



TECNOLÓGICO DE ESTUDIOS SUPERIORES DE ECATEPEC

**Caracterización de la hidrólisis química y enzimática del  
muérdago y amaranto para la obtención de azúcares fermentables  
utilizados para producir bioetanol.**

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
Maestría en Eficiencia Energética y Energías Renovables

PRESENTA: I.Q. Ana Maria Garcia Granobles

Directora de tesis: Dra. Maria Belem Arce Vazquez

Codirector de tesis: Dr. Jorge Soriano Santos

Asesor: Dr. Agustín Mora Ortega

ECATEPEC, ESTADO DE MEXICO DICIEMBRE 2020



GOBIERNO DEL  
ESTADO DE MÉXICO

DICTAMEN DE LIBERACIÓN DE PROYECTO  
DE TESIS

**FO-TESE-DA-90**

TIT05-ANEXO PM



DIRECCIÓN ACADÉMICA  
DIVISIÓN DE INGENIERÍA MECÁNICA, MECATRÓNICA E INDUSTRIAL  
MAESTRÍA EN EFICIENCIA ENERGÉTICA Y ENERGÍAS RENOVABLES

Fecha: 01 DE DICIEMBRE DEL 2020

Datos generales

Nombre de la alumna:

GARCIA

GRANOBLES

ANA MARIA

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre(s)

Matrícula: 201821412

PROYECTO: CARACTERIZACIÓN DE LA HIDRÓLISIS QUÍMICA Y ENZIMÁTICA DEL MUÉRDAGO Y AMARANTO PARA LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES UTILIZADOS PARA PRODUCIR BIOETANOL.

DIRECTORES: DRA. MARIA BELEM ARCE VAZQUEZ Y DR. JORGE SORIANO SANTOS

Dictamen:

Con base en el registro No. POSG-MPEERIDMMI/2020/05 correspondiente al periodo escolar 2020-2, asignado al proyecto de tesis: CARACTERIZACIÓN DE LA HIDRÓLISIS QUÍMICA Y ENZIMÁTICA DEL MUÉRDAGO Y AMARANTO PARA LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES UTILIZADOS PARA PRODUCIR BIOETANOL, y presentado por la alumna referida; y después de haber sido desarrolladas las actividades requeridas, el Comité Tutorial, conformado por los integrantes que firman al calce, ha determinado que SI (X) NO ( ) han sido cubiertos en su totalidad los requisitos que permitan a esta División Académica liberar al alumno de los trámites académicos para tal efecto e iniciar el trámite de obtención de grado de maestría en la Unidad de Registro y Certificación de este Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec.

Observaciones:

NINGUNA

Comité tutorial

DRA. MARIA BELEM ARCE VAZQUEZ

DR. JORGE SORIANO SANTOS

DR. AGUSTIN MORA ORTEGA

M. EN C. WENCESLAO CUAUHTEMOC BONILLA BLANCA

|  |   |   |
|--|---|---|
| Elaboró:   | Revisó y Visto Bueno:                                     | Enterado:   |
| <br>DR. AGUSTIN MORA ORTEGA<br>Coordinador de Posgrado | <br>M. EN C. HÉCTOR RODRIGUEZ CARMONA<br>Jefe de División | <br>M. EN C. ARMANDO ALCALDE MARTÍNEZ<br>Director Académico |

TECNOLÓGICO DE ESTUDIOS SUPERIORES DE ECATEPEC  
POSGRADO EN EFICIENCIA ENERGÉTICA Y ENERGÍAS RENOVABLES

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En el Estado de México, el día 14 del mes de diciembre del año 2020, el (la) que suscribe Ana Maria Garcia Granobles, alumno (a) del Programa de Maestría en Eficiencia Energética y Energías Renovables con número de matrícula 201821412 adscrito a la División de Ingeniería Mecatrónica e Industrial, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis bajo la dirección del (la) Dra. Maria Belem Arce Vazquez y el Dr. Jorge Soriano Santos y ceden los derechos del trabajo intitulado "Caracterización de la hidrólisis química y enzimática del muérdago y amaranto para la obtención de azúcares fermentables utilizados para producir bioetanol" al Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, graficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y del director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: anamaria1318@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



Ana Maria Garcia Granobles

## **AGRADECIMIENTO**

Primeramente, a Dios por demostrarme que siempre está ahí abriéndome caminos y permitiéndome conocer a personas maravillosas.

Al Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec (TESE) y al Posgrado en Eficiencia Energética y Energías Renovables por la oportunidad brindada para realizar mis estudios de posgrado en esta institución.

A la Dra. Maria Belem Arce Vazquez directora de mi tesis por permitirme trabajar con ella, por su orientación y acompañamiento en esta etapa y por enseñarme que con la perseverancia y dedicación se pueden lograr grandes proyectos. Al Dr. Jorge Soriano Santos por ser mi codirector, por su tiempo, contribuciones y orientación durante el desarrollo de este trabajo.

A mis amigos Fernanda, Carlos y Lalo, a mis compañeros y maestros de la Maestría en Eficiencia Energética y Energías Renovables por compartir conmigo el reto que implicó sacar adelante este posgrado, por apoyarme y acogerme en este hermoso país.

A mis padres Angel Maver y Maria Antonia por apoyarme en cada aventura emprendida por enseñarme los valores y habilidades que hoy poseo, a mi esposo por acompañarme siempre y a mi maravilloso hijo por ser la luz de mis días. A toda mi familia, los amo.

A CONACYT por su apoyo a través de la beca No.934017

## DEDICATORIA

*A mis padres, Angel Maver y Maria Antonia por darme todo sin esperar nada a cambio, por estar siempre conmigo a pesar de la distancia*

## CONTENIDO

|   |    |
|---|----|
| Resumen .....   | 8  |
| Abstract .....  | 13 |
| Nomenclatura .....  | 15 |
| Introducción .....  | 15 |
| Problemática.....   | 17 |
| 1. Marco referencial.....   | 18 |
| 1.1 Combustibles.....   | 18 |
| 1.1.1 Panorama de los biocombustibles .....                                     | 18 |
| 1.1.2 Combustibles alternativos .....   | 20 |
| 1.2 Bioetanol .....   | 21 |
| 1.3 Fuentes de biomasa para la producción de bioetanol .....                    | 22 |
| 1.3.1 Almidón .....   | 22 |
| 1.3.2 Azúcares .....  | 23 |
| 1.3.3 Biomasa lignocelulósica .....   | 23 |
| 1.3.4 Amaranto ( <i>Amaranthus hypochondriacus</i> ) .....                      | 26 |
| 1.3.5 Muérdago ( <i>Cladocolea loniceroides</i> ).....                          | 27 |
| 1.4 Proceso de producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica..... | 29 |
| 1.4.1 Pretratamientos lignocelulósicos .....                                    | 29 |
| 1.4.2 Hidrólisis de la biomasa .....  | 31 |
| 1.4.3 Fermentación alcohólica .....   | 32 |
| 2. Antecedentes .....   | 33 |
| 3. Justificación.....   | 34 |
| 4. Hipótesis.....   | 35 |
| 5. Objetivos .....  | 36 |
| 5.1 Objetivo general .....  | 36 |
| 5.2 Objetivos específicos .....   | 36 |
| 6. Metodología.....   | 37 |
| 6.1 Materiales.....   | 38 |
| 6.2 Acondicionamiento .....   | 38 |
| 6.3 Pre-tratamiento.....  | 38 |

|  |    |
|--|----|
| 6.4 Hidrólisis ácida .....                         | 38 |
| 6.5 Análisis estadístico .....                     | 39 |
| 6.6 Hidrólisis enzimática .....                    | 39 |
| 6.7 Cuantificación de azúcares .....               | 39 |
| 6.8 Fermentación alcohólica.....                   | 40 |
| 6.9 parámetros de fermentación.....                | 40 |
| Cuantificación de Biomasa .....                    | 40 |
| Cuantificación de etanol .....                     | 40 |
| 7. Resultados y discusión.....                     | 42 |
| 7.1 Rendimientos del material lignocelulósico..... | 42 |
| 7.2 Hidrólisis ácida .....                         | 45 |
| 7.3 Análisis estadístico .....                     | 48 |
| 7.4 Hidrólisis enzimática.....                     | 53 |
| 7.4 Fermentación alcohólica.....                   | 56 |
| 8. Conclusiones .....                              | 60 |
| Trabajo a futuro .....                             | 61 |
| 9. Referencias bibliográficas .....                | 62 |
| Anexos.....  | 68 |

## ÍNDICE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Producción mundial de etanol.....   | 19 |
| Figura 2. Estructura de la pared celular de una planta.....   | 24 |
| Figura 3. Composición química del material lignocelulósico de distintas partes de la planta de amaranto Fuente Arce, 2011. .... | 27 |
| figura 4. Producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica .....   | 29 |
| Figura 5. a) Amaranto ( <i>amaranthus hypochondriacus</i> ) y b) Muérdago ( <i>cladocolea loniceroides</i> ).....               | 38 |
| figura 6. Rendimientos del tallo de amaranto después del acondicionamiento y pretratamiento .....                               | 42 |
| Figura 7. Rendimientos de la hoja de amaranto después del acondicionamiento y pretratamiento. ....                              | 43 |
| Figura 8. Rendimientos del rastrojo de amaranto después del acondicionamiento y pretratamiento. ....                            | 43 |
| Figura 9. Rendimientos de tallo de muérdago después del acondicionamiento y pretratamiento. ....                                | 44 |
| Figura 10. Rendimientos de la hoja de muérdago después del acondicionamiento y pretratamiento. ....                             | 44 |
| Figura 11. Cuantificación de azúcares reductores del tallo de amaranto .....  | 45 |
| Figura 12. Cuantificación de azúcares reductores de la hoja del amaranto .....  | 45 |
| Figura 13. Cuantificación de azúcares reductores del rastrojo de amaranto....   | 46 |
| Figura 14. Cuantificación de azúcares reductores para el tallo de muérdago... ..  | 46 |
| Figura 15. Cuantificación de azúcares reductores para la hoja de muérdago.. ..  | 47 |
| Figura 16. Cuantificación de azúcares reductores en el fruto del muérdago....   | 47 |
| Figura 17. Diagrama de Pareto del tallo de amaranto.....  | 49 |
| Figura 18. Contornos de la superficie de optimización para el tallo de amaranto. ....   | 49 |
| Figura 19. Diagrama de Pareto de la hoja de amaranto.....   | 50 |
| Figura 20. Contornos de superficie de Optimización de la hoja de amaranto. .  | 50 |
| Figura 21. Diagrama de Pareto del Rastrojo de Amaranto.....   | 50 |
| Figura 22. Contornos de superficie de optimización para el rastrojo de amaranto .....   | 51 |
| Figura 23. Diagrama de Pareto para el tallo de muérdago.....  | 51 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 24. Contornos de superficie de optimización del tallo de muérdago .....  | 52 |
| Figura 25. Diagrama de Pareto para la hoja de muérdago .....  | 52 |
| Figura 26. Contornos de superficie de optimización de la hoja de muérdago. .  | 52 |
| Figura 27. Diagrama de Pareto para el fruto del muérdago. ....  | 53 |
| Figura 28. Contornos de superficie de optimización para fruto de muérdago. .  | 53 |
| Figura 29. Producción de azúcares reductores durante la hidrólisis enzimática de tallo de muérdago y rastrojo de amaranto con el primer tratamiento enzimático: Endo 1-4-β-D-glucanosa + cellobiohydrolasa + hemicelulasa + pectinasa. .... | 54 |
| Figura 30. Producción de azúcares reductores durante la hidrólisis enzimática de tallo de muérdago y rastrojo de amaranto con el segundo tratamiento enzimático Driselase™ .....  | 55 |
| figura 31. Biomasa y consumo de azúcares reductores de <i>S. Cerevisiae</i> durante la fermentación de hidrolizados ácidos del rastrojo de amaranto.....  | 56 |
| Figura 32. Biomasa y consumo de azúcares reductores de <i>S. Cerevisiae</i> durante la fermentación de hidrolizados ácidos de tallo de muérdago.....  | 57 |
| Figura 33. Biomasa y consumo de azúcares reductores de <i>S. Cerevisiae</i> durante la fermentación de hidrolizados enzimáticos del rastrojo de amaranto. ....  | 57 |
| Figura 34. Biomasa y consumo de azúcares reductores de <i>S. Cerevisiae</i> durante la fermentación de hidrolizados enzimáticos de tallo de muérdago. ....  | 58 |
| Figura 35. Producción de etanol para los hidrolizados ácidos y enzimáticos del rastrojo de amaranto y tallo de muérdago.....  | 59 |

## INDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1. Clasificación de los biocombustibles por su generación.....   | 20 |
| Tabla 2. Análisis químico proximal del Muérdago Cladocolea Ioniceroides .....  | 28 |
| Tabla 3. Pretratamientos lignocelulósicos .....  | 29 |
| Tabla 4. Rendimientos del material lignocelulósico del amaranto y el muérdago durante la obtención de harinas. ....                                  | 42 |
| Tabla 5. Modelos matemáticos de la biomasa lignocelulósica estudiada.....  | 48 |
| Tabla 6. Parámetros cinéticos de fermentación calculados para rastrojo de amaranto y tallo de muérdago utilizando la cepa <i>S. cerevisiae</i> ..... | 59 |

## Resumen

En la búsqueda de fuentes alternas renovables, la biomasa lignocelulósica es una materia prima que se perfila para la producción de biocombustibles. Diversos autores han realizado pretratamientos, hidrólisis química e hidrólisis enzimática sobre la biomasa lignocelulósica con la finalidad de liberar azúcares fermentables. La biomasa de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L) y muérdago (*Cladocolea loniceroides*), son una alternativa atractiva debido a que la primer biomasa se puede obtener como rastrojo derivado del cultivo de semilla de amaranto y llega a producirse hasta 542.200 Ton/año, es preciso mencionar, que este residuo no tiene ninguna aplicación industrial hasta el momento, por otro lado, al utilizar la biomasa de muérdago, quien es una planta parásita, puede eliminarse de los arboles que están infectados en Xochimilco, Ciudad de México, específicamente la zona chinampera, que ha sido declarado patrimonio cultural de la humanidad. En el presente trabajo se tuvo por objeto evaluar el rendimiento de azúcares liberados por la hidrólisis química y enzimática del amaranto *Amaranthus hypochondriacus* y muérdago *Cladocolea loniceroides* para la obtención de bioetanol. Las muestras de los materiales lignocelulósicos se recolectaron en las zonas de Santiago de Tulyehualco y de la chinampera de Xochimilco, respectivamente. Las muestras fueron limpiadas y secadas al aire libre, de las que posteriormente se obtuvieron harinas mediante la molienda y el tamizado con malla de 420 micrones. Posteriormente, se realizó un pretratamiento de deslignificación con NaOH 1N y CaSO<sub>4</sub> durante 15min, del cual se obtuvieron dos fracciones: fracción sólida (FS) y fracción líquida (FL). presentando un rendimiento total de 23.3 hasta 51.1%. Para el proceso de sacarificación se realizó una hidrólisis ácida con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5%, variando las temperaturas (70, 90 y 110°C) y tiempos (60, 90, 110, 150 y 210 min) de hidrólisis, se obtuvo que a una temperatura de 90°C, durante 150 min. para el rastrojo de amaranto se liberaron 14.1±0.36 g de glucosa/ gramo de harina y con las condiciones de operación a una temperatura de 90°C, durante tiempo de 210min. para el tallo de muérdago se liberaron 10.79±0.21 g de glucosa/g de harina. Se realizo la hidrólisis enzimática usando como sustrato rastrojo de amaranto y tallo de muérdago con un pH 5.0 y buffer de acetatos comparando dos tratamientos enzimáticos; con el primer tratamiento enzimático se emplearon las enzimas por separadas endo-1-4-β-D-glucanosa, cellobiohidrolasa, a 45°C por un tiempo de 4h posteriormente se agregó hemicelulasa y celulasa a 37°C en agitación constante a 150 rpm donde se obtuvo hasta 30.88 ±0.35 g de G/g para el rastrojo de amaranto y 21.27±0.32 g de G/g para el tallo de muérdago. para el segundo tratamiento se utilizó el coctel comercial de enzimas Driselase™ en agitación a 150 rpm a una temperatura de 50°C, y un tiempo de 10h donde se obtuvo menor cantidad hasta 19.66 ± 0.29 g de G/ g para el rastrojo de amaranto y 17.01 ±0.74 g de G/g para el tallo de muérdago. para los dos tratamientos se utilizo la misma concentración 1g de muestra 100μL de las

enzimas. Posteriormente se realizó la fermentación de los hidrolizados ácidos y enzimáticos del rastrojo de amaranto y tallo de muérdago con la levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* a 30°C por 30h donde se obtuvo una producción de biomasa de 13 hasta 18.9 g/L para rastrojo de amaranto y de 9 a 11 g/L para tallo de muérdago. También se cuantificó el consumo de azúcares reductores. para todas las muestras la cantidad de sustrato se igualó a 170g/L, el rastrojo de amaranto presentó un consumo de hasta 91.76% y el tallo de muérdago su consumo fue de hasta 52.35%. se evaluó la producción de etanol, donde se logró producir de  $18 \pm 0.45$  hasta  $42 \pm 0.18$  g/L de etanol, la eficiencia de la fermentación obteniendo valores de  $0.38 \pm 0.79$  hasta  $0.89 \pm 0.52$  g de etanol/ g de glucosa, el rendimiento biomasa-sustrato fue de  $0.080 \pm 0.53$  a  $0.224 \pm 0.48$  g de biomasa/g de azúcares reductores consumidos y el rendimiento producto-sustrato de  $0.22 \pm 0.47$  a  $0.371 \pm 0.68$  g de etanol/g de azúcares consumidos. Concluyendo que el material lignocelulósico estudiado puede ser utilizado en la producción de biocombustibles.

## Abstract

In the search for alternative renewable sources, lignocellulosic biomass is a raw material that is emerging for the production of biofuels. Several authors have carried out pre-treatments, chemical hydrolysis and enzymatic hydrolysis on lignocellulosic biomass with the aim of releasing fermentable sugars. Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L) and mistletoe (*Cladocolea loniceroides*) biomass are an attractive alternative because the first biomass can be obtained as stubble derived from amaranth seed cultivation and up to 542 can be produced. 200 Ton/year, it should be mentioned, that this residue has no industrial application so far, on the other hand, by using the mistletoe biomass, which is a parasite plant, can be eliminated from the trees that are infected in Xochimilco, Mexico City, specifically the chinampera area, which has been declared cultural heritage of humanity. The aim of this work was to evaluate the performance of sugars released by chemical and enzymatic hydrolysis of amaranth *Amaranthus hypochondriacus* and mistletoe *Cladocolea loniceroides* for bioethanol production. The samples of the lignocellulosic materials were collected in the areas of Santiago de Tulyehualco and Xochimilco chinampera, respectively. The samples were cleaned and dried in the open air, from which flours were later obtained through milling and sifting with 420-micron mesh. Later, a delignification pre-treatment with NaOH 1N and CaSO<sub>4</sub> was performed during 15 minutes, from which two fractions were obtained: solid fraction (FS) and liquid fraction (FL). presenting a total yield of 23.3 up to 51.1%. For the saccharification process, an acid hydrolysis with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at 5% was performed, varying the temperatures (70, 90 and 110°C) and times (60, 90, 110, 150 and 210 min) of hydrolysis, it was obtained that at a temperature of 90°C, during 150 min. for amaranth stubble 14.1±0.36 g of glucose/g of flour were released and with the operation conditions at a temperature of 90°C, during 210 min. for mistletoe stalk 10.79±0.21 g of glucose/g of flour were released. The enzymatic hydrolysis was carried out using as substrate amaranth stubble and mistletoe stem with a pH 5.0 and acetate buffer comparing two enzymatic treatments; with the first enzymatic treatment, enzymes were used by separated endo-1-4-β-D-glucanase, cellobiohydrolase, at 45°C for a time of 4h. Later, hemicellulase and cellulase were added at 37°C in constant agitation at 150 rpm where it was obtained up to 30.88 ±0.35 g of G/g for amaranth stubble and 21.27±0.32 g of G/g for mistletoe stem. For the second treatment, the commercial enzyme cocktail Driselase™ was used in agitation at 150 rpm at 50°C, and a time of 10h where less quantity was obtained up to 19.66 ± 0.29 g of G/g for amaranth stubble and 17.01 ±0.74 g of G/g for mistletoe stalk. For both treatments, the same concentration of 1g of 100μL sample of the enzymes was used. Afterwards, the amaranth stubble and mistletoe stem acid and enzymatic hydrolysates were fermented with the commercial *Saccharomyces cerevisiae* yeast at 30°C for 30h where a biomass production of 13 to 18.9 g/L for amaranth stubble and 9 to 11 g/L for mistletoe stem was obtained. It was also quantified the consumption of reducing sugars.

For all samples the amount of substrate was equal to 170 g/L, amaranth stubble presented a consumption of up to 91.76% and mistletoe stem consumption was up to 52.35%. 18 g/L of ethanol, the fermentation efficiency was obtained from  $0.38 \pm 0.79$  to  $0.89 \pm 0.52$  g of ethanol/g of glucose, the biomass-substrate yield was from  $0.080 \pm 0.53$  to  $0.224 \pm 0.48$  g of biomass/g of reducing sugars consumed and the product-substrate yield was from  $0.22 \pm 0.47$  to  $0.371 \pm 0.68$  g of ethanol/g of sugars consumed. In conclusion that the lignocellulosic material studied can be used in the production of biofuels.

