Fig. 1). La presión y

la temperatura son factores clave en este tratamiento (1.05 kg cm^{-2} , 121°C). Según la literatura, este método induce la autohidrólisis ácida, que se atribuye a la liberación de residuos acetilos de las hemicelulosas. Estos residuos producen ácido acético, que, debido a las temperaturas del proceso, cataliza la hidrólisis de la hemicelulosa (Harmsen, 2010).

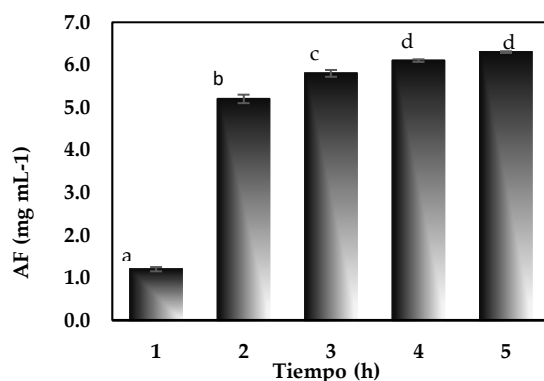


Figura. 1. Concentración de AF obtenidas en el tratamiento con vapor.

Figure. 1. FS concentration obtained in steam treatment.

Las medias señaladas con diferente letra a, b, c, y d son significativamente diferente a una * ($P \leq 0.05$)

b) Pretratamiento con ultrasonido

En este pretratamiento, se estudió el efecto del ciclo de trabajo y la amplitud de onda (Patil *et al.*, 2019; Subhedar *et al.*, 2018) en la producción de azúcares reductores. Los resultados se pueden observar en la Fig. 2, que muestra los tratamientos con diferentes combinaciones de ciclo de trabajo y amplitud obtenidos en 1 hora de tratamiento. La concentración más alta de AF se obtuvo con la combinación II-A (ciclo de trabajo del 50 % (encendido 25 s, apagado 25 s) y amplitud de onda del 75 %. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en comparación con los resultados obtenidos con la combinación II-B (ciclo de trabajo del 70 % y amplitud del 75 %) y II-C (ciclo de trabajo del 90 %, amplitud del 75 %), pero hubo diferencias en comparación con II-D (ciclo de trabajo del 50 %, amplitud del 50 %). Los tratamientos II-E (ciclo de trabajo del 70 %, amplitud del 50 %) y II-F (ciclo de trabajo del 90 %, amplitud del 50 %) fueron 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 del ultrasonido en el material vegetal se refleja en la estructura de la pared celular, donde los ciclos de ondas de alta y baja presión generan pequeñas burbujas o microburbujas (cavitación) que implosionan debido a cambios abruptos de presión, causando cizallamiento en el material vegetal. Esto significa que hay una interrupción del material fibroso y de celulosa (Subhedar *et al.*, 2018). Como se mencionó anteriormente, se encontró que el efecto del ciclo de trabajo del 50 % (II-A) en combinación con una amplitud del 75 % era adecuado para el proceso de pretratamiento del RA. Los resultados obtenidos con respecto al porcentaje de ciclo de trabajo (50 %) difieren de los presentados por Patil *et al.* (2019), quienes investigaron el efecto del ciclo de trabajo en la sonicación de aserrín para obtener azúcares reductores, encontrando que un ciclo de trabajo del 70 % era adecuado para este material vegetal. Sin embargo, para el RA, un ciclo de trabajo del 70 % no se considera adecuado ya que produjo un resultado inferior (7.4 mg mL^{-1}) en comparación con el ciclo

del 50 %, aunque estadísticamente no hay diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en la producción de AF entre ambos ciclos.

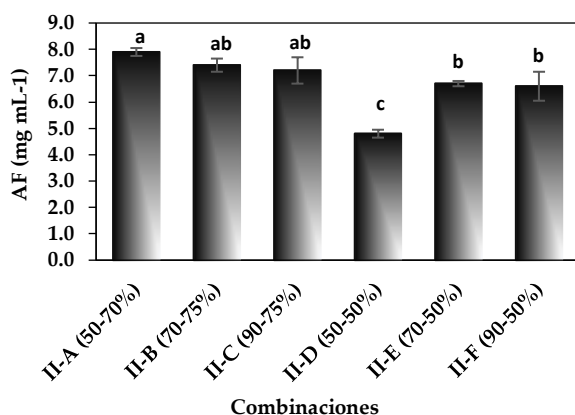


Figura 2. Efecto del ciclo de trabajo y la amplitud de sonicación en la producción de azúcares reductores en el tratamiento con ultrasonido

Figure 2. Effect of duty cycle and sonication amplitude on the production of reducing sugars in ultrasound treatment

Las medias señaladas con diferente letra a, b, c, y d son significativamente diferente a una * ($P \leq 0.05$).

Por otro lado, Subhedar *et al.* (2018) investigó la producción de AF a partir de cáscaras de nuez, coco y pistacho utilizando el mismo ciclo de trabajo (70 %) reportado por Patil *et al.* (2019), obteniendo resultados variados dependiendo del material vegetal utilizado (Subhedar *et al.*, 2018). Sin embargo, Nagula y Pandit (2016) estudiaron diversas técnicas de deslignificación, incluido, el tratamiento alcalino asistido por ultrasonido, de pasto Napier, y encontraron que un ciclo de trabajo del 50 % es óptimo para este material, lo cual es consistente con los hallazgos de este estudio. Por lo tanto, se considera que el tipo de material vegetal influye en la selección de los parámetros del proceso. Yadav *et al.* (2023) mencionaron que, a mayor tamaño de partícula, se requiere más energía y tiempo para que las ondas penetren. Cabe 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 excesivamente alto causará problemas como el aumento de la temperatura de reacción, la disipación de energía, la erosión del transductor y la formación de espuma, por lo tanto, se debe evitar (Patil *et al.*, 2019).

c) Pretratamiento alcalino

La Fig. 3 muestra los resultados obtenidos en el pretratamiento con NaOH 3.5 N durante un tiempo total de tratamiento de 5 horas. Se puede observar que no hay diferencias significativas entre los tiempos de 1 y 2 horas, ni entre los tiempos de 3 y 4 horas. Sin embargo, la producción de AF a las 5 horas fue significativamente diferente de las demás. El grado de deslignificación aumenta proporcionalmente con la concentración de álcali, confirmando que un valor de pH alcalino es favorable para el pretratamiento de material lignocelulósico (Jiang *et al.*, 2020; Araújo *et al.*, 2019; Subhedar *et al.*, 2018; Qing *et al.*, 2017). El mecanismo general de los efectos del pretratamiento con NaOH sobre los componentes estructurales de la biomasa ya se ha informado en otros trabajos (Modenbach y Nokes, 2014; Xu y Cheng, 2011), en términos generales, el NaOH provoca la hinchazón de la biomasa debido a los iones generados; también saponifica los enlaces éster de la

lignina y la hemicelulosa, rompiendo los enlaces lignina-carbohidrato (C-O), lo que resulta en un aumento en la superficie interna y una disminución en el área cristalina de la celulosa, haciéndola más accesible para las enzimas (Chen *et al.*, 2007). En paja de arroz, cuando se probaron diferentes concentraciones de NaOH (2-6 % p/v), la mayor concentración de glucosa (18 mg mL^{-1}) se obtuvo cuando se utilizó 6 % p/v de NaOH (Xu y Cheng, 2011). Por otro lado, para el pretratamiento de bagazo de caña de azúcar Meléndez *et al.* (2015) obteniendo una concentración de 25 mg mL^{-1} de azúcares reductores después de 8 horas de tratamiento en una mezcla con 60 g de bagazo natural y 35 mL de NaOH al 50 % p/v. Estos valores fueron más altos que los obtenidos en este estudio, sin embargo, la concentración de álcali y el tiempo de tratamiento fueron menores.

