



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
Posgrado en Ciencias en Energía Renovable

**“EFECTO DEL ULTRASONIDO EN EL PROCESO DE
SACARIFICACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE
BIOETANOL A PARTIR DE HARINA DE RAMÓN”.**

Tesis que presenta

QFB. INGRID ANABEL JIMÉNEZ VILLARREAL

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE

Mérida, Yucatán. Diciembre 2019

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán AC y la Unidad de Energía Renovable, por darme la oportunidad ingresar y tener acceso a sus instalaciones para realizar este trabajo de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada, número 488451, para la realización de los estudios de Maestría.

Al Dr. Raúl Tapia Tussell por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo, guiarme en todos los aspectos desde el momento de elegir el tema de investigación hasta su conclusión. Especialmente le agradezco toda la paciencia y confianza brindada en todo este tiempo.

A la Dra. Daisy Pérez Brito por todos sus conocimientos transmitidos y tener la paciencia de dirigirme dándome todas sus recomendaciones y consejos a lo largo de este trabajo.

Al Dr. Luis Felipe Barahona Pérez por apoyarme con el equipo y material de laboratorio para mis experimentos, así como también sus sugerencias para el desarrollo del mismo

A la Dra. Sara Solís Pereira por sus observaciones y sugerencias en esta investigación.

A la Dra. Patricia Lappé Oliveras por sus correcciones y sus valiosas aportaciones para realizar este trabajo.

A la IQ. Tanit Toledano Thompson por apoyarme con el uso del Microscopio Electrónico de Barrido, el equipo de Cromatografía de alta resolución y enseñarme el uso adecuado del equipo de ultrasonido y materiales de laboratorio.

A la Dra. Liliana Alzate Gaviria por sus aportaciones en la revisión de tesis y facilitarme el uso de los equipos de su laboratorio.

Al M.C. Jorge Domínguez por las enseñanzas brindadas en el laboratorio sobre el manejo correcto del equipo del espectrofotómetro y ser tan accesible al proporcionarme el material necesario para realizar los experimentos.

A la Lic. Julia González Montilla por su apoyo técnico administrativo durante la tesis.

A la LAE. Bertha Arely Ramírez González por su apoyo con el formato electrónico del documento de tesis.

Al M.C. Edgar Olguín Maciel, por toda la paciencia, amabilidad, consejos, aportes y literatura proporcionadas. Sin tu ayuda no habría sido posible terminar este experimento de forma tan satisfactoria. Gracias por ser mi guía y no dejarme hundirme a la deriva.

Al M.C. David Valero, gracias por tu apoyo y explicarme tan pacientemente lo que necesitaba para analizar los resultados de esta investigación.

A mi equipo de laboratorio Gerardo Cámara, Rodrigo Moreno, Olivia Zapata, Edgar Olguín, Wendy Vázquez, Cynthia Garza, Andrés Canul, Rubí Chablé, Alejandra Quevedo y Mariana

Segura. Por el bonito ambiente de trabajo, además de todas sus sugerencias y apoyo es la parte experimental de este proyecto.

A mis compañeros de generación David Rosas, Alan Campos, Olivia Zapata, Omar Ortiz, Alan Pech, Aurora Tepale, Tatiana Suarez, Iván Viera, Diana López, Noemí Interián, David Uribe y Wendy Vázquez. Por todos los momentos maravillosos, divertidos e inolvidables que vivimos en este posgrado, su cariño y apoyo incondicional en todos los aspectos, el haber tenido la fortuna de vivir esta etapa con ustedes ha sido fabuloso.

A mis roomies Aurora Tepale, Joselin Leal, Mayra Ordóñez, Adrián Chan, Omar Ortiz y Claudia Velasco. Gracias por ser más que simples conocidos habitando la misma casa y hacerme sentir parte de un hogar, apoyándonos mutuamente en los momentos buenos y sobre todo en los malos, los quiero muchísimo.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a Dios, por cada día en el que me permitió despertar no solo con vida, sino que también con salud, fuerzas y empeño; para que, cada avance, cada experiencia y momento en mi vida me sirviera de aprendizaje, en el cual crecí como persona, y fue necesario para culminar este proyecto.