## Nomenclatura

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| PEMEX                          | Petróleos Mexicanos   |
| SEGOB                          | Secretaria de Gobernación   |
| SENER                          | Secretaria de energía   |
| LPBD                           | Ley de Promoción y Desarrollo de los Bioenergéticos                           |
| MTBE                           | Éter metil terbutílico  |
| ML/a                           | Millones de Litros al año   |
| MBPD                           | Millones de Barriles por Día  |
| MJ/L                           | Mega Joule por Litro  |
| GJ                             | Gigajoules  |
| TJ                             | TeraJoule   |
| ton                            | Toneladas   |
| Ha                             | Hectárea  |
| OECD                           | Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico                    |
| IEA                            | Agencia Internacional de Energía  |
| SAGARPA                        | Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. |
| Lge                            | Litro de gasolina equivalente   |
| SARH                           | Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos                              |
| TAPPI                          | Technical Association Of the Pulp and Paper Industry                          |
| INERE                          | Inventario Nacional de Energias Renovables                                    |
| HQ                             | Hidrólisis Química  |
| HE                             | Hidrólisis Enzimática   |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | Ácido Sulfúrico   |
| NaOH                           | Hidróxido de Sodio  |
| CaSO <sub>4</sub>              | Sulfato de Calcio   |
| HCl                            | Ácido clorhídrico   |
| DNS                            | Ácido dinitrosalicílico   |
| g de G/g                       | gramo de glucosa por gramo de muestra   |

## Introducción

La creciente preocupación por suplir las demandas energéticas para cada sector de la economía debido al rápido desarrollo de las industrias, y a que estos sectores utilizan principalmente combustibles fósiles como el petróleo y sus derivados, gas natural y carbón mineral, a causa de la creciente incertidumbre de los suministros de petróleo por la disminución de las reservas conocidas, junto con los problemas de contaminación ambiental, la preocupación por el calentamiento global y las emisiones de gases de efecto invernadero asociadas con el uso de combustibles fósiles (Saini, J., Saini R., y Tewari, 2015), ha conducido al estudio de fuentes de energía alternas.

Fomentando la producción y el consumo de energías consideradas renovables, sostenibles y respetuosas con el medio ambiente, los biocombustibles, principalmente los de segunda generación, que pueden ser producidos a través de la biomasa lignocelulósica, la cual puede ser residuos agroindustriales.

Entre los combustibles alternativos, el bioetanol cuenta con una producción de más de 29 mil millones de galones en el 2019, el cual puede ser usado en lugar de la gasolina, o bien en mezcla con esta. Se obtiene principalmente a partir de maíz y caña de azúcar. Sin embargo, el uso de biomasa lignocelulósica de residuos industriales y forestales como pajas, cascarillas, bagazos, residuos animales, residuos de la industria agrícola, residuos de zonas urbanas y cultivos energéticos, son considerados como la materia prima del futuro de los biocombustibles.

Por otro lado, la producción de bioetanol a partir de material lignocelulósico implica diferentes etapas: pretratamientos térmicos, físicos y/o químicos, para producir azúcares fermentables, seguido de una fermentación. Sin embargo, estas etapas son costosas (Wen, F., et al., 2009) y por ello se requieren importantes avances técnicos en diversos campos, para reducir los costos de producción a un nivel competitivo con la gasolina (AIE, 2010). La naturaleza recalcitrante de la pared celular de los materiales lignocelulósicos representa el mayor desafío en ese campo. La matriz lignocelulósica, compuesta por la celulosa, la hemicelulosa y la lignina, le confiere resistencia al ataque de microorganismos, enzimas y agentes químicos.

El uso de ácidos, enzimas y solventes orgánicos son los pretratamientos más frecuentes por la eficiencia en la liberación de azúcares, sin embargo, la aplicación de altas concentraciones imposibilita la recuperación de sólidos, generan compuestos inhibitorios para los procesos fermentativos e incrementan los costos de producción (Wilkinson et al., 2017). El uso de aplicaciones enzimáticas para la degradación de materia orgánica y debido a la naturaleza de

esta se tienen diferentes enzimas hidrolíticas con actividad  $\beta$ -glucanasa, celulasa, hemicelulasa, xilanasas, proteasas, lipasas (Ravindran y Jaiswal, 2016).

En este trabajo se estudiará la planta de rastrojo de amaranto y de muérdago como fuentes de biomasa lignocelulósica por su alta disponibilidad, composición estructural, su bajo costo y los efectos positivos que tiene al disminuir los factores de contaminación que estos implican, el rastrojo de amaranto por su parte se quema siendo fuente de contaminación ambiental y el muérdago genera daño a los árboles hospederos provocándoles la muerte de los mismos, y se evaluará el efecto que tiene aplicar tratamientos químicos y enzimáticos sobre la estructura de estos materiales lignocelulósicos.

## Problemática

Una gran parte de los gases de efecto invernadero y de otros contaminantes ambientales provienen del sector transporte, el cual se ve afectado por el alza de precios de los combustibles derivados del petróleo. Los biocombustibles líquidos representan una opción a corto plazo para complementar la transición de combustibles derivados del petróleo a combustibles renovables.

Actualmente la producción de biocombustibles está clasificada en cuatro generaciones. En la primera generación se utilizan materias primas provenientes de alimentos de la canasta básica, generando un problema al utilizarlas disminuyendo los suministros alimenticios. En la segunda generación los insumos son residuos agrícolas y forestales compuestos principalmente por celulosa. La tercera generación aun es objeto de investigación y su disponibilidad comercial es limitada y la cuarta generación está en etapa de investigación y desarrollo; se tienen altos costos de producción y procesamiento por lo que utilizarlas presenta una desventaja.

Los pretratamientos que se utilizan para la liberación de azúcares fermentables son también un factor importante a la hora de producir bioetanol. Para tratar la materia prima se tienen cuatro pretratamientos: El pretratamiento físico; ayuda a reducir el tamaño de partícula y la cristalinidad del material lignocelulósico, pero se tiene un alto consumo de energía y no se puede eliminar la lignina ni la hemicelulosa. El pretratamiento químico; es rápido, se tiene una alta conversión de azúcar, pero si se utiliza concentrado es tóxico, corrosivo y tiene un alto costo. El pretratamiento físico-químico transforma la lignina y la elimina, no produce compuestos inhibidores, pero se necesitan altas temperaturas y presiones esto genera costos elevados y se puede tener una menor eficiencia. El pretratamiento biológico tiene un bajo consumo energético, degrada la lignina y la hemicelulosa, pero tiene un bajo índice de hidrólisis. Buscar alternativas que ayuden a reducir los costos, a eliminar la lignina, a tener un menor consumo energético y una mayor conversión de azúcar es fundamental para el proceso.

## 1. Marco referencial

### 1.1 Combustibles

El carbón, el petróleo, gas licuado y el gas natural se conocen como combustibles fósiles. Se han formado a partir de la acumulación de grandes cantidades de restos orgánicos provenientes de plantas y de animales. Sus restos se acumularon en depresiones como fondos marinos o lacustres, donde quedaron fuera del alcance de los microorganismos descomponedores aerobios. Allí fueron cubiertos por capas de sedimento. La presión y la temperatura crecientes transforman progresivamente esos restos orgánicos en petróleo, carbón y gas, que pueden permanecer *in situ* o migrar a través de las rocas, separarse, acumularse o incluso escapar a la atmósfera. Los combustibles fósiles que usamos hoy en día se tardaron más de 300 millones de años en producirse, no pueden durar para siempre, y debido a que las personas los usan mucho más rápido de lo que la tierra puede producirlos, se pronostica un agotamiento de este recurso (Geoffrey M. Horn, 2010). Estos combustibles son capaces de liberar energía cuando se oxidan de forma violenta con desprendimiento de calor (Campbell, C., 2002).

Los combustibles fósiles son recursos no renovables ya que al contrario que otros recursos de origen biológico, como la leña, el carbón vegetal, el bioetanol y el biodiesel, no se pueden reponer a corto plazo.

Los biocombustibles son fuentes de energías renovables que provienen de seres vivos. Algunos de estos combustibles se han utilizado durante mucho tiempo por ejemplo la madera y el estiércol. Mientras tengamos luz solar, tierra, aire y agua, siempre podemos cultivar más biocombustibles, por lo que en la actualidad son ampliamente investigados.

#### 1.1.1 Panorama de los biocombustibles

##### **Panorama internacional**

Debido a que los combustibles fósiles representan la principal fuente energética en el mundo, sus reservas están agotándose a medida que aumenta la población mundial y volviéndose cada vez más costosos; sus efectos negativos que tiene sobre el medio ambiente como su contribución en la emisión de gases de efecto invernadero, provocando pérdida de biodiversidad, cambio climático, aumentos en el nivel del mar, entre otros (World Bank, 2017). Lo anterior ha conllevado al desarrollo de combustibles alternativos que sean renovables, sustentables, económicamente viables y que reduzcan el efecto sobre el clima mundial.

Brasil tiene casi 30 años de experiencia en investigación, producción y uso del etanol como carburante. En Estados Unidos, aunque comenzaron después han superado a Brasil en la producción de etanol. Brasil por su parte obtiene el etanol de la caña de azúcar, sin embargo, Estados Unidos del maíz. Como se muestra en la figura 1. la producción de bioetanol ha tenido un aumento de casi el doble de 2007 con 13 billones de galones y para el 2019 con más de 29 billones de galones esto debido a la importancia que se le ha dado a este biocombustible, se tiene a Estados Unidos como mayor productor seguido de Brasil, con una menor cantidad de producción Europa, China, Canadá y el resto del mundo en un menor porcentaje.

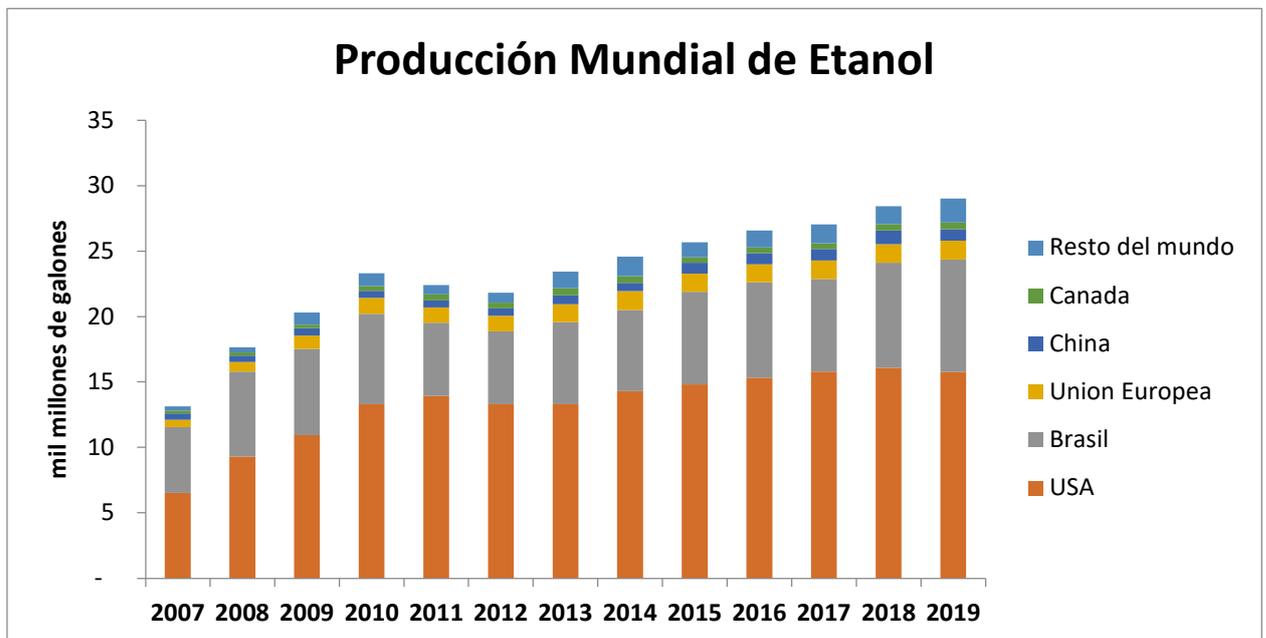


Figura 1. Producción mundial de etanol.

Fuente: [www.afdc.energy.gov](http://www.afdc.energy.gov) (2020).

Seguir investigando nuevas materias primas para lograr obtener bioetanol es un desafío para los investigadores.

### Situación en México

México ha estado desarrollando normas, leyes y políticas que permitan introducir este biocombustible al mercado. Según la SEGOB en 2008, se desarrollaron políticas como la Ley de Promoción y Desarrollo de los Bioenergéticos (LPBD).

De diciembre de 2008 a febrero de 2009 en Nuevo León, el gobierno mexicano realizó pruebas piloto para estudiar el rendimiento en los motores de vehículos, las emisiones a la atmósfera y el comportamiento de la gasolina oxigenada con etanol al 6% en sustitución al éter metil terbutílico (MTBE) (SENER, 2014).

Para 2015, Petróleos Mexicanos (PEMEX) realizó la suscripción de contratos para la adquisición de etanol anhidro como componente para la gasolina.

En agosto de 2016, se emitió la norma NOM-016-CRE-2016, la cual estableció inicialmente el uso de etanol como oxigenante en gasolinas hasta en un 5.8% en volumen, y prohibió su uso en las ciudades de México, Monterrey y Guadalajara. Dicha norma se actualizó en junio de 2017 modificándose el límite permitido del contenido de etanol en gasolina al 10% en volumen, es decir, E10 (Saldaña, 2017).

La SENER estimo que para el 2020 se requeriría un volumen de bioetanol de 833 millones de litros al año (ML/a). Esta producción estaría asignada entre los ingenios con 462 ML/a y proyectos independientes con 371 ML/a.

### 1.1.2 Combustibles alternativos

Los biocombustibles se consideran renovables y sostenibles, son recursos energéticos producidos a partir de biomasa, esta es materia orgánica originada de un proceso biológico, espontaneo o provocado y puede ser madera, residuos forestales, residuos de cultivos, cultivos energéticos, residuos de animales, residuos municipales entre otros. Los biocombustibles más desarrollados y utilizados son el bioetanol y el biodiesel. Pero también existen el biogás, biopropanol, biobutanol, entre otros. (Delgado, J., et al., 2015).

Tabla 1. Clasificación de los biocombustibles por su generación.

| Generación         | Descripción  |
|--------------------|--|
| Primera generación | La materia prima son cultivos alimenticios que se procesan por medios convencionales, por ejemplo: el jugo de caña, sorgo, las semillas del maíz, la remolacha, las semillas de cártamo entre otras. Utilizando solo procesos básicos como la fermentación.  |
| Segunda generación | Son los combustibles que no utilizan fuentes comestibles como materia prima, por ejemplo: rastrojo de caña, rastrojo de maíz, todo el material de desecho de arbustos, residuos sólidos municipales, entre otros. Se tiene un mayor procesamiento sacarificación, transesterificación, hidrólisis y fermentación.<br>A los biocombustibles de segunda generación también se les conoce como biocombustibles avanzados, los cuales utilizan materias primas que no compiten con los alimentos y que pueden tener mejores indicadores ambientales. |
| Tercera generación | son vegetales no alimenticios de crecimiento rápido llamados cultivos energéticos, material proveniente de algas y de hidrogeno producido a partir de material lignocelulósico, en este se realiza un proceso anhídrido carbónico.   |
| Cuarta generación  | Aún se encuentra en fase de estudio, pero son las bacterias genéticamente modificadas, que emplean anhídrido carbónico, su rendimiento depende de la información genética de la bacteria.  |

En la tabla 1. se muestra la clasificación de los biocombustibles por generaciones y su descripción varían dependiendo los procesos que se realizan y la materia prima que se utiliza (Acheampong et al., 2017).

## 1.2 Bioetanol

El etanol ( $C_2H_5OH$ ) es un compuesto químico inflamable, claro, biodegradable y ligeramente tóxico. Es el tipo de biocombustible más dominante que puede ser utilizado como combustible puro o en combinación con gasolina, y es producido principalmente en Estados Unidos y Brasil a partir de maíz y caña de azúcar respectivamente, por ser la materia prima de la que pueden disponer en mayor cantidad en estos países. Otras fuentes son la remolacha, el sorgo, la mandioca además de material rico en celulosa llamados materiales lignocelulósicos (Talebnia, 2015) como pastos, árboles y varios productos de desecho de las cosechas, el procesamiento de la madera y los desechos sólidos municipales.

El etanol se produce de dos formas, aproximadamente un 93% se obtiene por el procesamiento de materias primas que contienen azúcar o almidón que son de origen renovable y un 7% químicamente por la reacción de etano más vapor de agua, comúnmente la fermentación se realiza a partir de insumos de primera generación como la caña de azúcar o el maíz mediante el proceso de molienda en seco seguido de licuefacción, hidrólisis o sacarificación y fermentación con enzimas que convierten los azúcares en bioetanol y dióxido de carbono (Lennartsson y Erlandsson, 2014), también se pueden obtener a partir de otras biomásas ricas en celulosa y hemicelulosa. Estos últimos han tenido mayor relevancia por su gran disponibilidad y bajo costo, además de que su uso de manera eficaz minimiza la contaminación ambiental, no acarrea problemáticas de seguridad alimentaria y resulta ser un proceso adecuado para la disposición de residuos agrícolas (Potumarthi et al., 2013).

Por otro lado, el bioetanol celulósico se obtiene bioquímicamente a través del proceso biológico de fermentación de azúcares generados comúnmente de la hidrólisis de la hemicelulosa y celulosa contenida en la biomasa celulósica (Demirbas, 2007), también se puede derivar de insumos celulósicos con un proceso termoquímico de conversión.

El etanol es un excelente combustible para motores ya que representa las siguientes características (Díaz y Herrera, 2003):

- ❖ Tiene un mayor índice de octanaje que la gasolina
- ❖ Su presión de vapor es menor al de la gasolina, lo que resulta en una emisión menos por evaporación.
- ❖ Es menor inflamable que la gasolina, lo cual reduce el número y la severidad de los incendios en los vehículos.

- ❖ El contenido energético del etanol es menor que la gasolina (aproximadamente 2/3 partes), pero su rendimiento es similar.

El etanol carburante, derivado del material lignocelulósico, tendría un balance energético de 4.4 MegaJoules por litro (MJ/L) a 6.6 MJ/L, mucho mayor que el etanol derivado de maíz, que tiene un balance de 1.3 MJ/L a 1.65 MJ/L (Sims et al., 2008)

La mezcla de combustibles fósiles con combustibles producidos a partir de biomasa es un hecho ya consolidado, de fácil implementación, posibilidad inmediata y con beneficios ambientales, por lo que se han establecido a nivel mundial varios estándares para la mezcla de bioetanol con combustibles fósiles.

Al aprovechar varios residuos agroindustriales que de otra manera serían contaminantes a eliminar se pueden tener beneficios ambientales, además que se soluciona la necesidad de tierras de cultivo debido a que los residuos ya están disponibles.

En 2009, la OECD/IEA dieron el costo teórico de producción de biocombustibles lignocelulósicos en dólares estadounidenses por litro equivalente de gasolina (lge) de bagazos y rastrojos México tiene 3.1 dólares/GJ y para etanol lignocelulósico 0.79 dólares/lge.

### **1.3 Fuentes de biomasa para la producción de bioetanol**

La biomasa incluye toda la materia orgánica que tienen su origen inmediato en un proceso biológico, poseen características biodegradables, son un recurso renovable, es la fuente de materia orgánica más abundante en la tierra, por su potencial para la producción de bioproductos y bioenergía sostenible, los residuos de biomasa agroindustrial están recibiendo mayor atención (Ali, S. R. et al., 2016). Toda esta biomasa es adecuada para la fermentación de etanol transformando carbohidratos en azúcares fermentables. (Silva, E. K. et al., 2018). La biomasa se puede clasificar según su origen en: biomasa natural, producida en los ecosistemas naturales; biomasa residual, generada como residuo en los procesos productivos de los sectores agrícola, forestal e industrial; cultivos energéticos, son aquellos dedicados a la producción de biomasa para su utilización energética con fines no alimentarios. (Ballesteros I. et al., 2006)

#### **1.3.1 Almidón**

Dentro de las principales fuentes de biomasa para la producción de bioetanol se encuentran los cultivos de almidón (cereales, tubérculos y raíces, leguminosas y frutos verdes e inmaduros). Los cuales se están ampliamente distribuidos en el mundo, son de fácil conversión, pueden ser almacenados durante largos

periodos de tiempo y presentan altos rendimientos de etanol (Zabed H. et al., 2017)

### **1.3.2 Azúcares**

El bioetanol puede ser obtenido a partir de materias primas cuyas principales constituyentes son azúcares (Nwufo et al., 2016; Zabed et al., 2017), estas fuentes representan un alto rendimiento de azúcares y bajos costos de conversión a etanol; sin embargo, su principal factor limitante es su disponibilidad estacional (Vohra M. et al., 2014)

### **1.3.3 Biomasa lignocelulósica**

La biomasa lignocelulósica es un recurso natural renovable ampliamente distribuido en la naturaleza, el cual puede ser utilizado como fuente de energía (Klass, 1998), es la forma más frecuente de carbono renovable en el planeta (Jae J. et al., 2010), puede convertirse en diferentes productos de alto valor: biocombustibles, productos químicos de valor agregado y fuentes de energía baratas para la fermentación microbiana como producción de enzimas (Anwar, Z. et al., 2014). Está constituida por los tejidos de los vegetales cuyas células presentan una pared celular que a su vez tiene un entramado de microfibrillas de celulosa formando capas recubiertas de hemicelulosa y sobre las que se deposita la lignina, su cantidad varía según la fuente de este recurso (Horn et al., 2012).