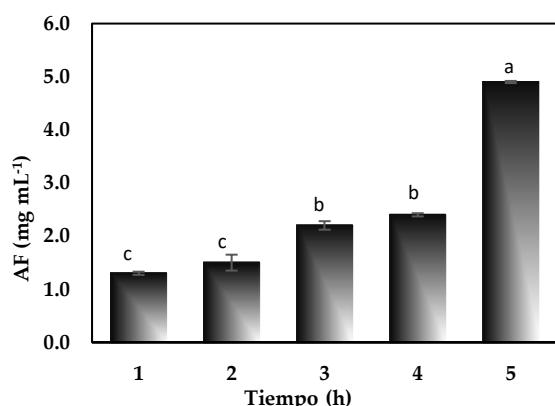


Figura 3. Concentración de AF obtenida en el tratamiento químico (NaOH 3.5 N).

Figure 3. Concentration of FS obtained in chemical treatment (3.5 N NaOH).

Las medias sin compartir letras son significativamente diferentes * ($P \leq 0.05$).

d) Pretratamiento alcalino + vapor

En la Fig. 4 se presentan los resultados obtenidos de este tratamiento. En la primera hora de exposición al vapor, se obtuvo una concentración de 1.9 mg mL^{-1} de AF, que aumentó a 2.4 mg mL^{-1} después de 3 horas de tratamiento; estas concentraciones no fueron significativamente diferentes. En un estudio realizado por Gómez *et al.* (2013), donde utilizaron residuos de diferentes maderas (*Pinus patula* y *Eucalyptus camaldulensis*) para obtener AF, probaron la misma temperatura que en este estudio (121°C) pero a una presión más alta (29 PSI). Emplearon una relación sólido-líquido de 1:15 p/v y una concentración de NaOH al 1 % p/p durante 30 minutos, lo que resultó en rendimientos respectivos de 2.17 y 2.61 mg mL^{-1} de AF. Dado que es un método combinado, se esperaban mejores resultados, ya que teóricamente, el vapor causaría una interrupción de las paredes celulares mediante la hinchazón, permitiendo una mejor penetración del ion OH^- del NaOH rompiendo los enlaces de la estructura básica de la lignina, mientras que los iones Na^+ se unirían a la lignina para formar fenolato de sodio (Modenbach y Nokes, 2014).

Este fenolato es soluble con color negro en la solución, y se llama lixiviado negro o licor negro (Dewi *et al.*, 2019). Sin embargo, se considera que ocurrió una reacción de Maillard en este método, ya que las condiciones necesarias para esta reacción estaban presentes: la presencia de un compuesto carbonílico (azúcares reductores) y una amina (aminoácido, péptido o proteína), ambos presentes en el RA. Esta reacción se favorece a pH alcalino (Arias-Giraldo y López-Velasco, 2019). Uno de los factores físicos atribuidos a la ocurrencia de esta reacción es el aspecto oscuro de la suspensión, así

como el aroma a pan horneado que se liberó (Arias-Giraldo and López-Velasco, 2019). Por lo tanto, este método no se consideró viable para su uso como pretratamiento para el RA.

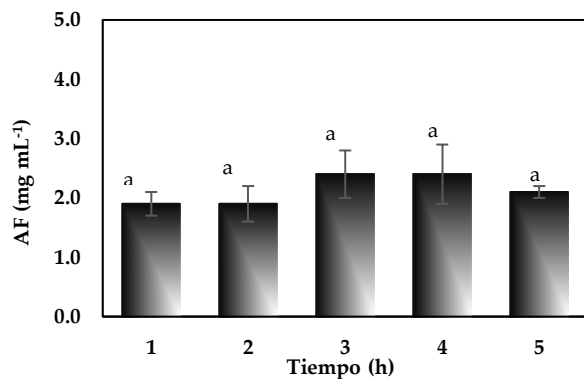


Figura 4. Concentración de AF obtenida en el tratamiento combinado (NaOH 3.5 N + vapor).

Figure 4. Concentration of AF obtained in the combined treatment (3.5 N NaOH + steam).

Las medias sin compartir letras son significativamente diferentes * ($P \leq 0.05$).

e) Pretratamiento alcalino + Ultrasonido

En este método, se evaluó el efecto de la concentración de NaOH (2N, 2.5N, 3N y 3.5N) y la potencia de ultrasonido en la producción de azúcares reductores. Como se puede observar en la Fig. 5, no hubo diferencias significativas entre las concentraciones de NaOH 2N y 2.5N, mientras que en las concentraciones de 3N y 3.5N se encontraron diferencias significativas en la producción de AF. El contenido de celulosa del RA aumentó con la concentración creciente de NaOH, siendo la concentración más alta (3.5N) la que ofreció los mejores resultados en términos de obtención de AF. Estos resultados son consistentes con los mencionados por (Wu *et al.*, 2017), quienes afirmaron que una mayor concentración alcalina conduce a una mayor degradación de la lignina y la hemicelulosa, sin degradar la celulosa.

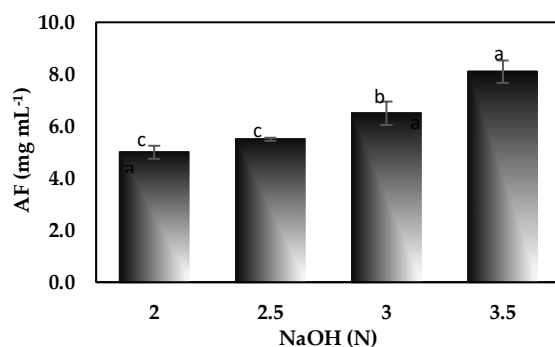


Figura 5. Efecto de la concentración de NaOH en la producción de AF después del tratamiento de ultrasonido

Figure 5. Effect of NaOH concentration on the production of FS after ultrasound treatment

Las medias sin compartir letras son significativamente diferentes * ($P \leq 0.05$).