A mi madre Guadalupe Villarreal Ramos, por ser mi gran ejemplo a seguir, por todo el apoyo y los ánimos que me dio a cada instante, especialmente en aquellos momentos en los que creí que mi mundo se derrumbaba, gracias por todo el amor incondicional que siempre me has brindado y sobre todo por siempre permitirme seguir mis sueños, sin ti absolutamente nada de esto sería posible, te amo eres mi todo.

A mi padre Roberto Jiménez Hernández por su confianza, cariño y apoyo.

A mi hermano Allan Roberto Jiménez Villarreal por darme tanto cariño, ser mi ejemplo a seguir porque de ti he aprendido que ante cualquier adversidad siempre hay que sonreír y salir adelante.

A mis mejores amigos Isabel García, Lizelly Sarmiento, Lessly Flores, Alejandra Luis, Jorge Figueroa y Guadalupe de Paz. Gracias por ser mis pilares, por impulsarme siempre a ser mejor, darme ánimos, aunque sea a la distancia y siempre estar presentes, gracias por ser parte de mi vida.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	v
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	vii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	3
ANTECEDENTES.....	3
1.1 Generalidades.....	3
1.1.1 Uso de bioetanol a nivel mundial y en México.....	4
1.1.2 Bioetanol a partir de biomasa.....	6
1.1.3 Obtención de bioetanol a partir de almidón.....	7
1.1.4 Árbol de ramón (<i>Brosimum alicastrum</i> Sw).....	11
1.1.5 Pretratamientos.....	15
1.1.5.1 Pretratamiento mecánico.....	16
1.1.5.2 Pretratamiento Físicoquímico.....	16
1.1.5.3 Pretratamiento Químico.....	18
1.1.5.4 Pretratamiento biológico.....	20
1.1.6 Hidrólisis de almidón.....	20
1.1.7 Licuefacción.....	21
1.1.8 Sacarificación.....	22
1.1.9 Fermentación.....	22
1.1.10 Destilación y Deshidratación.....	23
JUSTIFICACIÓN.....	25
HIPÓTESIS.....	26
OBJETIVOS.....	26
OBJETIVO GENERAL.....	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
CAPÍTULO II.....	27
METODOLOGÍA.....	27
2.1 Estrategia experimental.....	27
2.2 Materia Prima.....	28