Como se muestra en la Figura 2. esta biomasa se compone principalmente de tres tipos de polímeros: Celulosa ( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>n</sub> (30-50 %), hemicelulosa ( $C_5H_8O_4$ )<sub>n</sub> (15-40 %) y lignina [ $C_9H_{10}O_3$  (OCH<sub>3</sub>) 0.9-1.7] (10-20 %) (Bhutto et al., 2017). Aunque también se tiene agua, proteínas y otros componentes no significativos que ocupan un 1% (Potumarthi et al., 2013).

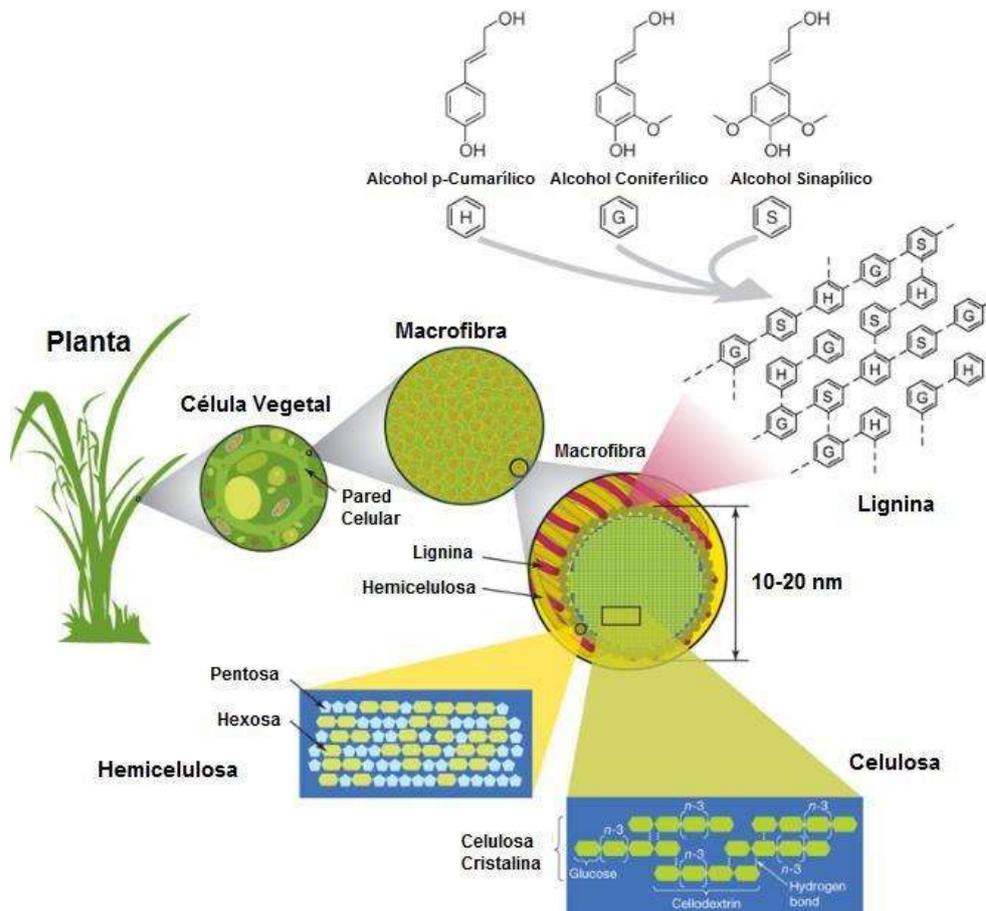


Figura 2. Estructura de la pared celular de una planta  
Fuente: Silvia Morales, 2015.

## Celulosa

Es el componente estructural principal de las plantas y recupera la importancia como recurso químico renovable para reemplazar los materiales derivados del petróleo independientemente de las fuentes (Khalil, H. P. S. A. et al., 2014). Es un polímero lineal de monómeros de D-glucosa que se unen por enlaces  $\beta$ -1-4 altamente estructuradas y difíciles de hidrolizar, pero al generar azúcares de 6 carbonos es fácilmente fermentables por levaduras. Es el polímero más abundante en la naturaleza, representa el 50% de total de la biomasa terrestre.

La estructura molecular de la celulosa y las estructuras de las protofibrillas y microfibrillas son aspectos muy importantes que condicionan la posterior hidrólisis de la celulosa. Cuanto más ordenada y cristalina es la celulosa es menos soluble y más difícil de degradar (Zhang y Lynd, 2004).

## Hemicelulosa

Es el segundo componente renovable más abundante de biomasa lignocelulósica después de la celulosa (Sun, Y., y Cheng J., 2002). Consiste en polímeros lineales o ramificados de diferentes azúcares de 5 carbonos llamados

pentosas, como xilosa y arabinosa y de 6 carbonos llamados hexosas, como manosa, glucosa y galactosa, azúcar y ácidos, entrelazadas entre si glucosídicamente (Peng et al., 2009). La pectina es un ejemplo de hemicelulosa que encontramos en la vida cotidiana y es la que le da la consistencia gelatinosa a las frutas y mermeladas. La hemicelulosa sirve de conexión entre la lignina y las fibras de celulosa, y da toda la rigidez a la red de celulosa, hemicelulosa y lignina.

La hemicelulosa tiene diversas aplicaciones industriales como hidrogeles, termoplásticos, recubrimientos y aditivos en fabricación de papel, productos cosméticos y farmacéuticos (Qi et al., 2016; Farhat et al., 2017)

La hidrólisis de la hemicelulosa es relativamente fácil debido a su estructura amorfa y ramificada, así como por su bajo peso molecular (Gomes, D. et al., 2015).

### **Lignina**

Es la tercera fracción mayoritaria de la biomasa lignocelulósica, se trata de un polímero aromático tridimensional bastante complejo y pequeño que actúa como pegamento entre las fibras de celulosa de las plantas vivas contribuye a dar firmeza y fortaleza, protege a la celulosa del ataque microbiano y confiere resistencia e impermeabilidad al material (Laathanachareon et al., 2015).

La lignina es altamente resistente a la degradación química y biológica, por lo que recientes investigaciones acerca de la composición, estructura y su polimerización han revelado nuevas oportunidades para lograr una futura producción de bioenergía.

La habilidad de la lignina para resistir la degradación es atribuida a su diferente estructura polimérica. A diferencia de la celulosa, la lignina no es un polímero lineal de idéntica y repetidas subunidades (Ralph et al., 2004).

La biomasa lignocelulósica ampliamente investigada y utilizada como materia prima para la producción de etanol actualmente se divide en cinco tipos de biomasa (Zabed et al., 2017); Hierbas perennes, las cuales tienen alto rendimiento de biomasa, son fáciles de cultivar y cosechar, el rendimiento puede oscilar entre 0.9 y 37 ton de materia seca/Ha y el rendimiento potencial de etanol es de 160-460 L/t de biomasa. Plantas acuáticas, su crecimiento es rápido y se da en cuerpos de agua lo que favorece debido a que no debe competir con tierras cultivables y son abundantes en ciertas partes del mundo. Residuos agrícolas, altamente disponibles y su uso minimiza la dependencia de la biomasa forestal, maderera y reduce la deforestación, valorización y gestión ecológica de los residuos agroalimentarios y el potencial de etanol es de 235-250 L/ton de biomasa. Biomasa forestal tiene un menor contenido de cenizas en comparación con los residuos de cultivos, es una de las biomásas inexploradas y

subutilizadas, los rendimientos de etanol son 220-275 L/t para maderas blandas y 280-285 L/t para maderas duras. Residuos sólidos municipales, su abundancia estimada es de 20.7 millones de ton/año para un área urbana con 217 millones de habitantes, el rendimiento potencial de etanol es de 154 L/ton de biomasa.

En la actualidad buscar nuevas fuentes de biomasa para la producción de etanol es necesario por lo que en este trabajo se utiliza el material lignocelulósico de dos diferentes fuentes que son la planta de rastrojo de amaranto y de muérdago.

#### **1.3.4 Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*)**

La planta de amaranto tiene hojas anchas, brillantemente coloreadas con una longitud promedio de 50 a 90 cm, que está formada por muchas espigas que contienen numerosas flores pequeñas en las que se encuentran contenidos los granos. Este grano o semilla de amaranto posee características nutricionales importantes como las proteínas.

De la planta de amaranto se pueden consumir tanto sus hojas como sus semillas, ambas con un elevado contenido de proteínas. Además, la planta es capaz de crecer en un amplio rango de condiciones ambientales, ciclos de luz, resistencia a enfermedades, tolerancia a suelos salinos, entre otros (Orosco, E., 2013). El rastrojo de amaranto es un subproducto obtenido a partir de la planta de amaranto.

Actualmente el cultivo de amaranto se cosecha 2 veces al año y es utilizado para el consumo humano en diversos productos; en la repostería y galletería, como dulces tradicionales se tienen: las alegrías, palanquetas, golosinas y las típicas barras de amaranto; se elaboran pastas, harinas y con estas se pueden realizar bebidas como el pulque, aguas frescas, helados, atoles entre otros. Para uso industrial se realizan biopelículas de amaranto usando glicerol como plastificante.

Esta producción genera abundantes residuos agrícolas lignocelulósicos, concretamente alrededor de 270 mil toneladas por cada ciclo si se considera que se tienen dos por año se tendrían aproximadamente 540 mil toneladas al año, de estos un 5% es utilizado como alimento para ganado, un 5% como abono y el 90% se quema siendo esto causa de una alta contaminación ambiental. El rastrojo se encuentra altamente disponible en México y representa una materia prima de fácil acceso y de bajo costo.

#### **Material lignocelulósico Amaranto**

La composición química del material lignocelulósico del amaranto fue determinada por Arce, 2011, aplicando metodologías TAPPI (Technical Association of the Pulp and Paper Industry) el cual mostro los componentes y

cantidades que se presentan en la figura 3, donde se puede observar que la celulosa en general es el componente que se encuentra en mayor cantidad a excepción del RT (tallo, hoja e inflorescencia) donde se reportó un mayor contenido de extraíbles. Respecto al contenido de hemicelulosa, es mayor en la hoja donde se tienen 26%, la celulosa está presente en mayor proporción en el tallo con un 46.8%. Estos porcentajes se encuentran dentro de los parámetros que se tienen reportados en los contenidos de biomasa lignocelulósica.

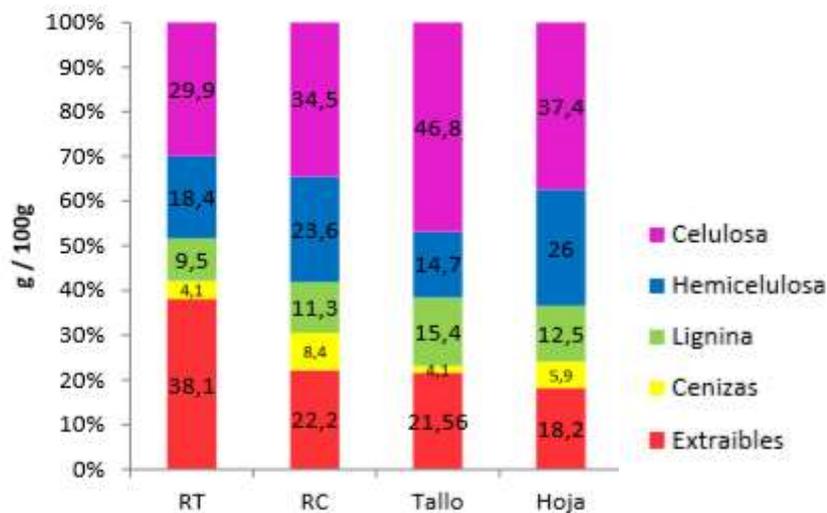


Figura 3. Composición química del material lignocelulósico de distintas partes de la planta de amaranto Fuente Arce, 2011.

RC: rastrojo compuesto (tallo, hoja, inflorescencia y grano).

RT: rastrojo T (tallo, hoja e inflorescencia).

### 1.3.5 Muérdago (*Cladocolea Ioniceroides*)

Los muérdagos son plantas parásitas o semiparásitas con flores que se unen al tallo de su hospedero, que compiten con él por agua y nutrientes e impiden su desarrollo. Cuando son abundantes sobre el árbol, provocan la muerte del mismo, sobre todo en aquellos árboles que están próximos al límite inferior de sus posibilidades de subsistencia. Se distribuyen en zonas boscosas y áreas urbanas (Espinoza-Zúñiga, P., et al., 2019).

En 1971 se observó en la ciudad de México *Cladocolea Ioniceroides* (Van Tieghem) fue el primer muérdago, que ha sido documentado para México, se cree que en los arboles de trueno, estos fueron llevados de un vivero de Cuernavaca, Morelos e introducidos accidentalmente a CDMX (Calderón, 1979). El género *Cladocolea* en teoría sólo utiliza a sus huéspedes para extraer agua; sin embargo, en la zona chinampera de Xochimilco se observa que altos niveles de daño por *C. Ioniceroides* contribuyen en gran medida a la muerte de los árboles o los hace más susceptibles al ataque de otros agentes. La escasa información que existe sobre el género, indica que ha sido poco estudiado en

campo, por lo cual, no se conocen varios aspectos de su germinación y su biología.

En México, de acuerdo al censo de la SARH de 1991 y 1992, son la tercera causa de daño a las masas forestales. En conjunto, generan pérdidas por más de 2 millones de metros cúbicos de madera, sin considerar la muerte del arbolado y la predisposición a otros agentes patógenos, como insectos y hongos (Vázquez y Cibrián, 1996).

Con respecto a la infestación, Alvarado-Rosales y Saavedra Romero (2005) evaluaron 24,408 árboles de ahuejote en la zona chinampera de la CDMX donde este árbol desempeña un papel fundamental por los beneficios ecológicos y estéticos que proporciona, entre ellos: protección de cultivos, retención de suelo y la belleza que otorga a los canales que año con año atraen la atención de miles de turistas. Estimaron que más del 46% de estos árboles estaban severamente infestados por *Cladocolea loniceroides*. Sandoval y Gutiérrez (2006) evaluaron mil ejemplares arbóreos en diez delegaciones y registraron que el porcentaje de daño más alto consistió en infestaciones leves y severas.

Estos datos representan una materia prima que puede ser aprovechada debido a que es altamente disponible en México, de bajo costo y fácil acceso.

### **Material lignocelulósico del muérdago *Cladocolea loniceroides***

Aun no se reporta su composición de biomasa lignocelulósica; En la tabla 2. se muestra el análisis químico proximal de hoja, tallo y fruto del muérdago *Cladocolea loniceroides* que obtuvo Serrano et al., 2011. teniendo como resultados proteína y fibra de 19.08 y 14.80% que se pueden utilizar como un recurso en la producción de Bioetanol, después de su previa conversión a licores fermentables (Sun, Y., y Cheng, J., 2002).

*Tabla 2. Análisis químico proximal del Muérdago *Cladocolea loniceroides*  
Fuente: Serrano et al., 2011*

| <b>Componente</b>           | <b>Hoja</b>  | <b>Tallo g/100g</b> | <b>Fruto</b> |
|-----------------------------|--------------|---------------------|--------------|
| Humedad                     | 7.05 ± 0.30  | 4.37 ± 0.22         | 9.82 ± 2.23  |
| Cenizas                     | 0.17 ± 0.00  | 6.59 ± 0.08         | 0.04 ± 0.00  |
| Proteína cruda              | 19.08 ± 0.59 | 13.61 ± 0.3         | 12.65 ± 0.33 |
| Extracto etéreo             | 4.22 ± 0.16  | 3.26 ± 0.82         | 28.44 ± 1.91 |
| Fibra cruda                 | 5.47 ± 0.37  | 14.80 ± 0.77        | 9.39 ± 0.92  |
| Extracto libre de nitrógeno | 71.07        | 61.73               | 49.48        |

### 1.4 Proceso de producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica

En la Figura 4. se muestran las principales etapas del proceso de obtención de bioetanol.

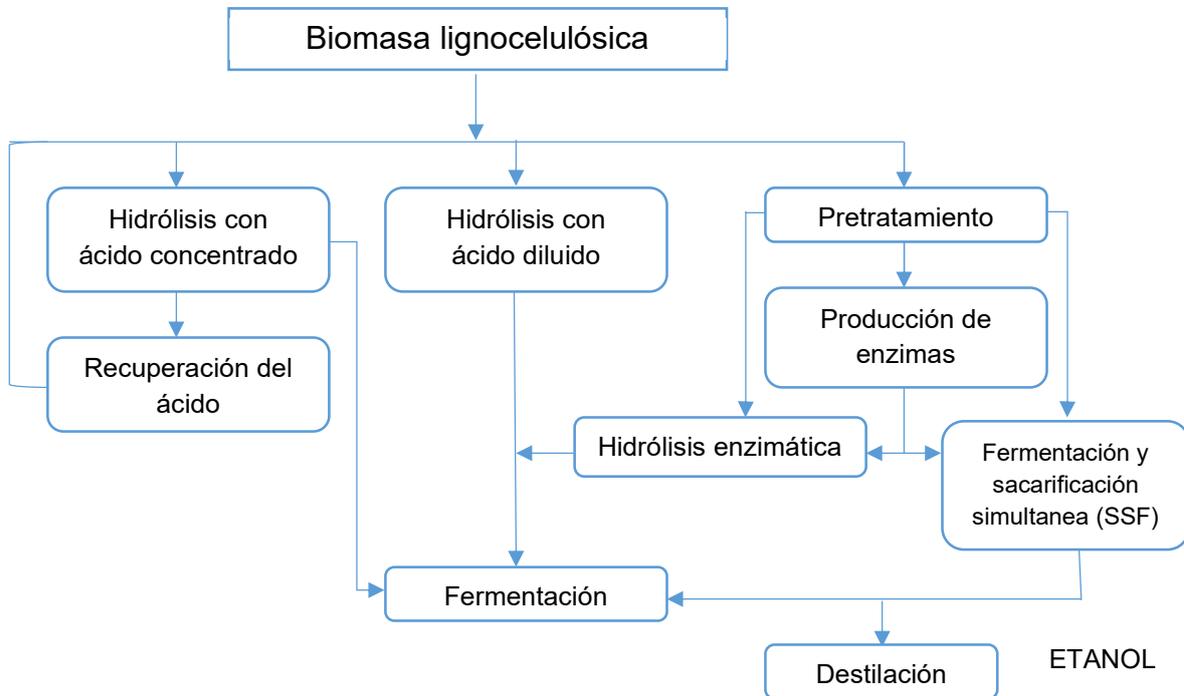


figura 4. Producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica

Para la producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica se tienen varios estudios que proponen diferentes pretratamientos que faciliten la separación de sus estructuras en celulosa, hemicelulosa y lignina, estos incluyen métodos físicos, químicos, biológicos, y/o su combinación, que den como resultado el acceso libre para producir azúcares fermentables, que se conviertan en etanol durante el proceso de fermentación; el cual se recupera y se purifica por destilación (Zabed et al., 2017).

#### 1.4.1 Pretratamientos lignocelulósicos

A diferencia del etanol derivado de mostos ricos en azúcares fermentables, el etanol avanzado requiere que los azúcares contenidos en los materiales lignocelulósicos sean liberados, lo cual implica más de un paso debido a la complejidad de estos materiales.

Tabla 3. Pretratamientos lignocelulósicos

| Pretratamientos       | Nombre  |
|-----------------------|---|
| Pretratamiento físico | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Astillado mecánico</li> <li>• Microondas</li> <li>• Ultrasonido</li> </ul> |

|                                |   |
|--------------------------------|---|
|                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Radiación de electrones de alta energía</li> <li>• Pirolisis de electrones a alta temperatura</li> </ul>   |
| Pretratamiento químico         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ácido concentrado</li> <li>• Acido diluido</li> <li>• Pretratamiento alcalino</li> <li>• Pretratamiento de oxidación</li> <li>• Pretratamiento con solventes orgánicos</li> <li>• Pretratamiento con liquido iónico</li> </ul> |
| Pretratamiento físico- químico | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Steam-explosion</i> (Explosión de vapor)</li> <li>• Método AFEX</li> <li>• Explosión de CO<sub>2</sub></li> <li>• Catálisis eléctrica</li> </ul>  |
| Pretratamiento biológico       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Consorcio microbiano</li> <li>• Pretratamientos utilizando especies fúngicas</li> <li>• Pretratamiento enzimático</li> </ul>   |

#### 1.4.1.1 Pretratamiento físico

Al tratar la biomasa utilizando un método mecánico se logra reducir la cristalinidad, el tamaño de partículas y el grado de polimerización consiguiendo que aumente el área de superficie accesible y el tamaño de los poros.

Los tratamientos físicos comúnmente utilizados para degradar los residuos lignocelulósicos incluyen: vaporización, molienda, irradiación, temperatura y presión. La desventaja de este proceso es su alto consumo de energía (Akhtar N. et al., 2015).

#### 1.4.1.2 Pretratamiento químico

Los productos químicos pueden usarse para eliminar o alterar el material lignocelulósico de las plantas; el tratamiento con ácido diluido (ácido sulfúrico o ácido clorhídrico) o álcali como (hidróxido de sodio, hidróxido de potasio e hidróxido de amonio) es el método más convencional (Rastogi M. y Shrivastava S., 2017) Los ácidos concentrados no son los preferidos porque son altamente corrosivos y hacen que el tratamiento aumente su costo si no se recuperan.

#### 1.4.1.3 Pretratamiento físico-químico

El combinar dos tratamientos permiten la alteración de la estructura de la lignina y la disolución de la hemicelulosa generando una mejor accesibilidad de la

celulosa para enzimas hidrolíticas (Singh A., Bajar S. y Bishnoi N., et al., 2017). el utilizar este pretratamiento tiene como desventaja un alto costo, alta temperatura y presión y se tiene una menor eficiencia.