En otros estudios en los que se utilizó bagazo de caña de azúcar como sustrato (Torres *et al.*, 2016), se encontró que con 0.125 g de hidróxido de sodio y una potencia de 140 W durante 30 minutos, se podían obtener 24 mg mL⁻¹ de AF. Wu *et al.* (2017) utilizaron paja de arroz como sustrato, probando varias concentraciones de NaOH (0.4 %, 0.6 %, 0.8 % y 1.0 % p/v) y dos temperaturas (23 °C y 50 °C). Mantuvieron el tratamiento con ultrasonido durante una hora a 22 kHz, con un tiempo de encendido/apagado de 2 y 4 segundos. Cabe destacar que la potencia utilizada (300 W) fue mayor que la utilizada en este estudio. Por otro lado, Wang *et al.* (2017) obtuvieron 2.8 mg mL⁻¹ de glucosa utilizando residuos de hierba podada, empleando un 5 % p/p de NaOH, una frecuencia de 25 kHz (mayor que la utilizada en este estudio, 20 kHz) y una potencia de 60 W.

Es importante destacar que los valores más altos de AF en este estudio se obtuvieron con este pretratamiento alcalino asistido por ultrasonido, lo que puede atribuirse a la alta concentración de hidróxido de sodio utilizada. A medida que aumenta la concentración de NaOH, aumentan los iones hidroxilo, facilitando la degradación de la lignina. Además, según la literatura (Araujo *et al.*, 2019; Hernández-Beltrán *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2017; Subhedar y Gogate, 2016; Harmsen, 2010), los iones Na⁺ tienen un diámetro capaz de penetrar en los poros más pequeños de la matriz lignocelulósica y, debido a su capacidad oxidativa, actúan sobre los enlaces éster y éter de la lignina. Varios estudios (Torres da Silva *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2017; Gómez *et al.*, 2013; Xu y Cheng, 2011) centrados en procesos de deslignificación han informado que el requerimiento alcalino es menor en procesos asistidos por ultrasonido en comparación con los procesos convencionales. Sin embargo, esto no se observó en este trabajo. La asistencia ultrasónica hace que la matriz lignocelulósica del material vegetal se abra, facilitando la penetración del reactivo alcalino y ayudando en la degradación de la lignocelulosa, junto con un tiempo de reacción más corto (Patil *et al.*, 2019), sin embargo, esto depende de la biomasa vegetal que se esté utilizando. Por otro lado, el control de la temperatura es un factor importante en tales tratamientos porque el NaOH, junto con la potencia del sonicator, puede aumentar la temperatura, afectando la liberación de AF (Arias-Giraldo y López-Velasco, 2019). Por eso, en este trabajo, la temperatura se mantuvo constante a 50 °C.

f) Comparación de la productividad entre los métodos empleados

Los resultados obtenidos de los tratamientos aplicados al RA se observan en la Fig. 6. Se muestra la concentración de AF obtenida en un tiempo de reacción de 1 hora para cada tratamiento. Se observaron diferencias significativas en los tratamientos ultrasónicos (ultrasonido y ultrasónico asistido químicamente) en comparación con los métodos convencionales (vapor, alcalino, alcalino + vapor), lo que es consistente con la literatura existente sobre el uso del ultrasonido. Las operaciones de pretatamiento tradicionales para la biomasa lignocelulósica se han encontrado ineficientes para la adaptación industrial. Por lo tanto, se han explorado tecnologías alternativas como microondas, ultrasonido, solventes eutécticos profundos, irradiación y métodos de pretatamiento asistidos por alta fuerza para la valorización efectiva de la biomasa lignocelulósica (Haldar y Purkait, 2021).

Es evidente que la eficiencia de la conversión de materiales lignocelulósicos en AF debe estudiarse, no sólo en términos de la cantidad de AF producidos, sino también en términos de la energía consumida para el proceso de conversión. Se espera una correlación directa entre estos dos factores, que debe destacarse en un análisis integral, abarcando tanto la eficiencia de conversión como el costo del proceso. El pretratamiento químico ha ganado atención significativa debido a su menor costo, tasas de reacción más rápidas y eficiencia superior para mejorar la degradación de moléculas orgánicas complejas (Hernández-Beltrán *et al.*, 2019).

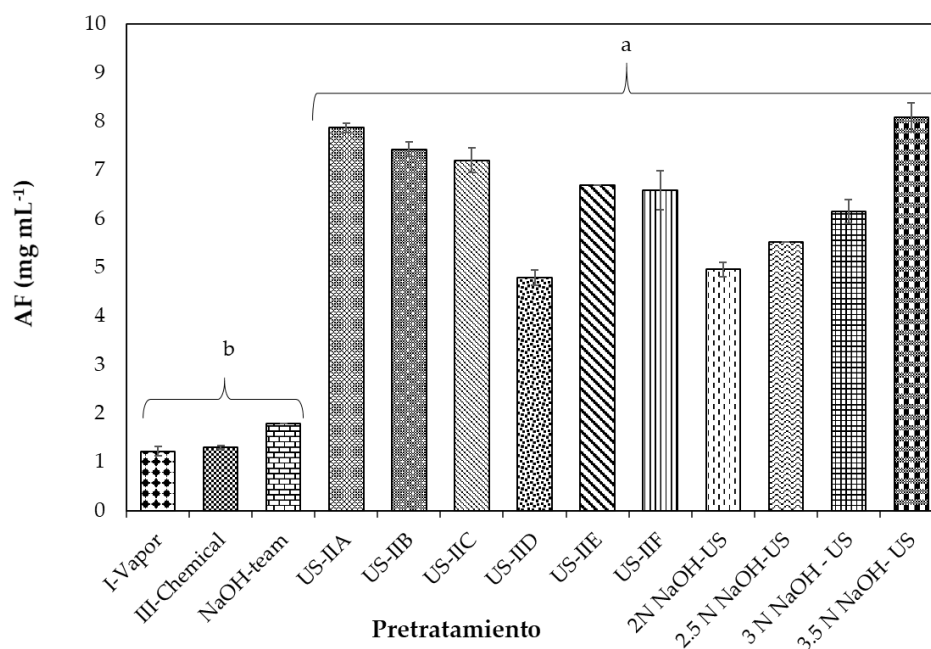


Figura 6. Comparación del efecto del ultrasonido combinado con diferentes pretratamientos.

Figure 6. Comparison of the effect of ultrasound combined with different pretreatments.

Las medias sin compartir letras son significativamente diferentes $^*(P \leq 0.05)$.