2.3	Cuantificación de azúcares reductores directos.....	28
2.4	Cuantificación de azúcares por HPLC	28
2.5	Caracterización física de la harina de ramón.	28
2.5.1	Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	29
2.6	Preparación de extractos enzimáticos.	29
2.7	Pretratamientos.....	29
2.7.1	Pretratamiento por Ultrasonido con enzima α -amilasa (EC 3.2.1.1).....	29
2.7.2	Pretratamiento Ultrasónico con la enzima Lacasa (EC 1.10.3.2).....	30
2.8	Hidrólisis	31
2.8.1	Licuefacción.....	31
2.8.2	Sacarificación.....	32
2.9	Análisis de los resultados.....	32
CAPÍTULO III.....		33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		33
3.1	Efecto del pretratamiento ultrasónico sobre la estructura de la harina de semillas de ramón.	33
3.1.1	Pretratamiento ultrasónico con enzima la α -amilasa y el extracto enzimático de <i>Trametes hirsuta</i> Bm-2 crecido en harina de ramón.....	35
3.1.2	Pretratamiento ultrasónico con enzima lacasa y con extracto enzimático de <i>T. hirsuta</i> Bm-2 crecido en YMPG con salvado de trigo.....	37
3.2	Efecto de los pretratamientos ultrasónicos sobre el rendimiento de ARD en la harina de semillas de ramón.	38
3.3	Rendimiento de azúcares obtenidos después de la hidrólisis enzimática.....	41
3.3.1	Azúcares fermentables obtenidos en cada uno de los pretratamientos empleados.....	45
CONCLUSIONES		48
PERSPECTIVAS.....		49
BIBLIOGRAFÍA.....		50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Estructura química de la amilosa [20].	8
Figura 1.2: Estructura química de la amilopectina [20].	8
Figura 1.3: Estructura helicoidal de la amilosa (A) y estructura en racimos de la amilopectina (B) [21].	9
Figura 1.4: Estructura del gránulo de almidón [22].	9
Figura 1.5: <i>Brosimum alicastrum</i> Sw. Árbol (a), corteza (b), hojas (c), flores (d), fruto inmaduro (e), fruto maduro (f) y semillas (g).....	11
Figura 1.6: Distribución del árbol ramón en la República Mexicana [25].	12
Figura 3.1: Estructura de la harina de ramón. a) Empaquetamiento de los gránulos por la matriz fibroproteica; b) Diferentes formas de los gránulos de almidón; c) Tamaño del gránulo de almidón.	33
Figura 3.2: Efecto del pretratamiento ultrasónico CA y CL a) Cambios estructurales en la harina; b) Cambios morfológicos en el gránulo de almidón.....	34
Figura 3.3: Efecto del tratamiento ultrasónico combinado con enzimas Amilolíticas a) Cambios morfológicos en los gránulos de almidón con α -Amilasa a 45 y 60 °C; b) Cambios morfológicos en el gránulo de almidón con α -Amilasa a 70 °C; c), Cambios morfológicos en los gránulos de almidón con EA a 45 y 60 °C; d) Cambios morfológicos en los gránulos de almidón con EA a 70 °C.	35
Figura 3.4: Efecto del tratamiento ultrasónico combinado con enzimas ligninolíticas a) Cambios morfológicos en la matriz fibroproteica y los gránulos de almidón con enzima Lacasa; b) Cambios morfológicos en la matriz fibroproteica y en el gránulo de almidón con EL.	37
Figura 3.5: Concentración de ARD en la harina de ramón después de los diferentes pretratamientos con α -amilasa y EA a diferentes temperaturas. Anova de una vía, $p < 0.05$, prueba de Tukey.....	39
Figura 3.6: Concentración de ARD en la harina de ramón después de los diferentes pretratamientos con Lacasa y EL a diferentes concentraciones y temperaturas. Anova de una vía, $p < 0.05$, prueba de Tukey.	40
Figura 3.7: Concentración de ARD posterior a la hidrólisis enzimática de los diferentes pretratamientos con α -amilasa y EA a diferentes temperaturas. Anova de una vía, $p < 0.05$, prueba de Tukey.....	41
Figura 3.8: Concentración de ARD posterior a la hidrólisis enzimática de los diferentes pretratamientos con lacasa y EL a diferentes temperaturas y concentraciones. Anova de una vía, $p < 0.05$, prueba de Tukey.	43
Figura 3.9: Dinámica de hidrólisis de harina de ramón para todos los pretratamientos evaluados. Anova de una vía, $p < 0.05$, prueba de Tukey.	44
Figura 3.10: Rendimiento de Azúcares fermentables, después de la hidrólisis enzimática, obtenido por cada pretratamiento con α -amilasa y EA. Anova de una vía, $p < 0.05$, prueba de Tukey.....	45