#### **1.4.1.4 Pretratamiento biológico**

El pretratamiento biológico se realiza a través de microorganismos que degradan la lignina y la hemicelulosa como los hongos que son capaces de producir enzimas (Chen et al., 2017). Son económicamente viables, no liberan compuestos tóxicos; sin embargo, son procesos que requieren de mucho tiempo, control de las condiciones de crecimiento de los microorganismos. Este tratamiento se puede usar seguido de algún otro pretratamiento.

#### **1.4.2 Hidrólisis de la biomasa**

La hidrólisis es una reacción química donde ocurre una ruptura de la molécula del agua. Para llevar a cabo la hidrólisis se requiere que el material lignocelulósico sea hidrolizado en azúcares simples que sean fermentados posteriormente. Esta hidrólisis puede realizarse químicamente mediante catalización con ácidos como el sulfúrico y clorhídrico o enzimáticamente mediante hidrólisis catalizada por enzimas (Zhang et al., 2012).

##### **1.4.2.1 Hidrólisis ácida**

Es un proceso químico que, mediante el uso de ácidos, como ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, entre otros; se transforman las cadenas de polisacáridos que forman la biomasa (hemicelulosa y celulosa) en sus monómeros elementales. La hidrólisis ácida concentrada de biomasa está limitada por la corrosión y los costosos problemas de recuperación de ácido.

##### **1.4.2.2 Hidrólisis enzimática**

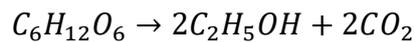
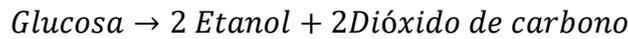
La hidrólisis enzimática es la operación unitaria en el proceso de conversión de lignocelulosa que utiliza diferentes enzimas fúngicas y bacterianas como lacasas, hemicelulosas y celulosas, para despolimerizar la biomasa lignocelulósica de manera eficiente (Quiroz C. y Folch M. 2013). Los componentes sacáridos liberados son la materia prima para la fermentación. El contenido de sólidos en la hidrólisis enzimática ofrece potencialmente muchas ventajas incluyendo el aumento de las concentraciones de azúcar y etanol y la reducción de los costos de capital y operación.

Las enzimas que se usan principalmente para la hidrólisis de biomasa lignocelulósica son celulasas debido a que la celulosa es el componente

mayoritario del material a hidrolizar (Khare et al., 2015). La apropiada combinación (exo-1-4-β-glucanasa, endo-1-4-β-glucanasa, β-glucosidasa y celobiasa) determina la eficiencia de la sacarificación, pero varía según el tipo de biomasa. Estas enzimas son producidas por hongos (*Trichoderma* spp. y *Aspergillus* spp.), bacterias (*Cytophaga* y *Cellulomonas* spp) y actinomicetos (*A. roseus* y *A. cellulosa*); siendo los hongos los principales productores de celulasa (Chen, 2014).

### 1.4.3 Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica es una biorreacción que permite degradar azúcares en alcohol y dióxido de carbono por medio de microorganismos (Simal J. A., 2013). Este es el último paso para la producción de bioetanol a partir de los hidrolizados de materiales lignocelulósicos la conversión química de la fermentación alcohólica se representa con la siguiente reacción química:



La fermentación en la producción de alcohol como el etanol es un proceso crítico donde los principales parámetros que afectan las vías de fermentación incluyen, la composición del medio, el pH, la temperatura, la velocidad de agitación, la concentración de azúcar y el tipo de inóculo microbiano (Moscoviz R. et al., 2016). El material hidrolizado contiene azúcares fermentables que son utilizados por microorganismos etanologénicos, entre los que se encuentran hongos y bacterias como la *Zymomonas mobilis*, pero la explotación a nivel industrial es mínima; las cepas de levaduras como la *Saccharomyces cerevisiae*, la cual ha sido ampliamente utilizada para la producción comercial del etanol debido a que tiene rápida tasa de crecimiento, eficaz utilización de la glucosa, eficiente producción de etanol, una alta tolerancia a altas concentraciones de etanol y bajos niveles de oxígeno (Binod et al., 2013).

Los procesos comunes implicados en la producción de etanol son el tratamiento previo, la hidrólisis y la fermentación separadas, sacarificación y fermentación simultáneas o sacarificación y fermentación separadas. El biorreactor es el elemento central para la realización de la fermentación alcohólica. Es bastante difícil esperar que el hidrolizado sea completamente uniforme en términos del monómero de azúcar, la levadura utiliza la glucosa para la producción de otros metabolitos, oligosacáridos con inhibidores probables o sustancias no digeribles. Teóricamente, cada kg de glucosa y xilosa puede producir 0.49 Kg de dióxido de carbono con 0.51 Kg de etanol (Aditya, H. B. et al., 2016).

## 2. Antecedentes

El Inventario Nacional de Energías Renovables en México (INERE) y el Atlas Nacional de Zonas Factibles publicado por SENER, para desarrollar proyectos generadores de energías renovables, indican que México posee alrededor de 95 millones de toneladas de biomasa residual en forma de cultivos especializados con un potencial energético de 71,199 TJ.

Por otro lado, la producción a nivel industrial de bioetanol a partir de desechos agroindustriales, es decir, de segunda generación, aun no se ha desarrollado en el país. Será posible una vez que se logren reducir los costos de traslado de la materia prima, se mejoren los procesos de fermentación, en particular los rendimientos producto/sustrato, y se diseñen microorganismos con mejores capacidades fermentativas.

Los estudios existentes sobre el muérdago del género *Cladocolea loniceroides* en el territorio nacional se han enfocado, principalmente, a la distribución espacial del muérdago en las áreas verdes de la delegación Tlalpan, México estudiado por Espinoza P. et al., 2019; Ortega M. y Delgado M. 2019 realizó la búsqueda y taxonomía de la planta; Ruiz F. M. et al., 2019 realizó el estudio para probar los efectos antihiper glucémicos, antioxidantes y antiinflamatorios del extracto acuoso del muérdago en ratones diabéticos y casi nulos en el uso que se le puede dar a esta planta hemiparásita.

Se conocen las técnicas de hidrólisis y los resultados que han aportado a cada investigación. Actualmente se siguen aplicando las técnicas de estos autores como Ferrer et al. (2002), Aguilar Rivera & Canizales Leal (2004) Boutros et al. (2005), Monsalve et al. (2006), Moya et al. (2007), López Miranda et al. (2009) realizando ciertas modificaciones para adaptarlas a la materia prima de estudio, siendo favorecedoras cuando se realiza una hidrólisis.

Lis et al. (2017) estudió las cáscaras de naranja y piña obteniendo 8.4 mg/g y 1.0 mg/g con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1%. Por otro lado, Moya et al. 2017 estudió los residuos de poda obteniendo valores entre 10 y 30 g/L

Nájera Martínez (2018) estudió la cascara de naranja, Orujo de manzana, Residuos de pera. con concentraciones de etanol de 14.4% hasta 29.5% g/L y una productividad desde 1.60 hasta 3.28 g/L/h. de etanol.

### 3. Justificación

En el 2016 la SENER, consideró que la demanda de gasolina regular proyectada para el 2030 se estima en 826.8 millones de barriles por día (MBPD), y sabiendo que la norma NOM-016 permite la mezcla con el 10% en volumen de bioetanol se necesitaría una producción de bioetanol de 4,798.3 ML/a para ser mezclados con gasolina. La SENER en el 2014 estimo que la capacidad nacional potencial para la producción de bioetanol que podría emplearse como mezcla en la gasolina, sería de 832 a 1,159 Millones de Litros al año (ML/a). bajo esto no es factible cubrir la demanda esperada de etanol con la capacidad actual y potencial de producción nacional.

En los últimos años ha sido necesario explorar nuevas materias primas para la producción de biocombustibles que no pongan en peligro la seguridad alimentaria y que ayuden a disminuir el consumo de los combustibles fósiles alargando la vida de los mismos.

Según datos del Anuario Estadístico de Producción Agrícola 2017. SAGARPA el amaranto cuenta con una producción de 139.91 toneladas (ton) y una superficie de siembra y cosecha de 122.80 hectáreas (ha). Generando aproximadamente 271,100 ton de residuo agrícola en cada ciclo de cultivo. De las cuales solo un 5% es utilizado como comida para ganado, otro 5% como abono para tierras y la mayor cantidad del rastrojo 90% es quemado causando altos índices de contaminación ambiental.

Actualmente el muérdago es una plaga que infesta cerca del 20% de las 70 especies de árboles que tiene la CDMX, es decir unos 500 mil árboles están afectados por algún tipo de muérdago llegando en ocasiones hasta generar la muerte de estos árboles, produciendo un desequilibrio al medio ambiente.

La importancia de este proyecto es que aún no se tiene ningún estudio con estas materias primas para producir bioetanol, si este resulta ser factible sería de gran impacto ya que se les daría un uso productivo; con el muérdago se estaría reduciendo una plaga en la ciudad de México y en cuanto al rastrojo del amaranto ya no se produciría contaminación; además, que se aportaría una nueva alternativa en la producción del biocombustible etanol.

#### 4. Hipótesis

El material lignocelulósico extraído del amaranto *amaranthus hypocondriacus* y del muérdago *Cladocolea Ioniceroides*, contiene azúcares fermentables en la pared celular que pueden ser utilizados para la producción de bioetanol, en una fermentación líquida sumergida y que pueden ser extraídos mediante una hidrólisis ácida y una hidrólisis enzimática.

## 5. Objetivos

### 5.1 Objetivo general

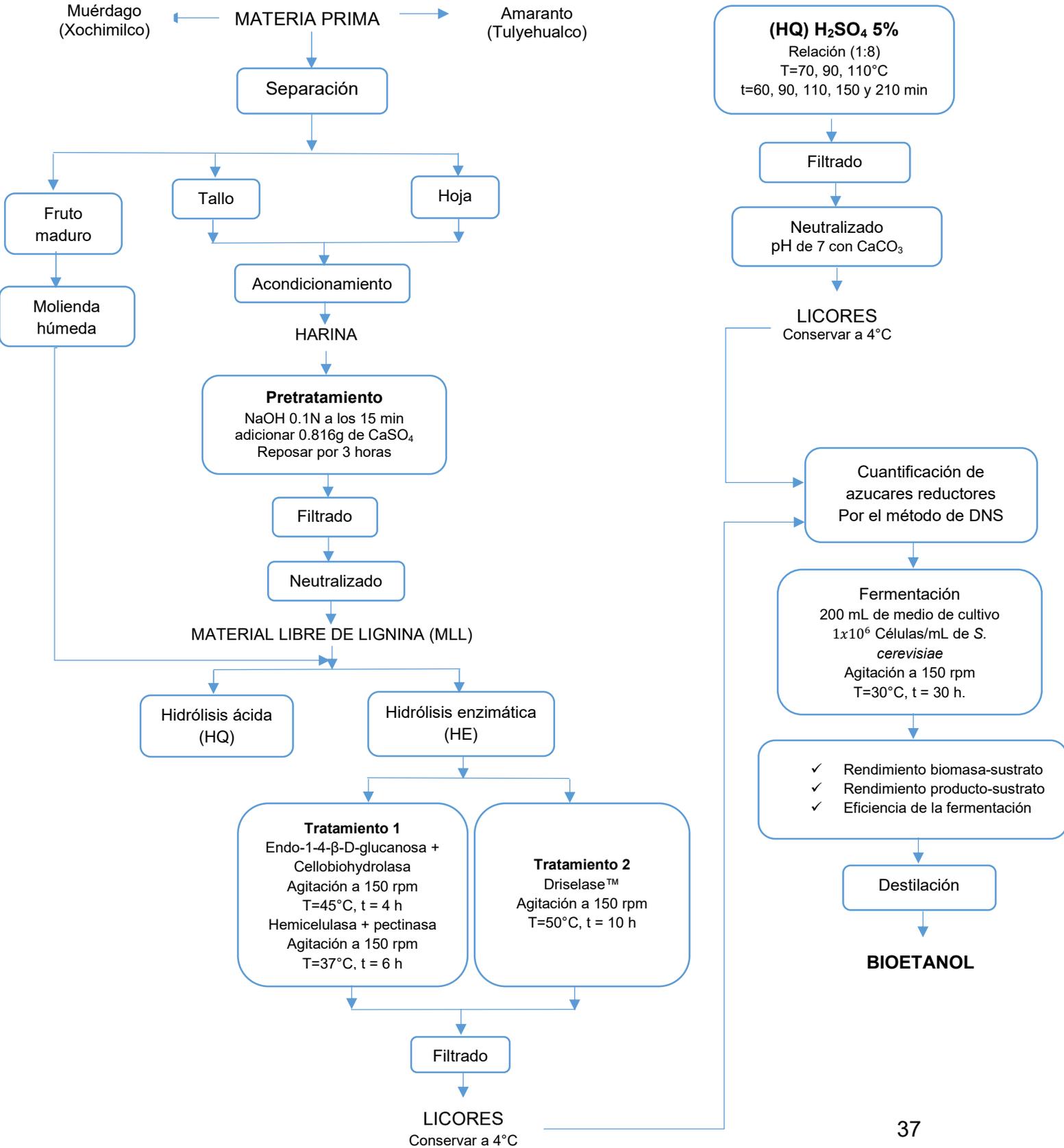
Evaluar el rendimiento de azúcares liberados por la hidrólisis química y enzimática del rastrojo del *Amaranthus hypochondriacus* y del muérdago *Cladocolea loniceroides* y para la obtención de bioetanol.

### 5.2 Objetivos específicos

- Estimar el tiempo y la temperatura óptima de la hidrólisis química de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) y de muérdago (*Cladocolea loniceroides*) para la obtención de azúcares fermentables.
- Comparar dos tratamientos enzimáticos para la hidrólisis de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) y de muérdago (*Cladocolea loniceroides*) para la obtención de azúcares fermentables mediante el uso de un reactor batch.
- Caracterización parcial de una fermentación sumergida de *Saccharomyces cerevisiae* para la obtención de bioetanol usando como sustrato licores fermentables de rastrojo de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) y de muérdago (*Cladocolea loniceroides*).

### 6. Metodología

A continuación, se describe de forma detallada la metodología general del trabajo.



## 6.1 Materiales

El amaranto *Amaranthus hypochondriacus* y el muérdago *Cladocolea loniceroides* utilizados en el presente proyecto se recolectaron de Santiago de Tulyehualco, Xochimilco y la zona Chinampera de Xochimilco respectivamente. Los reactivos empleados fueron de grado analítico.



(a)



(b)

Figura 5. a) Amaranto (*amaranthus hypochondriacus*) y b) Muérdago (*Cladocolea loniceroides*)

## 6.2 Acondicionamiento

La materia prima fue separada el muérdago en hoja, tallo y fruto y el rastrojo de amaranto; posteriormente se secó al aire libre, a continuación, se realizó la molienda con un molino Braun, y el tamizado en tamiz con malla de 420 micrones (No. 40) para homogenizar el tamaño de la partícula. La harina obtenida se sometió a un desengrasado con acetona en una relación de 1:5 en agitación constante a temperatura ambiente durante 16 horas realizando tres repeticiones. Para el fruto del muérdago se realizó una molienda húmeda.

## 6.3 Pretratamiento

A la harina previamente desengrasada se le realiza un proceso de deslignificación que consiste adicionar NaOH 0.1N, en relación 1:10 (p/v), con agitación constante durante 15 min. en un matraz. Posteriormente, se le agrega 0.816g de CaSO<sub>4</sub> a la mezcla y se deja reposar durante 3h. Se adiciona HCl 0.05N hasta llegar a un pH de 7 y se filtra. La fracción líquida donde se encuentra la lignina disuelta es eliminada y la fracción sólida que contiene la celulosa y la hemicelulosa es conservada para su posterior hidrólisis.

## 6.4 Hidrólisis ácida

Las muestras de rastrojo de amaranto y muérdago se colocaron en tubos de ensayo y se mezclaron con ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) al 5%, en una relación de 1:8

(p/v). los tubos de ensaye se metieron a un reactor a las temperaturas requeridas 70, 90, 110°C, variando los tiempos de reacción a 60, 90, 110, 150 y 210 minutos. Para detener la reacción y neutralizar la muestra se utilizó una solución saturada de carbonato de sodio hasta lograr un pH 7, los hidrolizados pasaron por una filtración posteriormente se sometieron a la cuantificación de azúcares reductores por el método de DNS.

### **6.5 Análisis estadístico**

Los resultados de los experimentos fueron evaluados mediante análisis de varianza (ANOVA) utilizando el software STATGRAPHICS Centurion versión de prueba, a un nivel de confianza del 95%.

### **6.6 Hidrólisis enzimática**

Se realizaron dos tratamientos; el primero consistió en realizar una hidrólisis de forma secuencial dejando que las enzimas utilizadas actuaran sobre el material lignocelulósico mezclando 1g de muestra con buffer de acetatos a pH 5, se adiciono 100µL de las enzimas Endo-1-4-β-glucanosa + Cellobiohidrolasa se incubo con agitación constante a 150rpm a una temperatura de 45°C durante 4h, pasado el periodo de incubación se adiciono Hemicelulasa + pectinasa, incubando a 37°C durante 6h en agitación a 150 rpm.

El segundo tratamiento consistió en utilizar el coctel de enzimas comercial Driselase™ que contiene celulasa, hemicelulasa y pectinasa en agitación a 150rpm a una temperatura de 50°C, y un tiempo de 10h.

### **6.7 Cuantificación de azúcares**

Los azúcares se cuantificaron por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) según Miller (1959) con algunas modificaciones. Para la cuantificación Se mezcló 0.5 mL del reactivo DNS con 0.5 mL de la muestra. Se agitó en vortex. Se llevó a baño maria durante 5 minutos. Se enfrió a temperatura ambiente. Se adiciono 5 mL de agua destilada y se agito en vortex, se dejó reposar durante 15 minutos y se procedió a medir la absorbancia en el espectrofotómetro a 540 nm las tomas fueron por triplicado.

Para la preparación de DNS se mezcló 1g de 3,5-dinitrosalicílico, 1g de NaOH, 0.05g de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> y 0.2g de cristales de fenol en 100 mL de agua destilada. Este reactivo se conservó en frascos ámbar a resguardo de la luz y fue estable hasta una semana.

## 6.8 Fermentación alcohólica

Para realizar el medio de cultivo se utilizó 170g/L de sacarosa que en este caso fueron los hidrolizados obtenidos de la hidrolisis acida y enzimática que presentaron mejores resultados en la liberación de azúcares fermentables, 1g/L de fosfato dipotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 0.5g/L de sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), 10g/L de peptona de carne y 5 g/L de extracto de levadura. A un pH de 5 previamente esterilizado.

Del inóculo se realizaron 60 ml para esto se utilizaron 1.2g de peptona, 1.2 g de glucosa y 0.6g de extracto de levadura pasa por una incubación con condiciones de un pH de 5, temperatura de 30°C por un tiempo de 24 horas. Se midió en el espectrofotómetro a 660nm hasta alcanzar una absorbancia de 1.6 y se procedió a inocular.

La fermentación se realizó con la levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* en matraces de 125mL con un volumen final de 40mL y un 2% del inóculo, en una incubadora a 30°C, durante 30 h. Se tomaron muestras en los tiempos 0, 5, 10, 15, 20, 25, y 30 h., a las cuales se les determinó la concentración de azúcares reductores por el método de DNS (Miller, 1959), la producción de etanol, además de la biomasa producida, por diferencia de peso, se calculó la eficiencia de la fermentación (Ecuación 1), rendimiento producto/sustrato Y P/S (Ecuación 2) y rendimiento biomasa/sustrato Y X/S (Ecuación 3).

## 6.9 parámetros de fermentación

### Cuantificación de Biomasa

Se realizó la técnica de diferencia de peso seco por gravimetría, se pesaron los tubos Eppendorf antes de agregar la muestra, los tubos se centrifugaron a 5000rpm durante 15 minutos, después se separa el sobrenadante y se mete a secar durante una hora a 70°C en una estufa, al finalizar el tiempo se pesa de nuevo el tubo Eppendorf y se cuantifica la biomasa por diferencia de pesos.

### Cuantificación de etanol

Para la cuantificación de etanol se realizó el método propuesto por Ramos S. J. y Martínez J. F., 2014 con ligeras modificaciones. Se realizaron 5 soluciones de etanol (SE) al 1, 2, 3, 4 y 5% v/v; se realizó una solución saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (SC); y Posteriormente se realizó una solución madre (SM) en una relación (1:1.6) de (SSF:SA) una mezcla sulfocrómica (SSF) con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 12.88% con 0.75g de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  y una solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 13.72% (SA). Posteriormente, en cajas Petri se introdujeron 2 contenedores, el primero con 3mL de SM y el

segundo 2mL de SC más 1mL de la SE. Las celdas se sellaron herméticamente se metieron en la estufa durante 20min a 35°C, posteriormente el contenido de la SM se leyó en el espectrofotómetro a 400nm obteniendo una curva de absorbancia y concentración de etanol.

$$EF (g/g) = \frac{R_{ET}}{R_{ET \text{ teórico}}} \text{ (Ecuación 1)}$$

$$Y_{P/S} = \frac{(P_f - P_i)}{(S_i - S_f)} \text{ (Ecuación 2)}$$

$$Y_{X/S} = \frac{(X_f - X_i)}{(S_i - S_f)} \text{ (Ecuación 3)}$$

Donde  $R_{ET \text{ teórico}}$  es el máximo rendimiento de etanol a partir de glucosa reportado por la literatura con un valor de 0.469g de etanol/g de glucosa.

$P_i$  es la concentración inicial de etanol;  $P_f$  es la concentración final de etanol;  $S_i$  es la concentración de azúcares inicial;  $S_f$  es la concentración de azúcares final consumidos;  $X_i$  es la concentración de biomasa inicial;  $X_f$  es la concentración de biomasa final.