3.3 Análisis estructural mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros FTIR del RA (Fig. 7) revelan que los perfiles espectrales de la mayoría de las bandas son similares, indicando que las muestras de RA con diferentes tratamientos de pretratamiento conservan los mismos grupos funcionales. Sin embargo, se observa una diferencia significativa entre los picos de los tratamientos químicos asistidos por ultrasonido y los tratamientos físicos asistidos por ultrasonido, en comparación con el rastrojo sin tratar utilizado como referencia. Se puede observar (Fig. 7) que todas las muestras, incluida la referencia, presentan una banda ancha entre 3200 y 3400 cm^{-1} , que se atribuye a las vibraciones de estiramiento del grupo hidroxilo. Aunque otros autores (Luo *et al.*, 2018; Ghaffar y Fan, 2013) sitúan este grupo en 3310-3350 cm^{-1} , principalmente proveniente de la asociación entre celulosa y hemicelulosa, influenciada por su concentración en las muestras analizadas. Este grupo funcional se encontró en el rango de 3000-3650 cm^{-1} , mientras que el grupo metilo (CH_3) se posiciona en 2934 cm^{-1} (Luo *et al.*, 2018).

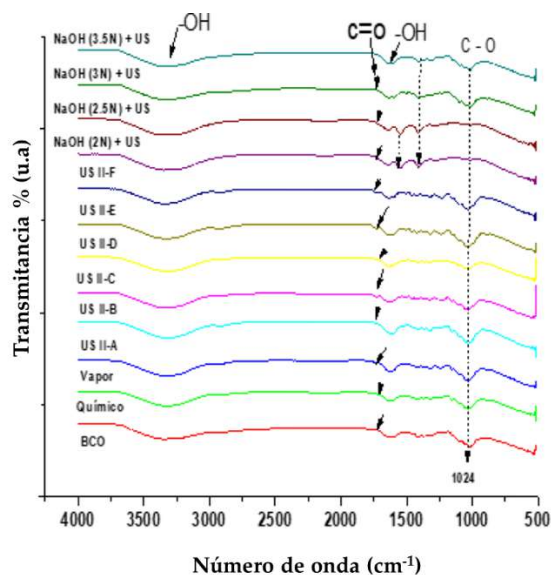


Figura 7. Espectros de FTIR de los diferentes pretratamientos aplicados al RA
Figure 7. FTIR spectra of the different pretreatments applied to amaranth stubble

Los picos ubicados a 1634.91 cm^{-1} y 1024 cm^{-1} corresponden al estiramiento característico de grupos carbonilo, que están interconectados con las cadenas de celulosa mediante enlaces de hidrógeno. La presencia de este grupo se puede observar en la mayoría de las muestras, excepto en los tratamientos con NaOH N + US, con una ausencia más notable en el tratamiento con NaOH 3.5 N + US. Este resultado puede indicar la eficiencia de este método, y se puede corroborar aún más en la Fig. 8, donde sólo se presentan los espectros de los tratamientos con los mejores resultados en términos de liberación de AF (US II A y NaOH 3.5 N + US).

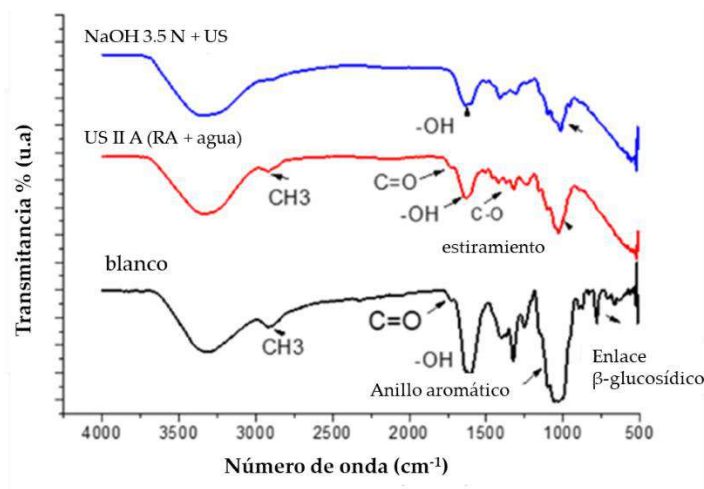


Figura 8. Espectros de FTIR de los tratamientos que produjeron la mayor concentración de AF
Figure 8. FTIR spectra of the treatments that produced the highest concentration of FS

La banda de absorción en el rango de $1015\text{--}1027\text{ cm}^{-1}$, asociada con hemicelulosa, se atribuye a la flexión del grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$). El pico a 1024.15 cm^{-1} se atribuye al estiramiento del enlace $\text{C}-\text{O}$, y las bandas indican deformaciones en celulosa y hemicelulosa. En los tratamientos con hidróxido de sodio (NaOH) 2 N y 2.5 N (Fig. 7), se observa la presencia de dos picos de corta duración en las bandas $1570\text{--}1414\text{ cm}^{-1}$, que no se visualizan en las otras concentraciones (3 N y 3.5 N). La asignación de bandas de absorción para lignina incluye típicamente la vibración del anillo aromático a 1606 , 1507 y 1434 cm^{-1} , con la vibración aromática en un semicírculo (involucrando estiramiento $\text{C}-\text{C}$ y un cambio en el ángulo de enlace $\text{H}-\text{C}-\text{C}$) asignada a 1507 cm^{-1} .

El estiramiento de los grupos carbonilo, de las cetonas y carboxilos no conjugados se extiende a 1732 cm^{-1} (Ghaffar y Fan, 2013). Las bandas 1606 cm^{-1} y $1645\text{--}1507\text{ cm}^{-1}$ se han atribuido al anillo aromático de la lignina por Luo *et al.* (2018), mientras que Ghaffar y Fan (2013) lo ubican en 1434 cm^{-1} . Además, se detectó una banda semiancha en el rango de $897\text{--}918\text{ cm}^{-1}$, típicamente asociada con uniones β -glucosídicas entre unidades de azúcares en hemicelulosa, particularmente en la región anómera (Luo *et al.*, 2018). Los picos por debajo de 500 cm^{-1} corresponden a compuestos inorgánicos presentes en la muestra. La Fig. 8 presenta exclusivamente los espectros de los tratamientos más exitosos, junto con el espectro de referencia no tratado (rastreo no tratado), con fines comparativos.

En la banda 2934 cm^{-1} , se observa el pico correspondiente al grupo metilo (CH_3). El grupo carbonilo, representativo de la lignina, está presente a 1737 cm^{-1} tanto en el blanco como en el tratamiento de ultrasonido, pero está ausente en el tratamiento químico asistido por ultrasonido. Además, se indica la presencia de grupos hidroxilo en la posición 1636 cm^{-1} , seguido de picos correspondientes al estiramiento de los enlaces Carbono-Oxígeno ($\text{C}-\text{O}$). Estos espectros confirman cambios notables en la estructura del material lignocelulósico, siendo el tratamiento con NaOH más ultrasonido el que exhibe cambios más pronunciados. Cualitativamente, basándose en los resultados de las derivadas obtenidas con el software Origin 8.5.1 (OriginLab Corporation, USA), se estimó que el tratamiento de ultrasonido con agua destilada redujo el contenido de lignina en un 70 %, mientras que el tratamiento de NaOH 3.5 N más ultrasonido logró una reducción del 99 % (Fig. 9).