## 7. Resultados y discusión

### 7.1 Rendimientos del material lignocelulósico

Durante el acondicionamiento de la materia prima se observan pérdidas después de la molienda y tamizado de aproximadamente un 13 a un 20% debido a que disminuyen de tamaño las partículas de harina, y se desechan todas las harinas finas, es decir, menores a 420 micrones. En el desengrasado se observó que se pierde de 3 a un 23% y al realizar el pretratamiento con NaOH que degrada la lignina y el  $\text{CaSO}_4$  que evita la degradación de la celulosa causada por el NaOH se observó una pérdida de 4 hasta 14%, reportada en la tabla 4.

Tabla 4. Rendimientos del material lignocelulósico del amaranto y el muérdago durante la obtención de harinas.

| Procesos              | Amaranto |          |          | Muérdago |          |       |
|-----------------------|----------|----------|----------|----------|----------|-------|
|                       | Tallo    | hoja     | R.A.     | Tallo    | hoja     | fruto |
| Acondicionamiento     | 87±0.24g | 82±0.36g | 85±0.12g | 86±0.18g | 80±0.31g | -     |
| Harina desengrasada   | 84±0.11g | 63±0.71g | 79±0.16g | 81±0.28g | 57±0.62g | -     |
| Harina deslignificada | 70±0.28g | 56±0.39g | 75±0.23g | 73±0.17g | 51±0.22g | -     |

### Balance general

En la figura 6. Se presenta el balance general de rendimientos del tallo de amaranto después del acondicionamiento y pretratamiento. Se observa un rendimiento total de 51.1% y pérdidas de 48.9%.

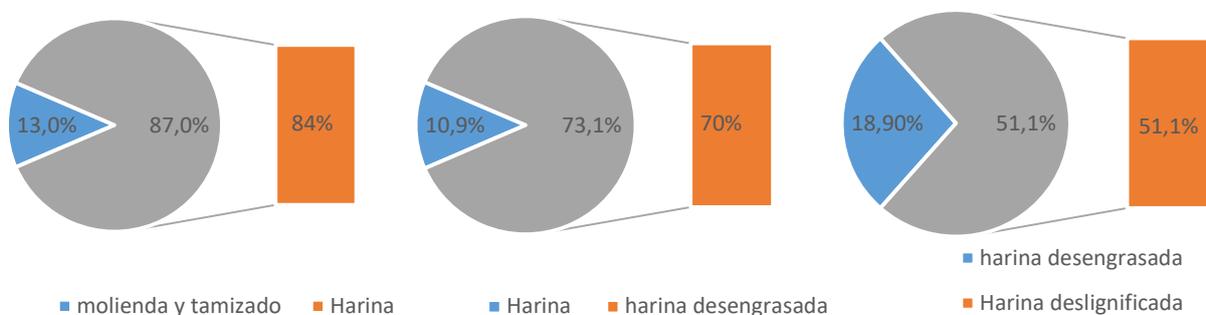


Figura 6. Rendimientos del tallo de amaranto después del acondicionamiento y pretratamiento

Para la hoja de amaranto se puede observar en la figura 7. que se pierde la mayor cantidad de biomasa en la deslignificación, seguido del acondicionamiento y finalizando con el desengrasado acumulando pérdidas de hasta 71.1% y observando un rendimiento menor de hasta 28.9%.

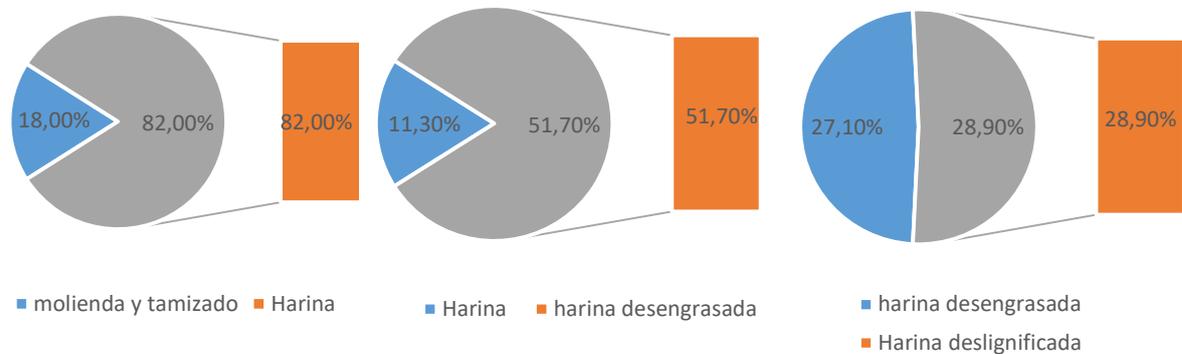


Figura 7. Rendimientos de la hoja de amaranto después del acondicionamiento y pretratamiento.

En la figura 8. Se presentan los rendimientos obtenidos del rastrojo de amaranto donde podemos observar pérdidas al realizar la obtención de harina, el desengrasado con acetona y la deslignificación de hasta 49.6% logrando un rendimiento total de 50.4%.

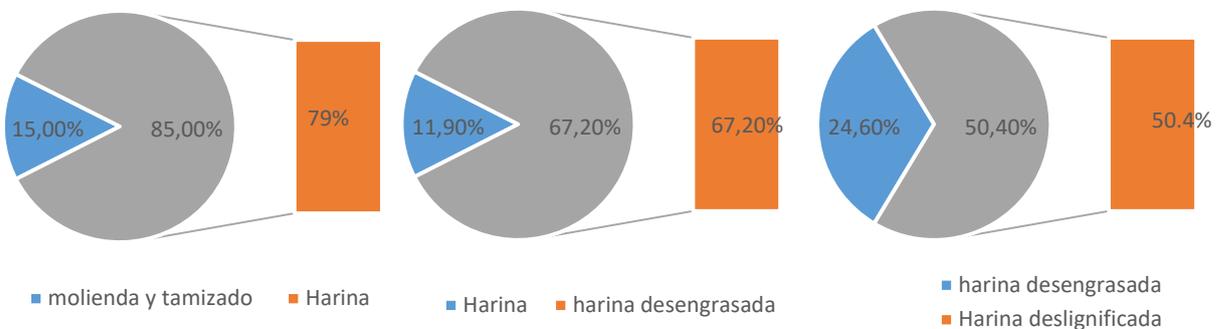


Figura 8. Rendimientos del rastrojo de amaranto después del acondicionamiento y pretratamiento.

Al realizar el balance de la biomasa de amaranto se observa en la hoja mayores pérdidas aproximadamente 71%, por consiguiente, un menor rendimiento de solo 28.9% esto debido a los compuestos extraíbles como son polifenoles, pectinas, pigmentos, entre otros, los cuales al realizar el acondicionamiento y pretratamiento se extraen del material lignocelulósico (Ordoñez K. y Sepúlveda C., 2019). seguidos del tallo y el rastrojo de amaranto que presentaron diferencias insignificantes entre sí, pérdidas de aproximadamente 50% y mejores rendimientos de más del 50%.

Para el muérdago se observa en la figura 9. los rendimientos obtenidos durante el proceso de acondicionamiento y pretratamiento del tallo de muérdago, con un rendimiento de más del 50% y pérdidas de hasta 49.1%

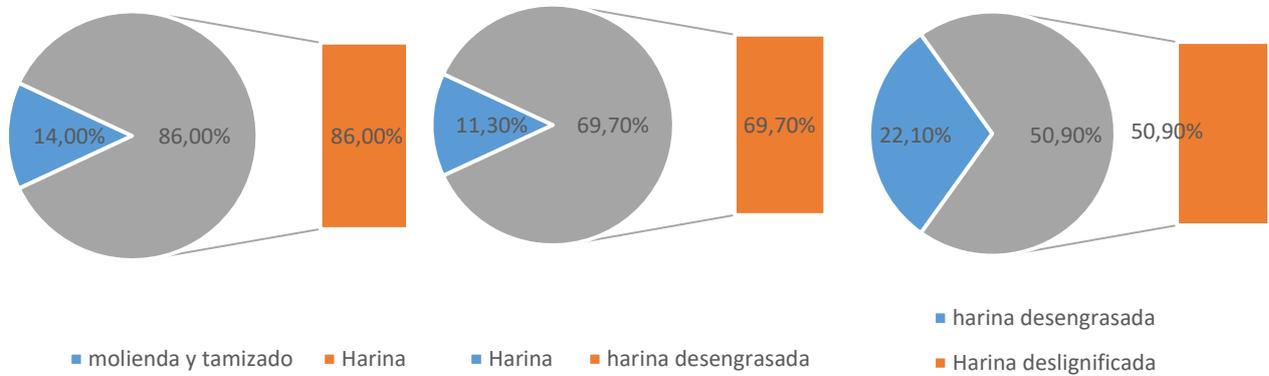


Figura 9. rendimientos de tallo de muérdago después del acondicionamiento y pretratamiento.

En la figura 10. se observa el rendimiento de la hoja de muérdago observando pérdidas mayores para todo el proceso de aproximadamente 76% y un rendimiento no mas de 24%.

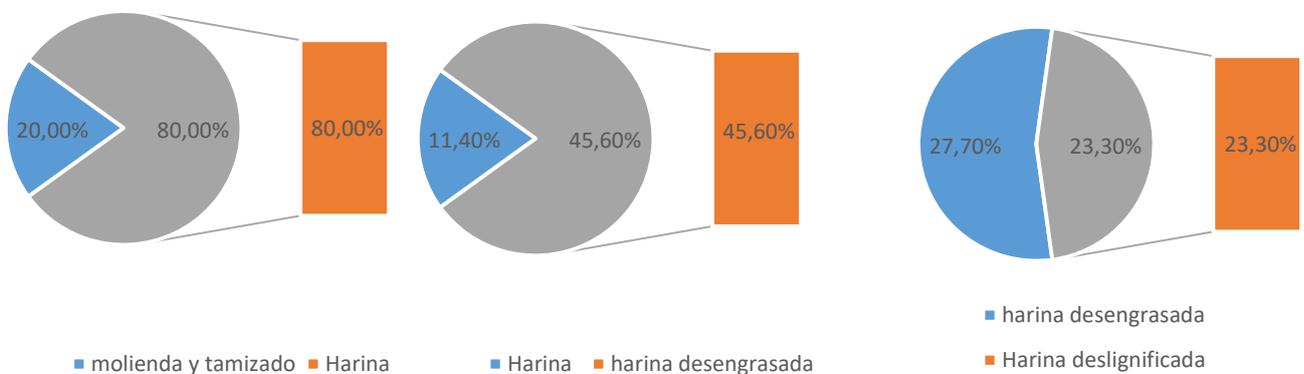


Figura 10. rendimientos de la hoja de muérdago después del acondicionamiento y pretratamiento.

Al observar el comportamiento del muérdago se puede decir que la hoja del muérdago presenta mayores pérdidas esto debido a los compuestos extraíbles, aproximadamente 76% mientras que para el tallo se tiene 49.1% siendo este el que mejor rendimiento presenta de hasta 50.9%, esto debido a que el tallo es parte de la composición estructural de la planta.

## 7.2 Hidrólisis ácida

La matriz lignocelulósica de amaranto y merdago fueron utilizados como material rico en celulosa y hemicelulosa. Durante la hidrólisis química, se pudo observar la liberación de azúcares reductores (AR). Los resultados de la hidrólisis ácida sobre la planta de amaranto se observan en la figura 11, 12 y 13.

En la figura 11 para el tallo de amaranto se pudo obtener una liberación de azúcares de hasta  $7.01 \pm 0.28$  g de glucosa a una temperatura de  $110^\circ\text{C}$  y un tiempo de 150min.

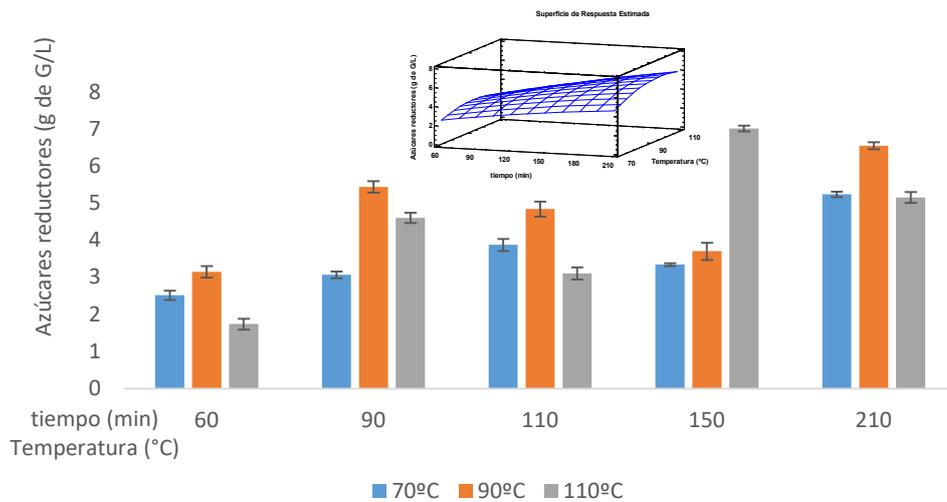


Figura 11. Cuantificación de azúcares reductores del tallo de amaranto

Como se observa en la figura 12 la hoja de amaranto presenta el máximo de azúcares a la temperatura menor, es decir,  $70^\circ\text{C}$  y un tiempo de 90 min, pero su rendimiento fue bajo al observarse solo una liberación de  $3.86 \pm 0.45$  g de glucosa.

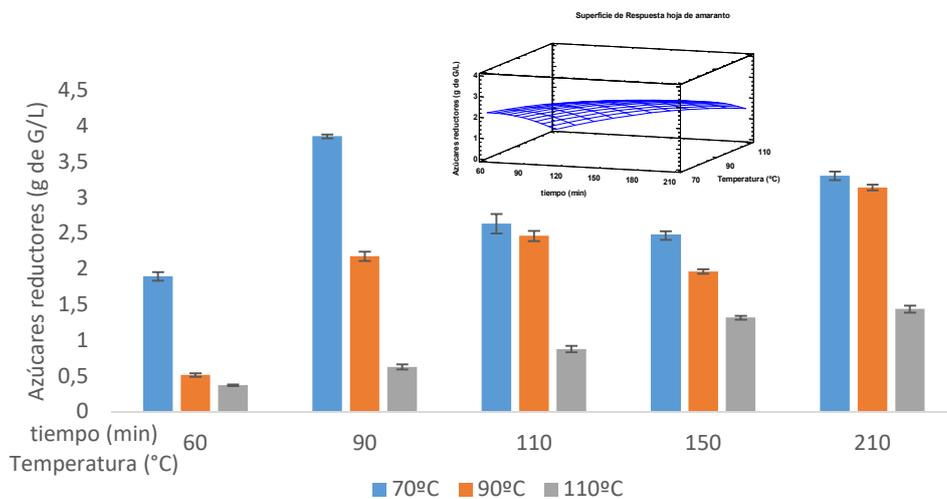


Figura 12. Cuantificación de azúcares reductores de la hoja del amaranto

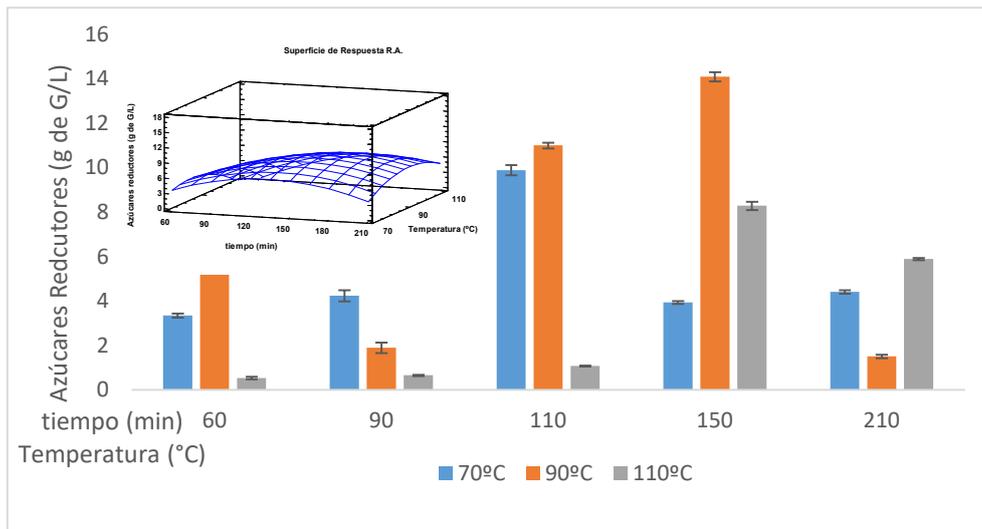


Figura 13. Cuantificación de azúcares reductores del rastrojo de amaranto

Como se observa en la figura 13. el rastrojo de amaranto (RA) presenta la mayor liberación de azúcares reductores hasta  $14.10 \pm 0.36$  g de glucosa/ g harina de RA este valor se alcanza cuando la hidrólisis ácida está a temperatura de  $90^\circ\text{C}$  y un tiempo de 150min.

El rastrojo de amaranto presentó una liberación de azúcares mayor  $14.10 \pm 0.36$  g de glucosa, comparado con el tallo se obtuvo  $7 \pm 0.28$  g de glucosa, es decir, aproximadamente el doble y con la hoja de amaranto  $3.86 \pm 0.45$  g de glucosa, se alcanzó azúcares fermentables de hasta 5 veces más.

De acuerdo a lo reportado por Chamy et al., (2014), donde realiza una hidrólisis ácida con 6% de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  durante 2h sobre pulpa de remolacha obteniendo 3g de G/g de pulpa de remolacha. Podemos observar que la liberación de azúcares es mayor para el rastrojo de amaranto obteniendo aproximadamente 5 veces más a las 2.5 horas de hidrólisis.

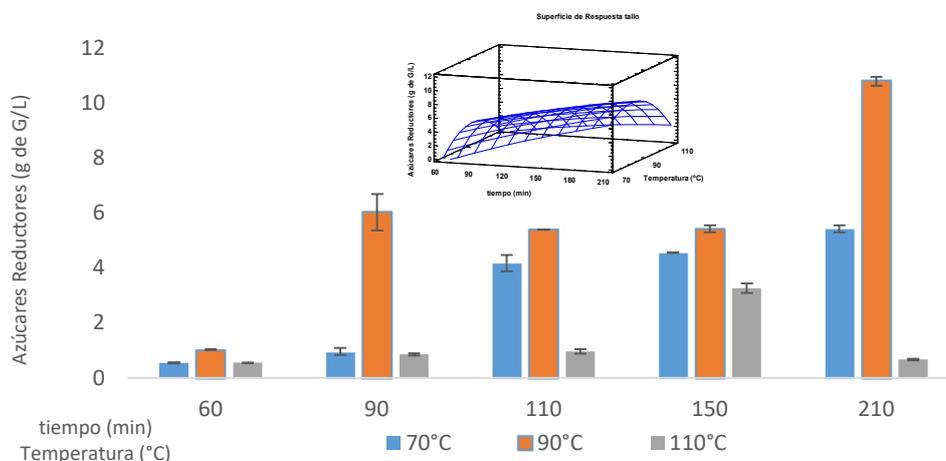


Figura 14. Cuantificación de azúcares reductores para el tallo de muérdago.

En la figura 14. Se pueden observar los azúcares liberados en el tallo de muérdago la mayor producción fue de  $10.79 \pm 0.21$  g de glucosa/ g de tallo de muérdago y se consiguió a la temperatura de  $90^{\circ}\text{C}$  y un tiempo de 210min.

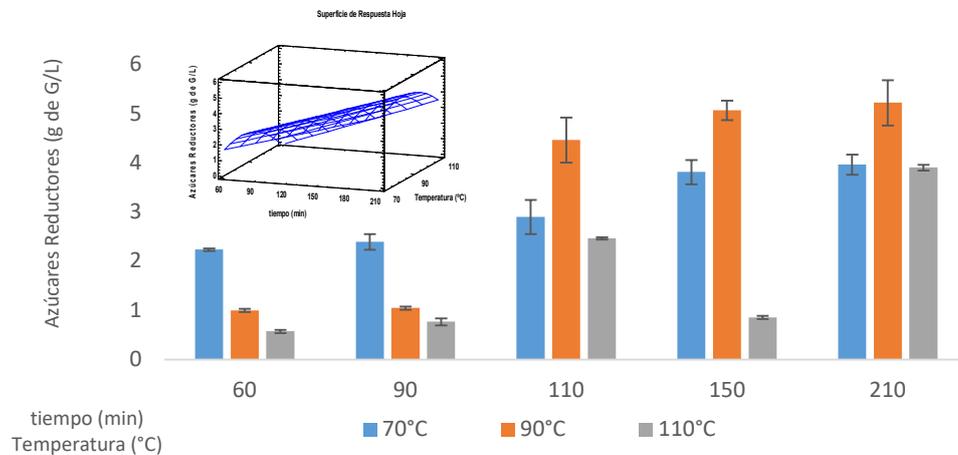


Figura 15. Cuantificación de azúcares reductores para la hoja de muérdago.

Para la hoja de muérdago se obtuvo hasta  $5.22 \pm 0.17$  g de G a la temperatura de  $90^{\circ}\text{C}$  y un tiempo de 210min como se observa en la figura 15.