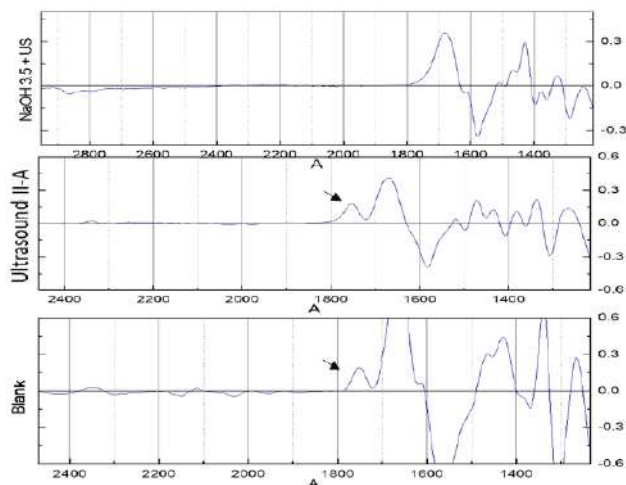


Figura 9. Derivada del pico de absorción perteneciente al grupo carbonilo de la lignina.

Figure 9. Derivative of the absorption peak belonging to the carbonyl group of lignin

Existen varios estudios que utilizaron pretratamiento de la biomasa con NaOH asistido de ultrasonido reportando diversos porcentajes de deslignificación. Uno de los estudios fue el realizado por Subhedar *et al.* (2018) quienes reportaron el 68 % de eliminación de lignina en semillas de bon bogori (*Ziziphus rugosa*), 65 % en cáscara de nuez de areca (*Areca catechu*) y 64 % en semillas de moj (*Albizia lucida*). Además, Subhedar *et al.* (2018) reportaron la eficiencia de deslignificación del 70.4 % (cáscara de cacahuete), 80.0 % (fibra de coco) y 78.9 % (cáscaras de pistacho) Por otro lado, (Mohapatra *et al.*, 2017) informaron eficiencias de eliminación de lignina del 80.4 % y 82.1 % para la hierba Denanath y la hierba híbrida Napier, respectivamente, después del pretratamiento ácido asistido por ultrasonido. También se observó que un aumento en la potencia de la sonicación mejoró la eficiencia de deslignificación.

3.4 Hidrólisis enzimática convencional

La liberación de AF en la etapa de sacarificación dependerá de la eficiencia del pretratamiento (Reales *et al.*, 2016); de los 2 tratamientos con los que se obtuvo la mayor concentración de azúcares fermentables (NaOH 3.5 N US y US II A) se seleccionó, para realizar la hidrólisis enzimática convencional y la asistida con US, el que tuvo menor gasto de insumos y generó menos residuos contaminantes, es decir, el producto del pretratamiento US II A (RA + agua). Los resultados de la cinética de hidrólisis enzimática del RA pretratado para la conversión a AF y la productividad en gramos de AF por gramo de sustrato utilizado ($\text{g AF g sustrato}^{-1}$) se muestra en la Fig. 10. La mayor concentración de AF (4.8 mg mL^{-1}) se alcanzó a las 4 horas. Otros estudios han informado tiempos de reacción de 4.5 y 6 horas, con resultados comparables a los obtenidos en este estudio (Patil *et al.*, 2019; Subhedar *et al.*, 2018). El análisis del rendimiento de la enzima se llevó a cabo durante periodos más largos, como 75 y 80 horas; la productividad se mantuvo constante alrededor de $0.08 \text{ (g AF g sustrato}^{-1})$. Estos datos no se muestran, pero demostraron que la actividad enzimática fue máxima a las 8 horas de tiempo de reacción. La composición química del sustrato influye en el rendimiento de la hidrólisis, así como en la cantidad de azúcares liberados. Además, factores como la concentración del sustrato, el tipo y el tamaño de partícula juegan un papel en la eficiencia del proceso. Cabe destacar que algunos estudios (Subhedar y Gogate, 2016) utilizaron tamaños de partícula definidos, que probablemente sean más pequeños que los utilizados en este estudio.

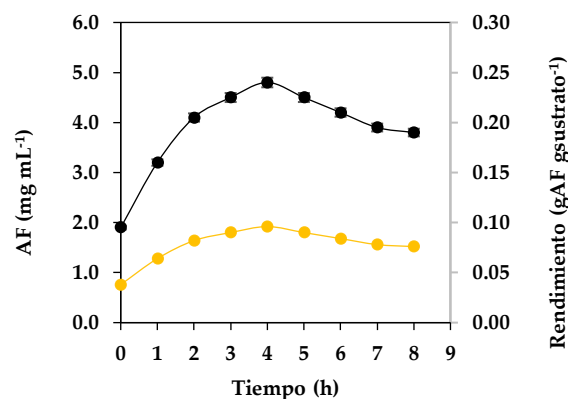


Figura 10. AF obtenidos durante el proceso de hidrólisis enzimática convencional de RA pretratado.

Figure 10. FS obtained during the conventional enzymatic hydrolysis process of AS pretrated.

Dewi *et al.* (2019) evaluaron la hidrólisis de la cáscara de arroz utilizando la misma enzima usada en este estudio a un pH de 5.0, 50 °C y 72 horas de hidrólisis, con sustrato del 5 % (p/v) y 0.3 mL g⁻¹ de la enzima; obteniendo 39.89 mg mL⁻¹ de AF con un rendimiento del 73.2 %. Por otro lado, Cruz-Cardona *et al.* (2019) utilizaron residuos de cebada como sustrato y evaluaron Viscozyme L (actividades β-glucanasa, celulasa, hemicelulasa y xilanasa), Celluclast 1.5L (derivado de *Trichoderma reesei*), Hemicelulasa (derivada de *Aspergillus niger*) y Xilanasa (derivada de *Aspergillus oryzae*). Los tratamientos enzimáticos se llevaron a 50 °C, con agitación constante a 250 rpm, pH 5.0, sustrato 5 % (p/v). El valor máximo de glucosa obtenido fue de 16.5 mg mL⁻¹ para Viscozyme L. En otro estudio, utilizaron residuos de poda de 2 variedades de césped: elefante (*Pennisetum* sp) y King (*Pennisetum hybridum*) (Cardona *et al.*, 2013); la reacción se llevó a cabo de la siguiente manera: 30 FPU g⁻¹ de biomasa de Accellerase 1500, 50 °C, agitación a 180 rpm, pH 4.8 y 11 % (p/v) de césped. Las concentraciones máximas de AF fueron de 515.6 y 563.3 mg g⁻¹ de biomasa para césped elefante y césped King respectivamente. Las variables con mayor influencia en el proceso de hidrólisis fueron la accesibilidad del sustrato al ataque enzimático, la temperatura y la cantidad de sustrato utilizada; que en este trabajo fue similar a la utilizada en los estudios mencionados (Dewi *et al.*, 2019; Patil *et al.*, 2019).

3.5 Hidrólisis enzimática asistida por ultrasonido

Los resultados obtenidos de la hidrólisis asistida por ultrasonido se presentan en la Fig. 11. Se puede observar un aumento en la liberación de AF a medida que aumenta el tiempo de reacción. Sin embargo, la mayor concentración de obtuvo a los 75 minutos, y a partir de los 90 minutos en adelante, la concentración de AF se mantuvo constante. Además, el uso del ultrasonido mostró un aumento significativo y una reducción en la concentración y el tiempo requerido para la liberación de AF, en comparación con el enfoque convencional. Estos resultados se atribuyen al efecto de cavitación de las ondas ultrasónicas, que genera fuerzas de corte elevadas que rompen los conglomerados de partículas, dispersándolos en partículas individuales y facilitando la acción de las enzimas sobre el sustrato (Dewi *et al.*, 2019). El rendimiento fue mayor en comparación con el obtenido con el enfoque convencional (Fig. 11), esto podría atribuirse a la asistencia del ultrasonido.

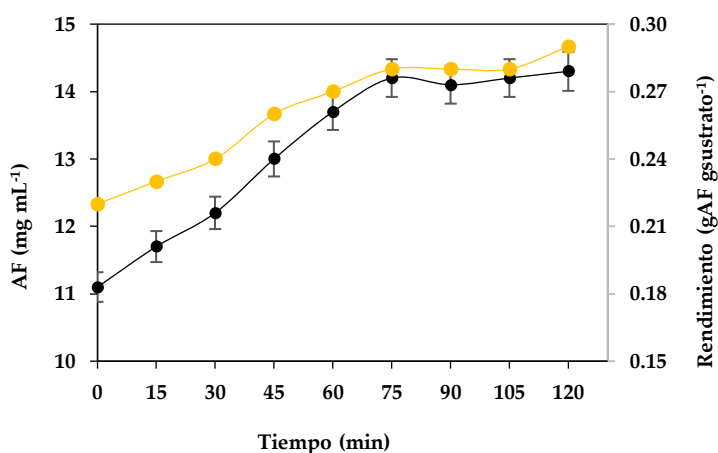


Figura 11. AF obtenidos durante la hidrólisis enzimática asistida por ultrasonido y la productividad del sistema de RA pretratado.

Figure 11. FS obtained during ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis and system productivity of AS pretrated.

En estudios centrados en la obtención de AF en el proceso de sacarificación, Huang *et al.* (2020) obtuvieron un concentrado de glucosa de 3.1 mg mL^{-1} en 24 horas utilizando corontas de maíz y celulasa comercial. Mencionan que el sustrato pretratado con ultrasonido produjo un rendimiento de glucosa más alto (45.5-52.1 %) en comparación con el sustrato no tratado (19.9 %). De manera similar, Lunelli *et al.*, (2014) utilizaron bagazo de caña de azúcar y obtuvieron un rendimiento de $0.26 \text{ gAF g de sustrato}^{-1}$. Por otro lado, Subhedar *et al.* (2018) investigaron las condiciones óptimas para obtener AF a partir cáscaras de cacahuete, fibra de coco y cáscaras de pistacho; el rendimiento fue de 10.2, 12.1 y 8.1 mg mL^{-1} , respectivamente. Reportaron en su estudio que el ultrasonido mejoró la actividad catalítica y redujo la barrera de difusión que rodea al sustrato, lo que lleva a un aumento de las tasas de reacción de hidrólisis (Subhedar *et al.*, 2018). Las condiciones utilizadas en su investigación (temperatura, potencia, ciclo de trabajo) fueron similares a las de este estudio. Gasparotto *et al.*, (2015), por otro lado, probó que el uso bagazo de caña de azúcar y una celulasa comercial aplicando ultrasonido mejoró la hidrólisis enzimática, dando como resultado 89.37 % más AF que con el sustrato no sonificado. En otro estudio con bagazo de caña de azúcar (Meléndez-Hernández *et al.*, 2016) en el que trabajaron bajo condiciones óptimas obtuvieron un rendimiento del 62.69 % y una concentración de AF de 24.99 mg mL^{-1} . En general, con la hidrólisis enzimática asistida con ultrasonido, las concentraciones de AF fueron mayores en comparación con la hidrólisis convencional, junto con una reducción significativa en el tiempo de reacción.

4. Conclusiones

Los mejores resultados se obtuvieron con pretratamientos asistidos por ultrasonido. El proceso de deslignificación se ve favorecido por la asistencia del ultrasonido. No se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de AF obtenidas con los métodos físicos (rastrojo + agua asistido por ultrasonido) y el método combinado (NaOH 3.5 N + US) ($P \leq 0.05$). Los espectros FTIR demostraron que la modificación estructural de la lignina y de compuestos con enlaces β -glucosídicos fueron observados con el método físico (US II A) y el método combinado (NaOH 3.5 N + US), obteniéndose el mayor porcentaje de modificación estructural con este último. Sin embargo, es importante especificar que, desde una perspectiva ecológica y económica, el método apropiado para el rastro de amaranto es el método físico US II A (RA + agua + ultrasonido). Basándonos en los resultados obtenidos en el proceso de sacarificación, se sugiere utilizar la hidrólisis enzimática asistida por ultrasonido en futuros estudios para la sacarificación del rastroy de amaranto pretratado.

Contribuciones de los autores

Conceptualización, M.J.G.G.; investigación, D.Y.C.V.; recursos, M.J.G.G., O.N.G., C.N.H. y J.C.A.; redacción-redacción del borrador original, M.J.G.G.; redacción-revisión y edición, O.N.G., C.N.H. y J.C.A.; visualización, M.J.G.G., O.N.G., C.N.H. y J.C.A.; supervisión, M.J.G.G.; administración del proyecto, M.J.G.G.; obtención de financiación, M.J.G.G. Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito.

Agradecimientos

Chávez-Valerio, D. Y. agradece la beca de Maestría de CONAHCyT (942292). Proyecto financiado por CONAHCyT convocatoria Ciencia Básica y de Frontera 2023-2024 (CBF2023-2024-4368).

Conflicto de interés

Los autores declaran que no existen conflictos de interés para la publicación de estos resultados.