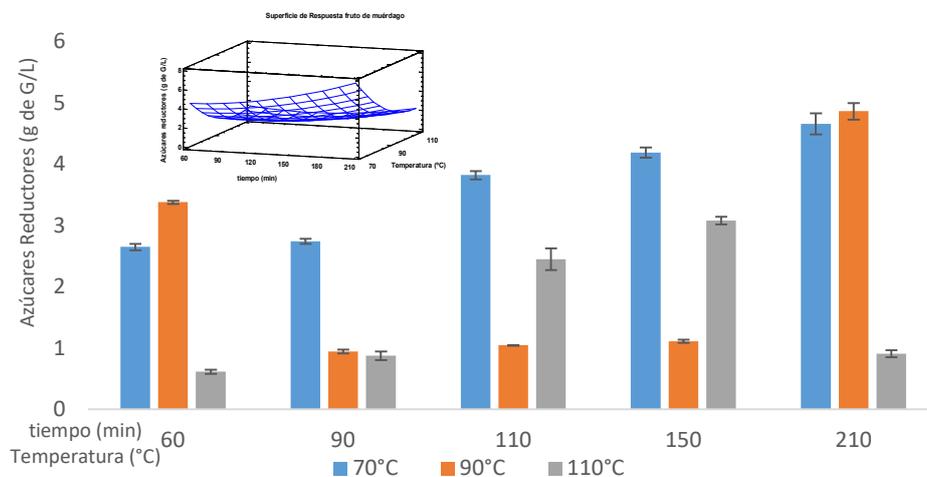


Figura 16. Cuantificación de azúcares reductores en el fruto del muérdago.

Como se observa en la figura 16. En el fruto del muérdago se observó la menor liberación de azúcares  $4.86 \pm 0.32$  g de G al alcanzar la temperatura de  $90^{\circ}\text{C}$  y un tiempo máximo de 210min.

Al realizar la hidrólisis ácida en la planta de muérdago con los parámetros de temperatura y tiempo evaluados se observó que la mayor liberación de azúcares reductores se tiene a una temperatura de  $90^{\circ}\text{C}$  durante 210 min., esta se da en el tallo de la planta por ser el que posee una matriz lignocelulósica mayor se obtuvo  $10.7 \pm 1$  g de glucosa/ g de harina de tallo de muérdago. para la hoja y

fruto no se encuentran diferencias notables; los dos materiales lignocelulósicos presentan una hidrólisis en tiempos y temperaturas iguales a 210min y 90°C y su rendimiento es casi similar.

Al comparar los datos experimentales podemos observar que el rastrojo de amaranto presenta hasta 1.5% más liberación de azúcares reductores comparado con el tallo de muérdago. En general, la mayor parte de la reacción se ha producido a la temperatura de 90°C y a los tiempos mayores 150 y 210 minutos.

Granados et al. (2017), pretrataron pericarpio de maíz en una relación 20% p/v con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 3.37% durante 22.3 min a 121°C y obtuvieron 78.9 ± 1.0 g azúcares reductores/L, concentración superior a las obtenidas en este trabajo, utilizando una relación mayor de maíz con una concentración menor de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, en este caso el material lignocelulósico, el tamaño de partícula, la concentración, el pretratamiento y la temperatura pudo haber permitido una menor liberación de azúcares. Los resultados obtenidos en el rastrojo de amaranto y en el tallo del muérdago son aproximadamente 26 y 21 veces más que lo reportado por Albarracín et al., (2017), donde se realiza la hidrólisis ácida con 8% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> durante 6h sobre paja obteniendo 0.41 g de glucosa/g de paja. Lo que puede significar que al realizar una deslignificación del material lignocelulósico y romper los compuestos inhibidores se obtiene una mayor liberación de azúcares.

### 7.3 Análisis estadístico

Basado en los resultados de los azúcares liberados obtenidos de la hidrólisis ácida, se realiza la predicción de los modelos matemáticos y la R<sup>2</sup> del material lignocelulósico como se muestra en la tabla 5. mediante el análisis estadístico.

Tabla 5. Modelos matemáticos de la biomasa lignocelulósica estudiada.

| BIOMASA LIGNOCELULÓSICA | MODELO MATEMÁTICO AR= |          |          |                |            |                |                |
|-------------------------|-----------------------|----------|----------|----------------|------------|----------------|----------------|
|                         | c                     | X        | Y        | X <sup>2</sup> | XY         | Y <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> |
| Tallo de amaranto       | -12,5879              | 0,006384 | 0,33317  | -0,00003586    | 0,00023448 | -0,001927      | 55,86          |
| Hoja de amaranto        | 2,07607               | 0,013738 | 0,01737  | -0,00005145    | 0,00009352 | -0,0004315     | 77,06          |
| Rastrojo de amaranto    | -40,2156              | 0,079202 | 0,97783  | -0,00058166    | 0,00110242 | 0,0065191      | 39,24          |
| Tallo de muérdago       | -70,0322              | 0,099629 | 1,54897  | -0,00006830    | -0,0005773 | -0,0084741     | 77,25          |
| Hoja de muérdago        | 5,40326               | 0,028393 | -0,04493 | 0,00000746     | -0,0000708 | 0,0001395      | 84,82          |
| Fruto de muérdago       | 35,4414               | 0,018621 | -0,68687 | 0,00011149     | -0,0003964 | 0,0035311      | 79,59          |

Donde, DNS: es la cantidad de azúcares reductores (g de G/L)

X: tiempo (min) Y: Temperatura (°C)

Los ácidos son el tratamiento más utilizado para la hidrólisis de material lignocelulósico debido al bajo costo; éstos rompen la celulosa y hemicelulosa en monosacáridos como xilosa, glucosa y arabinosa principalmente. cuando se incorpora ácido, la temperatura y el tiempo de reacción son de vital importancia en la generación de azúcares reductores.

Dentro de los parámetros analizados se observo por medio del diagrama de Pareto los efectos que tienen las variables estudiadas en cada muestra y la optimización del proceso mediante los contornos de la superficie. Para el tallo de amaranto se observa en la figura 17. que la variable A en este caso el tiempo no tiene un efecto directo sobre la obtención de azúcares reductores.

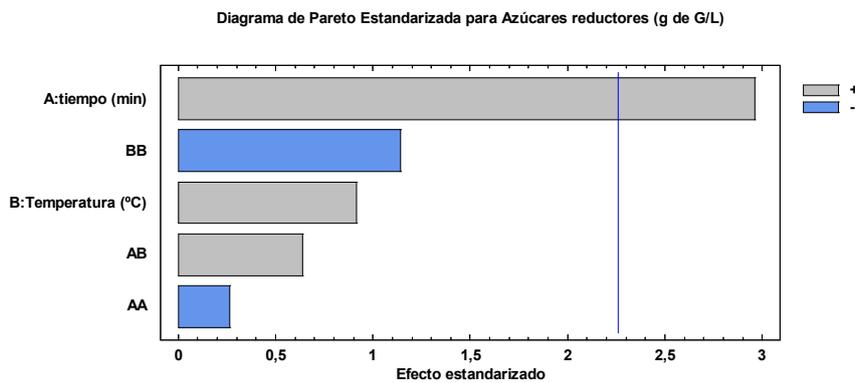


Figura 17. Diagrama de Pareto del tallo de amaranto

La optimización en este proceso de acuerdo a los contornos de superficie no se alcanza a observar totalmente definida, se da cuando la temperatura alcanza los 70°C y el tiempo máximo 210 minutos obteniendo un valor óptimo de 6.82g de G/L. como se observa en la figura 18.

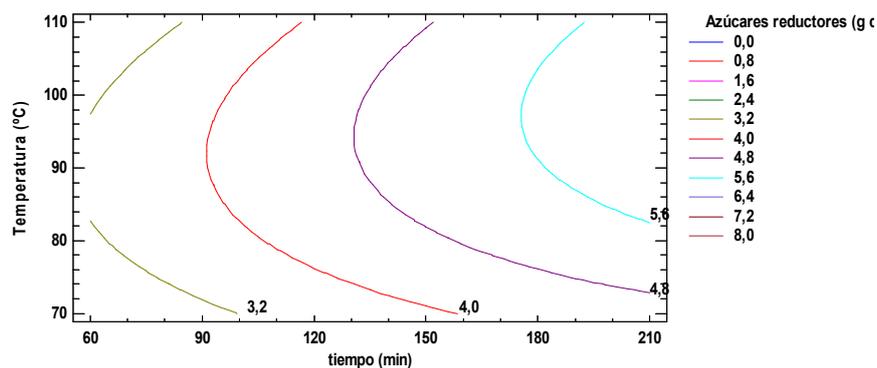


Figura 18. Contornos de la superficie de optimización para el tallo de amaranto.

En el diagrama de Pareto de la hoja de amaranto se puede observar que la variable B que es temperatura y la variable A definida como tiempo al analizarse por si solas no tienen un efecto directo en la obtención de azucares reductores.

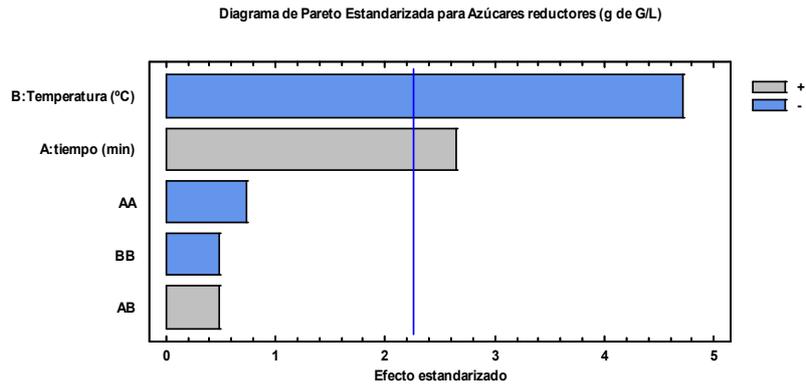


Figura 19. Diagrama de Pareto de la hoja de amaranto

En la figura 20. Se observa la optimización en la hoja de amaranto esta se da cuando la temperatura alcanza los 70°C y un tiempo de 197 minutos, obteniendo un valor óptimo de 3.17g de G/L.

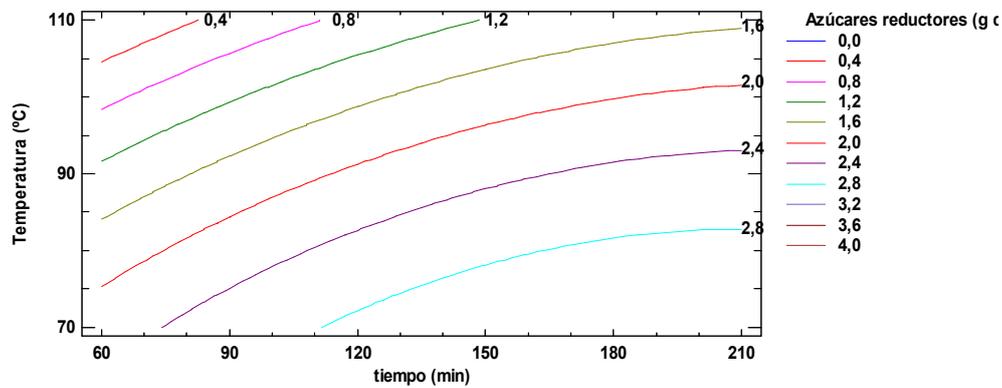


Figura 20. Contornos de superficie de Optimización de la hoja de amaranto.

Al analizar en la figura 20 el diagrama de Pareto del Rastrojo de amaranto se observa que todas las variables tienen un efecto directo en la obtención de azúcares reductores.

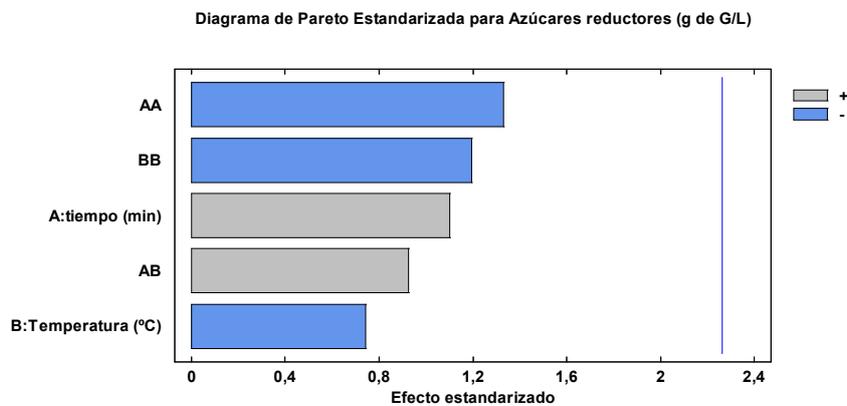


Figura 21. Diagrama de Pareto del Rastrojo de Amaranto.

En la figura 22. Se observa de forma definida la optimización en el rastrojo de amaranto, se presenta cuando la temperatura alcanza los 87.7°C y un tiempo de 151 minutos obteniendo un valor óptimo de 8.69g de G/L.

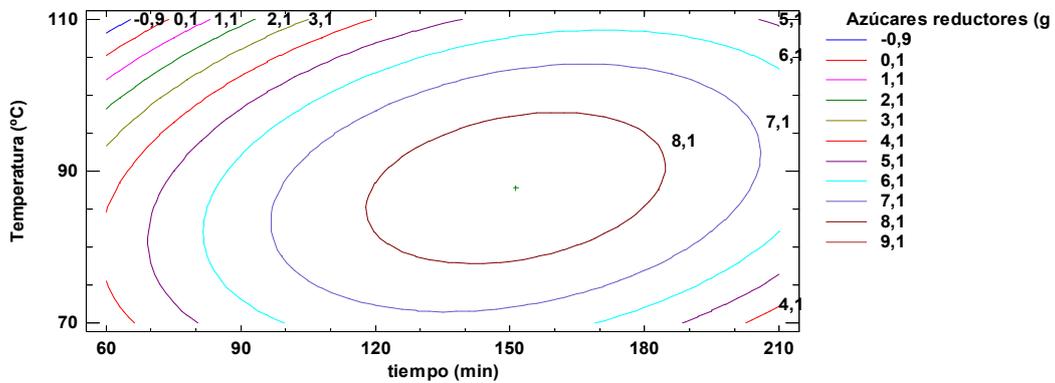


Figura 22. Contornos de superficie de optimización para el rastrojo de amaranto

En el diagrama de Pareto para el tallo de muérdago se observa en la figura 23. que la variable temperatura es la que presenta un efecto directo en la obtención de azúcares reductores.

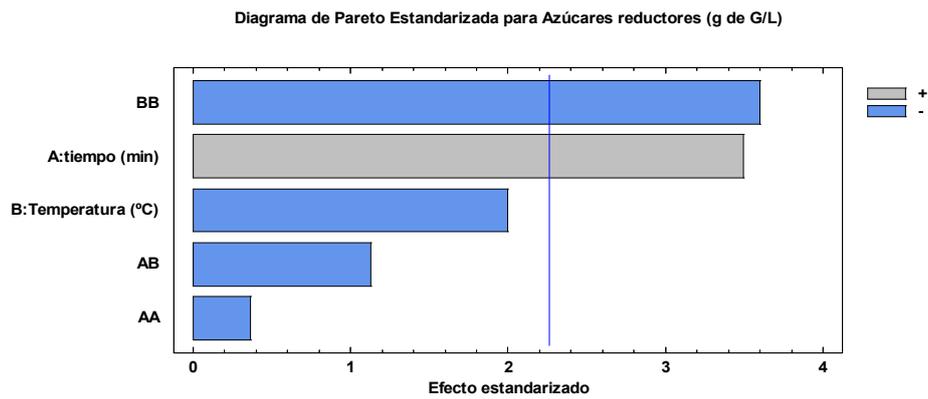


Figura 23. Diagrama de Pareto para el tallo de muérdago.

En la figura 24. Se observa la optimización en el tallo de muérdago cuando la temperatura alcanza los 84.2°C y el tiempo 210 minutos obteniendo un valor óptimo de 8.01g de G/L

## Resultados y discusión

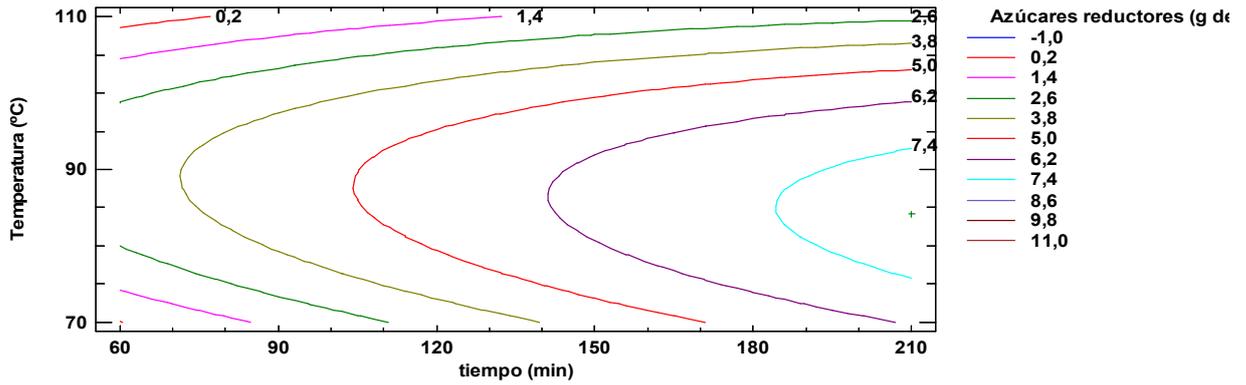


Figura 24. Contornos de superficie de optimización del tallo de muérdago

Para la hoja de muérdago se observa en el diagrama de Pareto figura 25. que ninguna variable analizada individualmente presenta un efecto directo en la obtención de azúcares reductores.

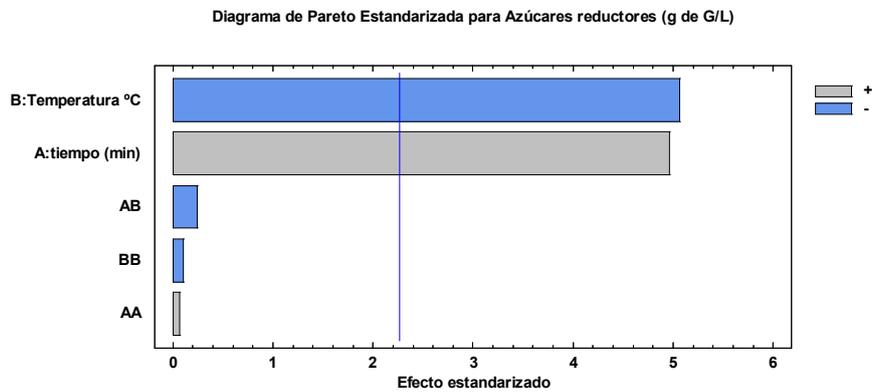


Figura 25. Diagrama de Pareto para la hoja de muérdago

La optimización en la hoja de muérdago se presenta cuando la temperatura alcanza los 70°C y un tiempo de 210 minutos obteniendo un valor óptimo de hasta 6.82g de G/L.

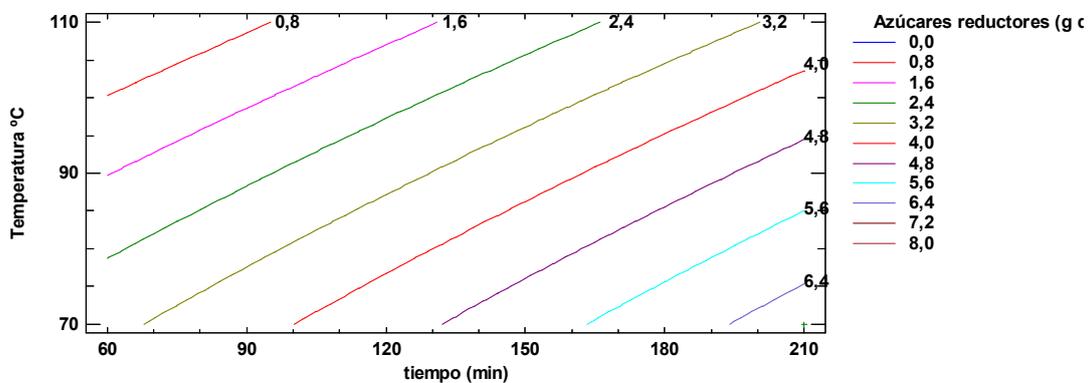


Figura 26. Contornos de superficie de optimización de la hoja de muérdago.

En la figura 27. Se presenta el diagrama de Pareto para el fruto de muérdago donde se observa que la variable temperatura no presenta un efecto directo en la obtención de azúcares reductores.

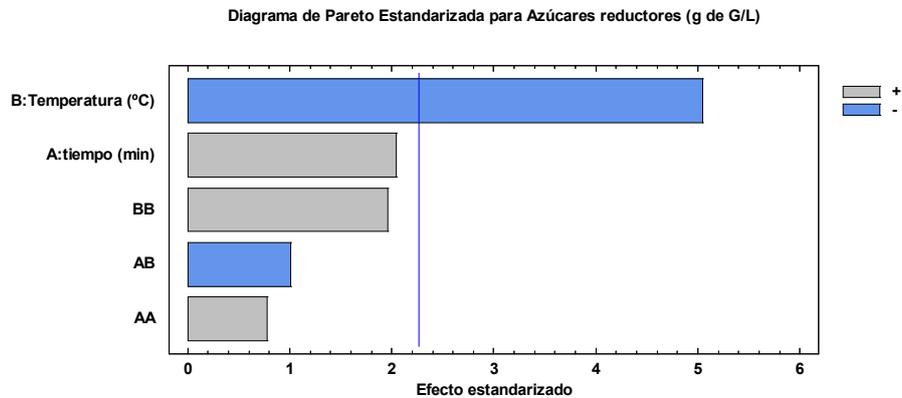


Figura 27. Diagrama de Pareto para el fruto del muérdago.

En la figura 28. Se presenta la optimización en el fruto del muérdago donde se observa que a la temperatura de 70°C y un tiempo de 210 minutos se obtiene un valor óptimo de 7.66g de G/L

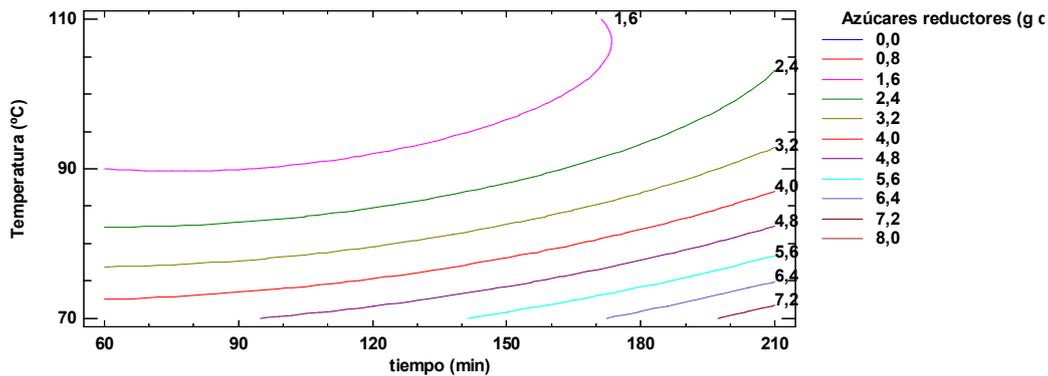


Figura 28. Contornos de superficie de optimización para fruto de muérdago.

#### 7.4 Hidrólisis enzimática

Los materiales resultantes del pretratamiento ácido con mayores concentraciones de azúcares fueron sometidos a hidrólisis enzimática en dos tratamientos.

Se determinó la concentración de azúcares reductores producidas durante las 10h de hidrólisis. Como se puede observar en la figura 29. con el primer tratamiento enzimático empleando las enzimas por separadas endo-1-4-β-D-glucanosa + cellobiohidrolasa los perfiles de sacarificación enzimática presentan similar comportamiento para ambos materiales lignocelulósicos. La hidrólisis enzimática del rastrojo de amaranto después de 10 h, permitió la

obtención de  $30.88 \pm 0.35$  g azúcares reductores/L mientras que para el tallo se obtuvieron concentraciones más bajas  $21.27 \pm 0.32$  g azúcares reductores/L. Se pudo observar que se encontraron diferencias entre las concentraciones de azúcares reductores después de transcurrir las 2h de reacción y al agregar las enzimas hemicelulasa y pectinasa, después de las 4h se observó una aceleración en el incremento de azúcares.

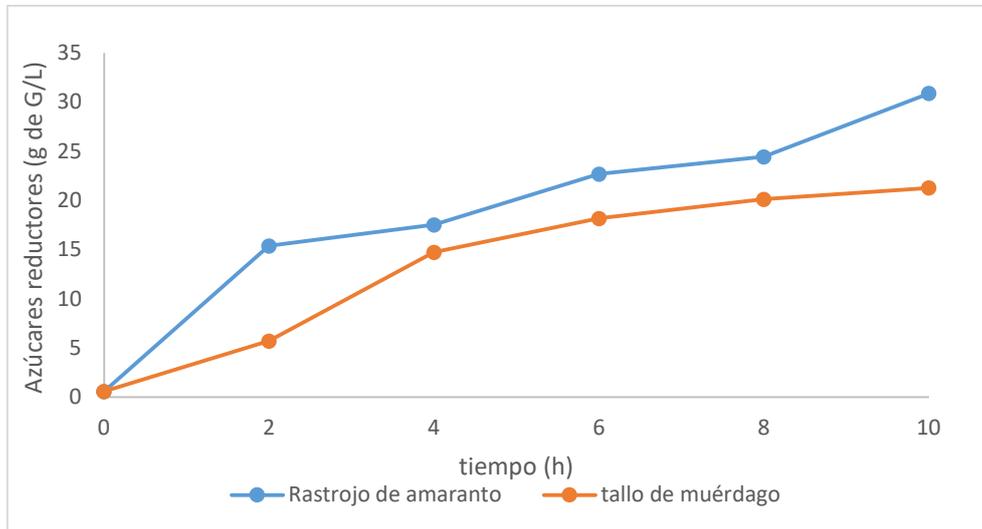


Figura 29. Producción de azúcares reductores durante la hidrólisis enzimática de tallo de muérdago y rastrojo de amaranto con el primer tratamiento enzimático: Endo 1-4-β-D-glucanosa + cellobiohidrolasa + hemicelulasa + pectinasa.

En la figura 30. Se presenta la cuantificación de azúcares reductores que se producen al realizar la hidrólisis utilizando el segundo tratamiento enzimático con la enzima comercial Driselase™ los perfiles de sacarificación enzimática presentan un comportamiento con diferencias significativas para ambos materiales lignocelulósicos. La hidrólisis enzimática del tallo después de transcurrir las 10 h, permitió la obtención de  $17.01 \pm 0.74$  g azúcares reductores/L mientras que para el rastrojo de amaranto se obtuvieron concentraciones de hasta  $19.66 \pm 0.29$  g azúcares reductores/L. Se pudo observar diferentes comportamientos para los dos materiales; para el tallo se tuvo una aceleración en el crecimiento hasta llegar a las 6h de reacción donde observamos que los valores cuantificados comenzaron a descender, sin embargo, para el rastrojo de amaranto se observa una mayor variación en los valores se observó una

aceleración al llegar a las 4h de hidrólisis y a las 8h los valores medidos comienzan a bajar.

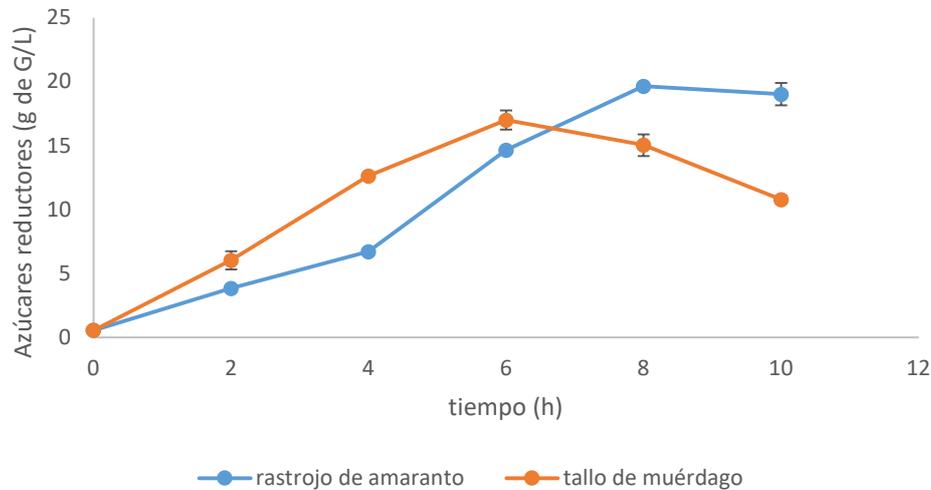


Figura 30. Producción de azúcares reductores durante la hidrólisis enzimática de tallo de muérdago y rastrojo de amaranto con el segundo tratamiento enzimático Driselase™.

Comparando los dos tratamientos podemos observar que con el primer tratamiento se obtienen mejores resultados hasta  $30.88 \pm 0.35$  g azúcares reductores/L, al utilizar este tratamiento de forma secuencial permite que las enzimas lleguen a romper los enlaces y producir una mayor cantidad de glucosa debido a que la enzima cellobiohidrolasa y la enzima Endo-1-4- $\beta$ -D-glucanasa degradan mayor parte del material lignocelulósico de la hemicelulosa y la celulosa. Con el segundo tratamiento se obtuvo una menor cantidad hasta  $19.66 \pm 0.29$  g azúcares reductores/L. Driselase™ es una enzima degradante de la pared celular que contiene celulasa, hemicelulasa, pectinasa. Al utilizar un complejo de actividad celulasa se esperaba un resultado favorable pero la baja efectividad de Driselase™ puede deberse a una posible limitación de accesibilidad al sustrato, un alto contenido de lignina, la presencia de inhibidores o el grado de porosidad del material lignocelulósico.

En la literatura se reportan diversos complejos enzimáticos para la hidrólisis de algunas biomásas lignocelulósicas, con diferentes concentraciones de glucosa, según el material, pretratamiento aplicado, enzimas utilizadas, concentración de sólidos y tiempo de hidrólisis.

Al comparar los resultados obtenidos con lo investigado se observa que en este trabajo se obtuvo aproximadamente el doble de lo reportado por Cruz Cardona et al., 2019 quien aplicó un conjunto enzimático en la cascarilla de cebada con un pH 5.0 a 50°C por un tiempo de 5h obteniendo 16.5g/L, y Romero Bonilla et al., 2019 quien reportó azúcares reductores de hasta 14.85g/L al hidrolizar la cascara de banano empleado un conjunto de enzimas celulasas. Sin embargo, Caspeta et al. (2014), hidrolizaron bagazo de agave pretratado, empleando concentraciones de 2, 5 y 10 % de sólidos /100 mL, al usar 15 UPF de celulosa

y 30 unidades de celobiosa (CBU) mediante el uso de  $\beta$ -glucosidasa por cada gramo de sólido. obteniendo concentraciones máximas de glucosa de 15.1, 34.0 y 42 g/L, valor mayor a lo reportado en este trabajo, puede ser debido a la concentración utilizada.

Los hidrolizados ácidos y enzimáticos con mejor liberación de azúcares pueden ser utilizados para la producción de bioetanol usando *Saccharomyce cerevisiae*, puesto que es una levadura comúnmente aplicada para la producción de este biocombustible debido al efectivo consumo de glucosa y la alta tolerancia al etanol (Li et al., 2017).

#### 7.4 Fermentación alcohólica

La biomasa lignocelulósica con mejor liberación de azúcares resultante de la hidrólisis ácida y enzimática fue fermentada por la levadura comercial (*Saccharomyce cerevisiae*) obteniendo una concentración máxima de etanol de  $42 \pm 0.18$  g/L a las 30 horas de fermentación a temperatura constante de  $30^\circ\text{C}$ .

La figura 31. muestra el consumo de azucares reductores y el aumento de la biomasa en los hidrolizados ácidos del rastrojo de amaranto durante las 30h de fermentación. Se puede observar una fase de adaptación corta y una fase exponencial. El valor máximo de crecimiento fue de 13 g/L y para el consumo de sustrato se observó un consumo favorable de hasta 87.64%.

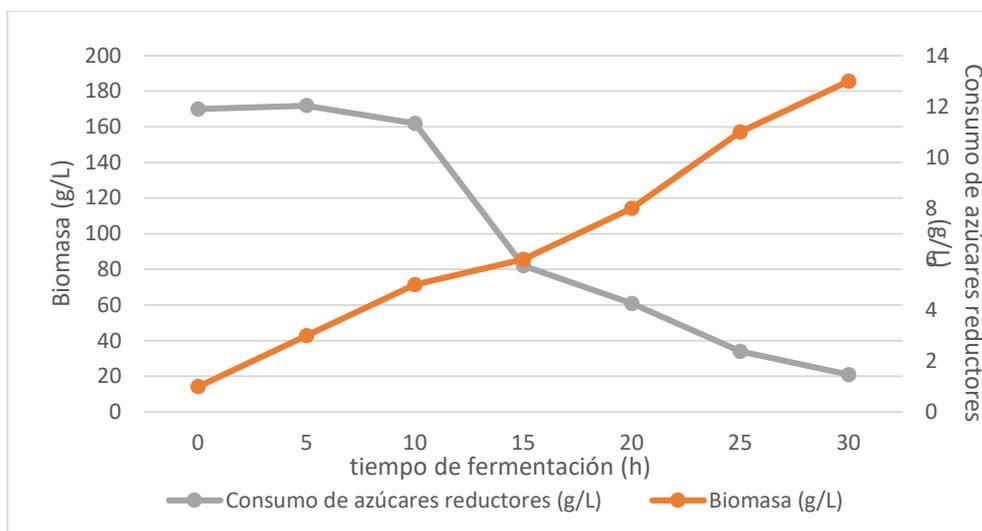


Figura 31. Biomasa y consumo de azúcares reductores de *S. Cerevisiae* durante la fermentación de hidrolizados ácidos del rastrojo de amaranto.

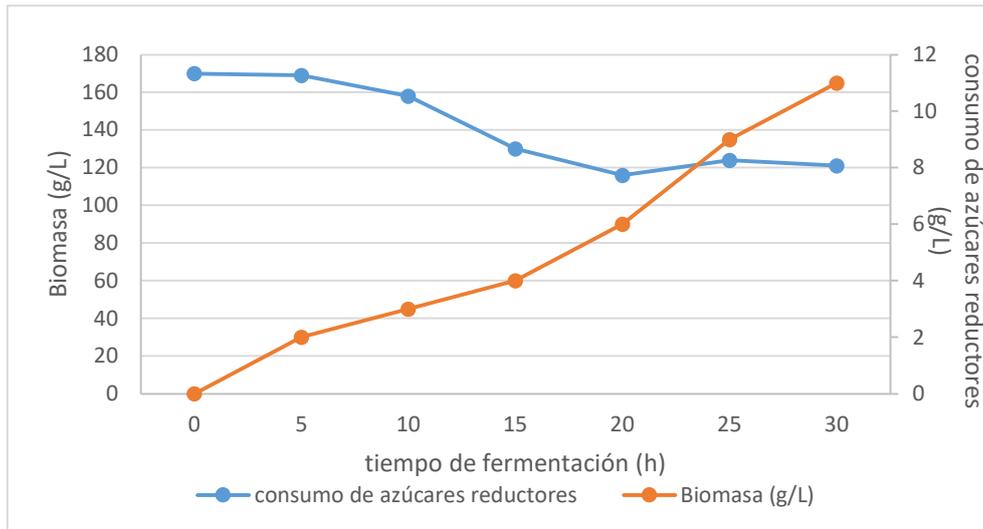


Figura 32. Biomasa y consumo de azúcares reductores de *S. Cerevisiae* durante la fermentación de hidrolizados ácidos de tallo de muérdago.

En la figura 32. se observa que la producción de biomasa fue de hasta 11 g/L y esta se dio al concluir las 30h de fermentación y para el consumo de azúcares reductores se observo un bajo consumo de tan solo 31.76% y se dio a las 20h de reacción.

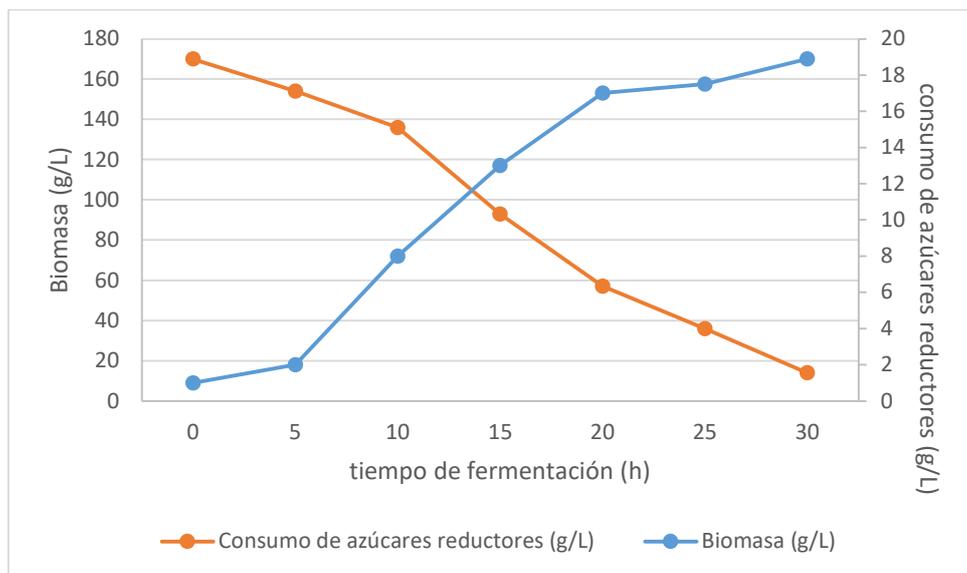


Figura 33. Biomasa y consumo de azúcares reductores de *S. Cerevisiae* durante la fermentación de hidrolizados enzimáticos del rastrojo de amaranto.

Para los hidrolizados enzimáticos del rastrojo de amaranto se observa en la figura 33. una máxima producción de biomasa de hasta 18.9 g/L al terminar las 30h de la fermentación y el consumo de azúcares reductores fue de hasta 91.76%.

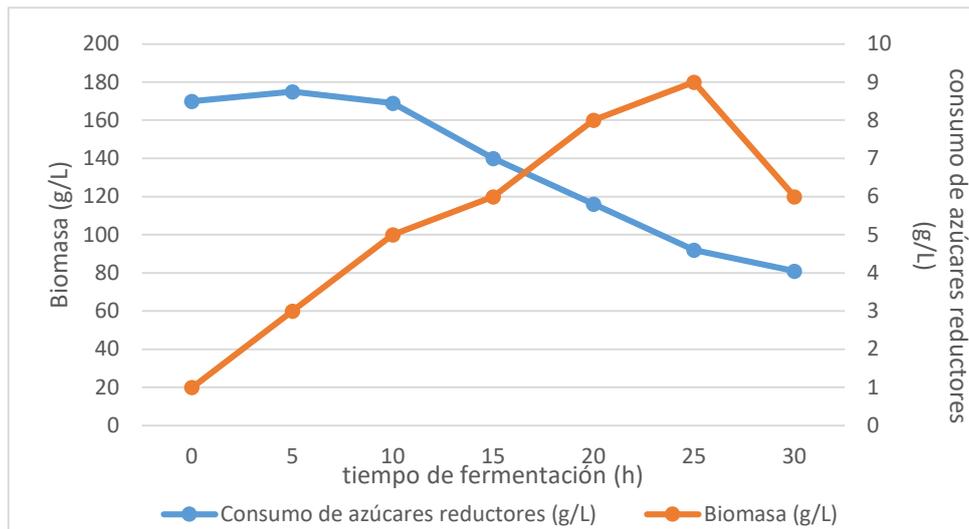


Figura 34. Biomasa y consumo de azúcares reductores de *S. Cerevisiae* durante la fermentación de hidrolizados enzimáticos de tallo de muérdago.

En la figura 34. se observa la fermentación de los hidrolizados enzimáticos de tallo de muérdago, la biomasa producida fue de solo 9 g/L, se alcanzó a las 25h de fermentación y el consumo de azúcares reductores fue de hasta 52.35% al terminar las 30h.

Los valores máximos de crecimiento de biomasa se observaron en los hidrolizados de rastrojo de amaranto entre 13 – 18.9 g/L. y para el tallo de muérdago fue menor estos se encontraron entre 9 – 11 g/L. la mayor biomasa se encontró en los hidrolizados enzimáticos del rastrojo de amaranto.

Los resultados obtenidos en el consumo de azúcar en los hidrolizados de rastrojo de amaranto no mostraron diferencias significativas al utilizar las dos hidrolisis, pero cuando se compara el consumo de azúcares del rastrojo de amaranto y tallo de muérdago se observa mayor consumo bajo los hidrolizados enzimáticos del rastrojo de amaranto ya que de 170 g/L de sacarosa inicial la sacarosa resultante estuvo alrededor de 14 g/L mientras que para los hidrolizados de tallo de muérdago fue aproximadamente 8 veces mayor.

### Producción de Etanol

En la figura 35. Se presenta la producción de etanol resultante de la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* de los hidrolizados químicos y enzimáticos del rastrojo de amaranto y tallo de muérdago. Manteniendo la misma cantidad de sustrato 170g/L para todas las muestras. Para los hidrolizados de rastrojo de amaranto la producción de etanol comenzó a las 10h de fermentación. La mayor producción fue de  $42 \pm 0.18$  g de etanol/L esta se obtuvo en los hidrolizados enzimáticos, mientras que para los hidrolizados ácidos se tuvo  $33 \pm 0.24$  g de etanol/L. En cuanto a los hidrolizados de tallo de muérdago la producción fue menor logrando solo  $24 \pm 0.11$  g de etanol/L en los hidrolizados enzimáticos terminada la fermentación; para el hidrolizado ácido la producción de etanol fue

de  $18 \pm 0.45$  g de etanol/L, después de llegar a las 25h de fermentación se observó que la producción de etanol se detuvo esto sugiere que la misma levadura se lo estaría consumiendo.

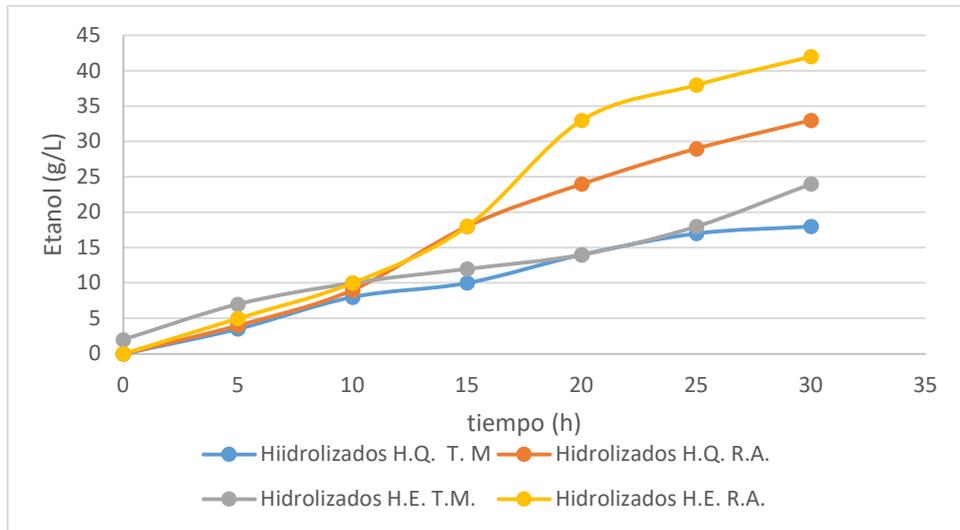


Figura 35. Producción de etanol para los hidrolizados ácidos y enzimáticos del rastrojo de amaranto y tallo de muérdago.