Nomenclatura

AF	Azúcares fermentables
RA	Rastrojo de amaranto
bs	base seca
DNS	Ácido dinitrosalicílico
NaOH	Hidróxido de sodio
N	Concentración Normal
FTIR	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier
CO ₂	Dióxido de carbono
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
Ca(OH) ₂	Hidróxido de calcio
KOH	Hidróxido de potasio
p/v	Relación peso volumen
p/p	Relación peso peso
rpm	Revoluciones por minuto
FDN	fibra detergente neutra
FDA	fibra detergente ácida
CH ₃	grupo metilo
US	ultrasonido
M	Concentración molar
AS	Amaranth stubble

5. Referencias

- Araújo, D., Vilarinho, M., & Machado, A. (2019). Effect of combined dilute-alkaline and green pretreatments on corncob fractionation: Pretreated biomass characterization and regenerated cellulose film production. *Industrial Crops and Products*, 141: 111785. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111785>
- Arce, M. B. (2011). Obtención de compuestos biofuncionales a partir del material lignocelulósico de *Amaranthus hypochondriacus* L. (Tesis de Maestría, Universidad de Autónoma Metropolitana). <https://doi.org/10.24275/uami.2b88qc43c>

- Arias-Giraldo, S., & López-Velasco, D. M. (2019). Reacciones químicas de los azúcares simples empleados en la industria alimentaria. *Lámpsakos*, 22: 123–136. <https://doi.org/10.21501/21454086.3252>
- Bressani, R. (1989). The proteins of grain amaranth. *Food Reviews International*, 5(1), 13–38. <https://doi.org/10.1080/87559128909540843>
- Cardona, E. M., Rios, J. A., Peña, J. D., & Rios, L. A. (2013). Pretratamiento Alcalino de Pasto Elefante (*Pennisetum* sp) y King Grass (*Pennisetum hybridum*) Cultivados en Colombia para la Producción de Bioetanol. *Información Tecnológica*, 24(5): 69–80. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642013000500009>
- Chen, Y., Jiang, S., Yuan, H., Zhou, Q., & Gu, G. (2007). Hydrolysis and acidification of waste activated sludge at different pHs. *Water Research*, 41(3): 683–689. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.07.030>
- Chu, Q., Wang, R., Tong, W., Jin, Y., Hu, J., & Song, K. (2020). Improving Enzymatic Saccharification and Ethanol Production from Hardwood by Deacetylation and Steam Pretreatment: Insight into Mitigating Lignin Inhibition. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(49): 17967–17978. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c05583>
- Cruz-Cardona, Y., Cadena-Chamorro, E., & Arango-Tobón, J. C. (2019). Procesamiento de la Cascarrilla de Cebada Cervecera por Vía Enzimática para la Obtención de AF. *Información Tecnológica*, 30(4): 41–50. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642019000400041>
- Dewi, R.-K., Hudha, M. I., Rauda, A., & Taulusia, S. (2019). Chemical and Physical Process Combinations: Microwave in Lignin Degradation of Pecan Shells as Alternative Fuel Raw Materials. *Atlantis Highlights in Chemistry and Pharmaceutical Sciences*, 1: 63–67. <https://www.atlantis-press.com/article/125929209>
- García-Pereyra, J., Valdés-Lozano, C., Olivares-Saenz, E., Alvarado-Gómez, O., Alejandre-Iturbide, G., Salazar-Sosa, E., & Medrano-Roldán, H. (2009). Rendimiento de grano y calidad del forraje de amaranto (*Amaranthus* spp.) cultivado a diferentes densidades en el noreste de México. *Phyton (B. Aires)*, 78(1): 53–60. https://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-56572009000100010
- García-Pérez, J. V. (2007). Contribución al estudio de la aplicación de ultrasonidos de potencia en el secado convectivo de alimentos. (Tesis doctoral) Universitat Politècnica de València. <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/1890>
- Gasparotto, J. M., Werle, L. B., Mainardi, M. A., Foletto, E. L., Kuhn, R. C., Jahn, S. L., & Mazutti, M. A. (2015). Ultrasound-assisted hydrolysis of sugarcane bagasse using cellulolytic enzymes by direct and indirect sonication. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(4): 480–485. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.07.006>
- Ghaffar, S. H., & Fan, M. (2013). Structural analysis for lignin characteristics in biomass straw. *Biomass and Bioenergy*, 5: 264–279. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.07.015>
- Gómez, E. A., Ríos, L. A. & Peña, J. D. (2013). Effect of Pretreatment of Woody Biomass on Ethanol Yield. *Información tecnológica*, 24(5): 113-122. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642013000500013>
- Gong, Z., Wang, X., Yuan, W., Wang, Y., Zhou, W., Wang, G., & Liu, Y. (2020). Fed-batch enzymatic hydrolysis of alkaline organosolv-pretreated corn stover facilitating high concentrations and yields of fermentable sugars for microbial lipid production. *Biotechnology for Biofuels*, 13: 13. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1639-9>
- Haldar, D., & Purkait, M. K. (2021). A review on the environment-friendly emerging techniques for pretreatment of lignocellulosic biomass: Mechanistic insight and advancements. *Chemosphere*, 264(Part 2): 128523. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128523>