Gonçalves et al. (2016) obtuvieron  $11.29$  g/L después de 48 h de la sacarificación y fermentación simultánea de hidrolizados de fibra de coco deslignificada, concentración menor a la obtenida en esta investigación para los hidrolizados enzimáticos del rastrojo de amaranto con el que se obtuvieron hasta  $42 \pm 0.18$  g/L, aproximadamente 3 veces más. siendo la concentración mayor obtenida comparada con los demás medios fermentados.

Los parámetros cinéticos analizados en la fermentación a partir de los hidrolizados químicos y enzimáticos del rastrojo de amaranto y tallo de muérdago se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Parámetros cinéticos de fermentación calculados para rastrojo de amaranto y tallo de muérdago utilizando la cepa *S. cerevisiae*.

| Parámetro                            | a                | b                 | c                | d                |
|--------------------------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|
| Concentración máxima de etanol (g/L) | $33 \pm 0.24$    | $18 \pm 0.45$     | $42 \pm 0.18$    | $24 \pm 0.11$    |
| $E_F$ (g/g)                          | $0.703 \pm 0.62$ | $0.383 \pm 0.79$  | $0.895 \pm 0.52$ | $0.511 \pm 0.72$ |
| $Y_{P/S}$ (g/g)                      | $0.221 \pm 0.47$ | $0.367 \pm 0.34$  | $0.371 \pm 0.68$ | $0.247 \pm 0.19$ |
| $Y_{X/S}$ (g/g)                      | $0.080 \pm 0.53$ | $0.224 \pm 0.48$  | $0.158 \pm 0.40$ | $0.089 \pm 0.88$ |
| Etanol producido [g/(L*h)]           | $1.10 \pm 0.001$ | $0.727 \pm 0.002$ | $1.43 \pm 0.007$ | $0.80 \pm 0.001$ |

a) hidrolizado químico de rastrojo de amaranto a  $90^\circ\text{C}$  y 150 min. b) hidrolizado químico de tallo de muérdago a  $90^\circ\text{C}$  y 210min c) hidrolizado enzimático de rastrojo de amaranto con el primer tratamiento enzimático d) hidrolizado enzimático de tallo de muérdago con el primer tratamiento enzimático.

## 8. Conclusiones

El pretratamiento, es un factor importante a considerar en los procesos de hidrólisis de materiales lignocelulósicos (amaranto y muérdago). Dependiendo del pretratamiento se puede facilitar o entorpecer los tratamientos ácidos y enzimáticos sobre la biomasa.

Los pretratamientos para deslignificar la biomasa y la hidrólisis con ácido sulfúrico diluido permitieron la liberación de glucosa, así como la exposición de la celulosa para la sacarificación enzimática del hidrolizado ácido.

De los materiales lignocelulósicos estudiados el rastrojo de amaranto mostro mejores resultados. La hidrólisis de rastrojo de amaranto y tallo de muérdago con ácido sulfúrico al 5 % (v/v), en una relación de (1:8 p/v) durante 150 min a 90°C y 210min a 90°C respectivamente, fue donde se obtuvo la mayor liberación de azúcares fermentables.

Al comparar los dos tratamientos enzimáticos propuestos se observó que la hidrólisis enzimática mostró mayor rendimiento con el primer tratamiento, alcanzando 30.88 g de glucosa y en comparación con la hidrólisis ácida donde se obtuvo 14.1 g de glucosa la conversión fue mejor obteniendo aproximadamente lo doble, concluyendo que es más factible la producción de bioetanol utilizando tratamientos enzimáticos. Si bien la producción de bioetanol es muy conveniente, debido a las grandes cantidades de residuos de materiales lignocelulósicos existentes, es necesario optimizar la etapa de fermentación del rastrojo de amaranto y tallo de muérdago con el fin de incrementar los rendimientos del proceso, donde se observó una concentración máxima de etanol de 42 y 24 g/L. respectivamente.

## **Trabajo a futuro**

se recomienda realizar la caracterización del etanol producido mediante cromatografía de gases.

## 9. Referencias

- Acheampong, M., Ertem, F. C., Kappler, B., & Neubauer, P. (2017). In pursuit of Sustainable Development Goal (SDG) number 7: Will biofuels be reliable?. *Renewable and sustainable energy reviews*, 75, 927-937.
- Aditiya, H. B.; Mahlia, T. M. I.; Chong, W. T.; Nur, H.; Sebayang, A. H. Second Generation Bioethanol Production : A Critical Review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2016, 66, 631–653.
- Agencia Internacional de la Energía (2010) "Sostenible Producción de biocombustibles de segunda generación" París.
- Akhtar, N.; Gupta, K.; Goyal, D.; Goyal, A. Recent Advances in Pretreatment Technologies for Efficient Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass. *Environ. Prog. Sustain. Energy* 2015, 35 (2), 489–511.
- Ali, S. R., Anwar, Z., Irshad, M., Mukhtar, S., & Warraich, N. T. (2016). Bio-synthesis of citric acid from single and co-culture-based fermentation technology using agro-wastes. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 9(1), 57-62.
- Alvarado-Rosales, D.; Equihua-Martínez, A.; Estrada-Venegas, E.; González-Monzón, A. U.; Saavedra-Romero, L. DE L. 2005. Impacto y manejo del muérdago verdadero (*Cladocolea loniceoides*) en el arbolado de la zona chinampera de Xochimilco, D.F. (En prensa).
- Andac, M. G., Egolfopoulos, F. N., & Campbell, C. S. (2002). Effects of combustible dust clouds on the extinction behavior of strained, laminar premixed flames in normal gravity. *Proceedings of the Combustion Institute*, 29(2), 1487-1493.
- ANÓNIMO. 2003. Informe de Gestión 2000-2003. Gobierno del Distrito Federal. Delegación Xochimilco. México. 163 p.
- Anwar, Z., Gulfraz, M., & Irshad, M. (2014). Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: a brief review. *Journal of radiation research and applied sciences*, 7(2), 163-173.
- Arce, M. B., Guerrero, I., Rodríguez, E., & Escalona, (2011) H. obtención de compuestos antioxidantes a partir del rastrojo de *Amaranthus hypochondriacus* L. mediante una hidrólisis ácida.
- Ballesteros, I., Negro, M. J., Oliva, J. M., Cabañas, A., Manzanares, P., & Ballesteros, M. (2006). Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. In *Twenty-seventh symposium on biotechnology for fuels and chemicals* (pp. 496-508). Humana Press.

- Binod, P.; Sindhu, R.; Singhanian, R. R.; Vikram, S.; Devi, L.; Nagalakshmi, S.; Kurien, N.; Sukumaran, R. K.; Pandey, A. Bioethanol Production from Rice Straw: An Overview. *Bioresour. Technol.* 2010, 101 (13), 4767–4774.
- Castaño Pelaez, H. A. D. E. R., Cardona Betancur, M. A. R. I. A. N. A., Mejía Gomez, C. A. R. L. O. S., & Acosta Cárdenas, A. L. E. J. A. N. D. R. O. (2011). Producción de etanol a partir de harina de yuca en un sistema de hidrólisis enzimática y fermentación simultánea. *Dyna*, 78(169).
- Cházaro B., M.; Huerta M., F. M.; Patiño B., R. M.; Sánchez F., R.; Lomelí M., E.; Flores M., A. 1992. Los muérdagos (Loranthaceae) de Jalisco, parásitas poco conocidas. *Ciencia y Desarrollo*. 17(102):70-85.
- Cid V., R. M.; Bye, R. A. 1998. Site conditions of an urban wooded area of Mexico City that hosts *Cladocolea loniceroides* Van Tieghem (Loranthaceae). *Selbyana* 19(2):A 272.
- Cid V., R. M.; Ponce S., M. 2001. Germinación de *Cladocolea loniceroides* (Van Tieghem) Loranthaceae. XXV Congreso Nacional de Histología. Taxco, Gro. Octubre 24-26. p. 23-24.
- Delgado, J. E., Salgado, J. J., & Perez, R. (2015). Perspectivas de los biocombustibles en Colombia. *Revista Ingenierías Universidad de Medellín*, 14(27), 13-28.
- Demirbas, A. (2007). Progress and recent trends in biofuels. *Progress in energy and combustion science*, 33(1), 1-18.
- Espinoza-Zúñiga, P., Ramírez-Dávila, J. F., Cibrián-Tovar, D., Villanueva-Morales, A., Cibrián-Llenderal, V. D., Figueroa-Figueroa, D. K., & Rivera-Martínez, R. (2019). Modelación de la distribución espacial del muérdago (Santalales: Loranthaceae) en las áreas verdes de la delegación Tlalpan, México. *Bosque (Valdivia)*, 40(1), 17-28.
- Farhat, W., Venditti, R., Quick, A., Taha, M., Mignard, N., Becquart, F., y Ayoub, A. (2017). Hemicellulose extraction and characterization for applications in paper coatings and adhesives. *Industrial Crops and Products*, 107, 370–377.
- Geils, B. W.; Cibrián T., J.; Moody, B. Tech. Coords. 2002. Mistle-toes of North American Conifers. Gen. Tech. Rep. RMRS-GTR-98. Ogden, UT:U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station. 123 p.
- Gomes, D., Rodrigues, A. C., Domingues, L., y Gama, M. (2015). Cellulase recycling in biorefineries—is it possible? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(10), 4131–4143.
- Gonzáles García, J. C. (2018). Desarrollo de un polímero biodegradable a partir de almidón de semilla de ataco, *Amaranthus quitensis* L.

- González-Rentería, S. M., Soto-Cruz, N. O., Rutiaga-Quiñones, O. M., Medrano-Roldán, H., Rutiaga-Quiñones, J. G., & López-Miranda, J. (2011). Optimización del proceso de hidrólisis enzimática de una mezcla de pajas de frijol cuatro variedades (Pinto villa, Pinto saltillo, Pinto mestizo y Flor de mayo). *Revista mexicana de ingeniería química*, 10(1), 17-28.
- Horn, G. M. (2010). *Biofuels*. Infobase Publishing.
- Jae, J., Tompsett, G. A., Lin, Y.-C., Carlson, T. R., Shen, J., Zhang, T., ... Huber, G. W. (2010). Depolymerization of lignocellulosic biomass to fuel precursors: maximizing carbon efficiency by combining hydrolysis with pyrolysis. *Energy y Environmental Science*, 3(3), 358.
- Khalil, H. A., Hossain, M. S., Rosamah, E., Norulaini, N. N., Leh, C. P., Asniza, M., & Zaidul, I. S. M. (2014). High-pressure enzymatic hydrolysis to reveal physicochemical and thermal properties of bamboo fiber using a supercritical water fermenter. *BioResources*, 9(4), 7710-7720.
- Kuijt, J. 1975. The genus *Cladocolea* (Loranthaceae). *Journal Arnold Arboretum*. 56(3):265-235. Two new species of *Cladocolea* (Loranthaceae) from Mexico and Surinam. *Novon* 2:351-354.
- Laothanachareon, T., Bunterngsook, B., Suwannarangsee, S., Eurwilaichitr, L., y Champreda, V. (2015). Synergistic action of recombinant accessory hemicellulolytic and pectinolytic enzymes to *Trichoderma reesei* cellulase on rice straw degradation. *Bioresource Technology*, 198, 682–690.
- Lennartsson, P. R., Erlandsson, P., & Taherzadeh, M. J. (2014). Integration of the first and second generation bioethanol processes and the importance of by-products. *Bioresource technology*, 165, 3-8.
- Mann, Paul; Lisa Gahagan y Mark B. Gordon, «Tectonic setting of the world's giant oil and gas fields.» En Michel T. Halbouty (ed.) *Giant Oil and Gas Fields of the Decade, 1990–1999*, Tulsa, Okla.: American Association of Petroleum Geologists, p. 50. Consultado el 22 de junio de 2009.
- Medina, D. A. P., Nuñez, M. F. A., & Ordoñez, M. S. (2010). Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos para ser utilizadas en el proceso de obtención de bioalcohol de residuos del cultivo de banano. *Revista Tecnológica-ESPOL*, 23(1).
- Morales, J. U. M., Herrera, M. L. S., Millán, A. H., Ruíz, E. I. J., Sánchez, T. D. J. R., Rodríguez, M. Á. E., & Delgado, R. D. (2018). Un estudio sobre el potencial del uso de residuos lignocelulósicos. *REVISTA MICA*, 1(1).
- Moscoviz, R.; Toledo-Alarcón, J.; Trably, E.; Bernet, N. *ElectroFermentation : How To Drive Fermentation Using Electrochemical Systems*. *Trends Biotechnol.* 2016, 34 (11), 856–865.

- Moshaver, E., Madani, H., Emam, Y., Mohamadi, G. N., & Heidari, H. (2016). Effect of planting date and density on Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) Growth Indices and Forage Yield. *Journal of experimental Biology and Agricultural Sciences*, 4(5), 541-547.
- Mundial, B. (2017). World Bank Open Data. *Datos de libre acceso del Banco Mundial*). Acceso en septiembre.
- Nwufu, O. C., Nwafor, O. M. I., y Igbokwe, J. O. (2016). Effects of blends on the physical properties of bioethanol produced from selected Nigerian crops. *International Journal of Ambient Energy*, 37(1), 10–15.
- Ordoñez Pineda, K. L., & Sepúlveda Monroy, C. (2019) Caracterización físico química de los residuos del plátano y el café para su posible uso como materias primas en la fabricación de papel.
- Orosco Condori, E. A. (2013). Actividad biológica de péptidos de amaranto obtenidos por acción de microorganismos. *Universidad Nacional de La Plata*.
- Ortega, M. H. S., & Delgado, M. E. S. (2019). Cladocolea Ioniceroides, un nuevo registro para la flora de Aguascalientes, México. *Investigación y Ciencia: de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, (78), 51-54.
- Pandey, C., Bajpai, V. K., Negi, Y. K., Rather, I. A., & Maheshwari, D. K. (2018). Effect of plant growth promoting *Bacillus* spp. on nutritional properties of *Amaranthus hypochondriacus* grains. *Saudi journal of biological sciences*, 25(6), 1066-1071.
- Pérez, L. A. E.; Alguacil P., F.; Montero G., J. L. 2001. Distribución y características de las poblaciones del muérdago (*Viscum album austriacum*) en la comunidad valenciana. *Informes Técnicos. Plagas y Patología Forestal* 1:1-6.
- Potumarthi, R., Baadhe, R. R., & Bhattacharya, S. (2013). Fermentable sugars from lignocellulosic biomass: technical challenges. In *Biofuel Technologies* (pp. 3-27). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Qi, X.-M., Chen, G.-G., Gong, X.-D., Fu, G.-Q., Niu, Y.-S., Bian, J., Sun, R.-C. (2016). Enhanced mechanical performance of biocompatible hemicelluloses-based hydrogel via chain extension. *Scientific Reports*, 6(1).
- Rahman, A., Trossen, D., Kutscher, D., & Ravindran, R. (2018). Deployment Considerations for Information-Centric Networking. *ICNRG draft*.
- Rastogi, M.; Shrivastava, S. Recent Advances in Second Generation Bioethanol Production : An Insight to Pretreatment , Saccharification and

- Fermentation Processes. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2017, 80 (January), 330–340.
- Ravindran, R., & Jaiswal, A. K. (2016). A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: challenges and opportunities. *Bioresource technology*, 199, 92-102.
  - Ruiz, F. M. H. P., Barrera, A. F., Alquicira, E. P., Pérez, J. C. A., Ramos, R. R., & Santos, J. S. (2019). Antihyperglycemic, antioxidant and anti-inflammatory effects of aqueous extract of mistletoe (*Cladocolea loniceroides*) in STZ-induced diabetic mice. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 16(1), 1-12.
  - Saavedra-Romero, L. De L.; Cárdenas-Soriano, E.; Alvarado-Rosales, D.; Estrada-Venegas, E.; Equihua-Martínez, A.; González-Monzón, U. 2005. Anatomía patológica del muérdago verdadero *Cladocolea loniceroides* Van Tieghem parásito del ahuejote (*Salix bonplandiana*).
  - Saini, J. K., Saini, R., & Tewari, L. (2015). Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *3 Biotech*, 5(4), 337-353.
  - Sánchez-Olarte, J., Argumedo-Macías, A., Álvarez-Gaxiola, J. F., Méndez-Espinoza, J. A., & Ortiz-Espejel, B. (2016). Análisis económico del sistema sociotécnico del cultivo de amaranto en Tochimilco, Puebla. *Acta universitaria*, 26(3), 95-104.
  - Serrano-Maldonado, M. J., Guerrero-Legarreta, I., De la Paz Pérez-Olvera, C., & Soriano-Santos, J. (2011) actividad antioxidante y efecto citotóxico de *Cladocolea loniceroides* (van Tieghem) Kuijt (Loranthaceae).
  - Silva, E. K., Martelli-Tosi, M., Vardanega, R., Nogueira, G. C., Zobot, G. L., & Meireles, M. A. A. (2018). Technological characterization of biomass obtained from the turmeric and annatto processing by using green technologies. *Journal of Cleaner Production*, 189, 231-239.
  - Simal-gándara, J. A Review on the Fermentation of Foods and the Residues of Pesticides — Biotransformation of Pesticides and Effects on Fermentation and Food Quality. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2013, No. September 2013, 37–41.
  - Singh, A.; Bajar, S.; Bishnoi, N. R. Physico-Chemical Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Cotton Stalk for Ethanol Production by *Saccharomyces Cerevisiae*. *Bioresour. Technol.* 2017.
  - Soriano-Santos, J., (2011). Cultivo de *Aspergillus Niger* en rastrojo de amaranto y olote de maíz para la obtención de polifenoles.
  - Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* 83 (1), 1–11.

- Talebnia, F. (2015). Bioethanol from Lignocellulosic wastes: current status and future prospects. In *Lignocellulose-Based Bioproducts* (pp. 175-206). Springer, Cham.
- Tejada, L., Quintana, J., Pérez, J., & Young, H. (2011). Obtención de etanol a partir de residuos de poda, mediante hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 14(1), 111-116.
- Vohra, M., Manwar, J., Manmode, R., Padgilwar, S., & Patil, S. (2014). Bioethanol production: feedstock and current technologies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(1), 573-584.
- Wen, F., Nair, NU y Zhao, H. (2009). Ingeniería de proteínas en el diseño de enzimas y microorganismos a medida para la producción de biocombustibles. *Opinión actual en biotecnología*, 20 (4), 412-419.
- Wilkinson, S., Smart, K. A., James, S., & Cook, D. J. (2017). Bioethanol production from brewers spent grains using a fungal consolidated bioprocessing (CBP) approach. *BioEnergy Research*, 10(1), 146-157.
- Zabed, H., Sahu, J. N., Suely, A., Boyce, A. N., & Faruq, G. (2017). Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 71, 475-501.

## Anexos

### Curva estándar para la cuantificación de azúcares reductores expresada en g de Glucosa por L.

En la figura A1 se muestran las concentraciones utilizadas para la construcción de la curva estándar, que sirvió para la cuantificación de azúcares reductores en las muestras analizadas en el presente estudio.

En la figura A2 se presenta la curva de azúcares reductores (g de G /L) versus absorbancia a 540nm y su respectiva ecuación obtenida de su linealización.

| Glucosa (g/L) | Absorbancia (540nm) |
|---------------|---------------------|
| 0.2           | 0.163±0.01          |
| 0.4           | 0.359±0.01          |
| 0.6           | 0.518±0.04          |
| 0.8           | 0.723±0.02          |
| 1.0           | 0.861±0.01          |

Figura A1. Curva estándar de glucosa para cuantificación de azúcares reductores

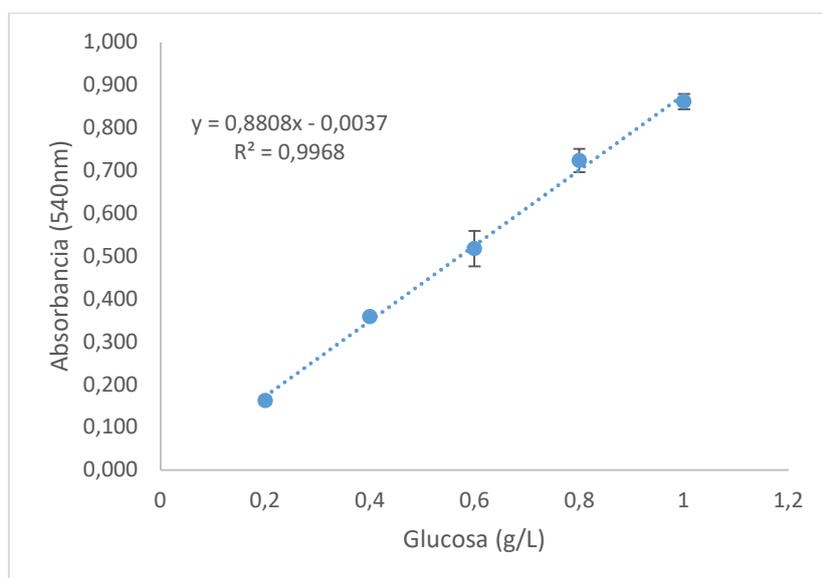


Figura A2. Curva estándar de glucosa para cuantificación de azúcares reductores