- Harmsen, PFH, Huijgen, W, Bermudez, L & Bakker, R. (2010). Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass. *Report / Wageningen UR, Food & Biobased Research*, no. 1184, Wageningen UR Food & Biobased Research, Wageningen. <https://edepot.wur.nl/150289>
- Hernández-Beltrán, J. U., Hernández-De Lira, I. O., Cruz-Santos, M. M., Saucedo-Luevanos, A., Hernández-Terán, F., & Balagurusamy, N. (2019). Insight into Pretreatment Methods of Lignocellulosic Biomass to Increase Biogas Yield: Current State, Challenges, and Opportunities. *Applied Sciences*, 9(18): 3721. <https://doi.org/10.3390/app9183721>
- Huang, J., Khan, M. T., Perecin, D., Coelho, S. T., & Zhang, M. (2020). Sugarcane for bioethanol production: Potential of bagasse in Chinese perspective. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 133: 110296. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110296>
- Jiang, L., Wu, Y., Wu, N., Zhong, H., Zhang, Y., Zhao, Z., Li, H., & Zhang, F. (2020). Selective saccharification of microwave-assisted glycerol pretreated corncobs via fast pyrolysis and enzymatic hydrolysis. *Fuel*, 265: 116965. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.116965>
- Lunelli, F. C., Sfalcin, P., Souza, M., Zimmermann, E., Dal Prá, V., Foletto, E. L., Jahn, S. L., Kuhn, R. C., & Mazutti, M. A. (2014). Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for the production of fermentable sugars. *Biosystems Engineering*, 124: 24–28. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2014.06.004>
- 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(Part B): 1461–1467. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.149>
- Madadi, M., Wang, Y., Zhang, R., Hu, Z., Gao, H., Dan Zhan, Yu, H., Yang, Q., Wang, Y., Tu, Y., Xia, T., & Peng, L. (2022). Integrating mild chemical pretreatments with endogenous protein supplement for complete biomass saccharification to maximize bioethanol production by enhancing cellulases adsorption in novel bioenergy Amaranthus. *Industrial Crops and Products*, 177: 114471. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114471>
- Marx, S., Xaba, N., & Chiyanzu, I. (2014). Amaranth lignocellulose as feedstock for bioethanol production: effect of microwave assisted alkaline pretreatment on reducing sugar yield. 22nd European Biomass Conference and Exhibition, 896–900. https://repository.nwu.ac.za/bitstream/handle/10394/16671/Amaranth_lignocellulose_as_feedstock.pdf?sequence=2
- Meléndez-Hernández, P. A., Hernández-Beltrán, J. U., Hernández-Escoto, H., & Morales-Rodríguez, R. (2016). Análisis del Pretratamiento de Residuos Lignocelulósicos para La Producción de Biocombustibles y Bioproductos de Alto Valor Agregado. *Jóvenes En La Ciencia*, 2(1): 508–512. <https://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/1094/727>
- Méndez-Arango, M. F., López-Sosa, D., Núñez-Gaona, O., & García-Gómez, M. de J. (2019). Evaluación del crecimiento radial sobre forraje de amaranto de hongos filamentosos aislados de hojas de café. *Mexican Journal of Biotechnology*, 4(2): 47–59. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2019.4.2.47>
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3): 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Modenbach, A. A., & Nokes, S. E. (2014). Effects of Sodium Hydroxide Pretreatment on Structural Components of Biomass. *Transactions of the ASABE*, 57(4): 1187–1198. <https://doi.org/10.13031/trans.57.10046>
- Mohapatra, S., Dandapat, S. J., & 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. *Journal of Environmental Management*, 187: 537–549. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.09.060>
- Nagula, K. N. & Pandit, A. B. (2016). Process intensification of delignification and enzymatic hydrolysis of delignified cellulosic biomass using various process intensification techniques including cavitation. *Bioresource Technology*, 213: 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.152>
- Nolasco-Hipólito, C., Ramírez-Isidro, O., Núñez-Gaona, O., Ávila-Alejandre, A. X., Hernández-López, A., & García-Gómez, M. de J. (2022). Antioxidant activity of peptides obtained by enzymatic hydrolysis from proteins of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) stubble. *Agrociencia* 56(3): 434–450. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v56i3.2800>
- Patil, R. S., Joshi, S. M., & Gogate, P. R. (2019). Intensification of delignification of sawdust and subsequent enzymatic hydrolysis using ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 58: 104656. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104656>
- Písaříková, B., Peterka, J., Trčková, M., Moudrý, J., Zralý, Z., & Herzig, I. (2006). Chemical Composition of the Above-ground Biomass of *Amaranthus cruentus* and *A. hypochondriacus*. *Acta Veterinaria Brno*, 75(1): 133–138. <https://doi.org/10.2754/avb200675010133>
- Qing, Q., Guo, Q., Zhou, L., Gao, X., Lu, X., & Zhang, Y. (2017). Comparison of alkaline and acid pretreatments for enzymatic hydrolysis of soybean hull and soybean straw to produce fermentable sugars. *Industrial Crops and Products*, 109: 391–397. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.051>
- Reales, J. G., Castaño, H. I., Zapata, J. E. (2016). Evaluación de Tres Métodos de Pretratamiento Químico sobre la Deslignificación de Tallos de Yuca. *Información Tecnológica*, 27 (3): 11–22. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642016000300003>
- Secretaría de Economía [SE]. (2013). NMX-F-607-NORMEX-2013. Alimentos-determinación de cenizas en alimentos-método de prueba. Ciudad de México: SE. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5311757&fecha=27/08/2013#gsc.tab=0
- Secretaría de Economía [SE]. (2012). NOM-155-SCFI-2012. Leche-Denominaciones, especificaciones físicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. Ciudad de México: SE. <https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/4692/seeco/seeco.htm>
- Secretaría de Salud [SSA]. (1994). NOM-116-SSA1-1994. Determinación de humedad en alimentos por tratamiento térmico. Ciudad de México: SSA. https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4728942&fecha=15/08/1994#gsc.tab=0
- Secretaría de Salud [SSA]. (1994). NOM-086-SSA1-1994. Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales. Ciudad de México: SSA. https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4890075&fecha=26/06/1996#gsc.tab=0
- Shah, J. J., & Mohanraj, K. (2014). Comparison of Conventional and Microwave-assisted Synthesis of Benzotriazole Derivatives. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 76(1): 46–53. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4007255/>
- Subhedar, P. B., & Gogate, P. R. (2016). Use of Ultrasound for Pretreatment of Biomass and Subsequent Hydrolysis and Fermentation. In Solange I. Mussatto (Eds) *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery* (pp. 127–149). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802323-5.00006-2>
- Subhedar, P. B., Ray, P., & Gogate, P. R. (2018). Intensification of delignification and subsequent hydrolysis for the fermentable sugar production from lignocellulosic biomass using ultrasonic irradiation. *Ultrasonics Sonochemistry*, 40(Part B): 140–150. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.01.030>

- Torres da Silva, G., Chiarello, L. M., Lima, E. M., Ramos, L. P. (2016). Sono-assisted alkaline pretreatment of sugarcane bagasse for cellulosic ethanol production. *Catalysis Today*, 269: 21-28. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2015.11.023>
- Vargas-Radillo, J. J., Salazar-Ríos, E., Barrientos-Ramírez, L., Pérez-Centeno, A., Rentería-Urquiza, M., Rodríguez-Rivas, A., Navarro-Arzate, F., & Rutiaga-Quñones, J. (2016). Pasta blanqueada y AF a partir de médula de bagazo de caña. *Madera y Bosques*, 21(2): 117-130. <https://doi.org/10.21829/myb.2015.212449>
- Wang, S., Li, F., Zhang, P., Jin, S., Tao, X., Tang, X., Ye, J., Nabi, M. & Wang, H. (2017). Ultrasound assisted alkaline pretreatment to enhance enzymatic saccharification of grass clipping. *Energy Conversion and Management*. 149: 409–415. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2017.07.042>
- Wu, H., Dai, X., Zhou, S.-L., Gan, Y.-Y., Xiong, Z.-Y., Qin, Y.-H., Ma, J., Yang, L., Wu, Z.-K., Wang, T.-L., Wang, W.-G., & Wang, C.-W. (2017). Ultrasound-assisted alkaline pretreatment for enhancing the enzymatic hydrolysis of rice straw by using the heat energy dissipated from ultrasonication. *Bioresource Technology*, 241: 70–74. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.090>
- Xu, J., & Cheng, J. J. (2011). Pretreatment of switchgrass for sugar production with the combination of sodium hydroxide and lime. *Bioresource Technology*, 102(4): 3861–3868. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.038>
- Yadav, A., Sharma, V., Tsai, M.-L., Chen, C.-W., Sun, P.-P., Nargotra, P., Wang, J.-X., & Dong, C.-D. (2023). Development of lignocellulosic biorefineries for the sustainable production of biofuels: Towards circular bioeconomy. *Bioresource Technology*, 381: 129145. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129145>

2025 TECNOCENCIA CHIHUAHUA.

Esta obra está bajo la Licencia Creative Commons Atribución No Comercial 4.0 Internacional.



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>