Figura 3.11: Rendimiento de Azúcares fermentables, después de la hidrólisis enzimática, obtenido por cada pretratamiento con Lacasa y EL. Anova de una vía, $p < 0.05$, prueba de Tukey. 46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1: Producción de etanol en el mundo en el año 2018 [13].....	4
Tabla 1.2: Contenido de almidón en diversas fuentes de biomasa (% en peso sobre base seca) [10].	10
Tabla 1.3: Nombres indígenas de <i>Brosimum alicastrum</i> en México [22].	13
Tabla 1.4: Composición de macronutrientes de la harina de semilla de ramón (<i>Brosimum alicastrum</i>) [8,27,28].....	14
Tabla 2.1: Pretratamientos con Enzima α -Amilasa y EA.....	30
Tabla 2.2: Pretratamientos con enzima Lacasa y EL.....	31

RESUMEN

El impacto negativo sobre el ambiente de la quema de combustibles fósiles, las emisiones de gases efecto invernadero (GEI) y la creciente demanda mundial de energía, impulsan la necesidad del uso de fuentes alternativas de energía. En México, se han fomentado políticas públicas para el uso de biocombustibles como el bioetanol, y se ha promovido la búsqueda de materias primas, como especies vegetales, que no compitan con la alimentación y tengan poca demanda de insumos. En este sentido, una fuente alternativa de almidón es la semilla de *Brosimum alicastrum* Sw., la cual tiene potencial para la producción de bioetanol, por su alto contenido de carbohidratos (72.25%), del cual el 61% es almidón. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del ultrasonido en la actividad enzimática en el proceso de sacarificación de harina de semilla de *B. alicastrum*. Los mejores resultados fueron obtenidos con el pretratamiento ultrasónico a 45 °C durante 60 min., a una potencia de 100 W y una concentración de 0.075U/g de α -amilasa, con el cual se obtuvo una concentración de azúcares fermentables de 123.72 g. l⁻¹, lo que representa un 92% de almidón hidrolizado. Esto demuestra que el pretratamiento ultrasónico tiene potencial en el proceso de producción de bioetanol a partir de harina de *B. alicastrum*.

ABSTRACT

The negative impact on the environment of the burning of fossil fuels, greenhouse gas (GHG) emissions, and the growing global demand for energy, drive the need for the use of alternative energy sources. In Mexico, public policies for the use of biofuels such as bioethanol have been promoted, and the search for raw materials, such as plant species, that do not compete with food and have low intake demand, have been raised. In this sense, an alternative source of starch is the seed of *Brosimum alicastrum* Sw., which has potential for bioethanol production, due to its high carbohydrate content (72.25%), of which 61% is starch. The objective of this work was to evaluate the effect of ultrasound on enzymatic activity in the process of saccharification of *B. alicastrum* seed flour. The best results were obtained with the ultrasonic pretreatment at 45 ° C for 60 min., at a power of 100 W and a concentration of 0.075U / g of α -amylase, with which a fermentable sugar concentration of 123.72 g. l⁻¹ was obtained, which represents 92% hydrolyzed starch. This demonstrates that ultrasonic pretreatment has potential in the bioethanol production process from *B. alicastrum* flour.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, los combustibles fósiles son la principal fuente de energía primaria a nivel mundial. La fuerte dependencia global de esta fuente de energía tiene efectos adversos en el ambiente y en los seres humanos, disminuye la seguridad energética, genera altas emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) y otras emisiones contaminantes por la combustión de gas natural, carbón y derivados del petróleo, además de accidentes y derrames de petróleo durante su extracción, transporte o refinación, entre otros problemas [1].

Como consecuencia de esta amenaza de agotamiento del petróleo y de las crisis económicas, a nivel mundial se ha experimentado una creciente fluctuación de los precios del petróleo (alcanzando valores superiores a los US\$130.00/barril) y de sus derivados, lo que ha estimulado la búsqueda de energías alternativas como la energía solar, nuclear, eólica, celdas de combustible, energía de la biomasa, entre otras [2]. La Organización de las Naciones Unidas (ONU) propone el empleo de biocombustibles, para que funjan como medios transitorios, mientras se desarrollan o encuentran fuentes energéticas completamente sustentables [3,4].

La biomasa vegetal es una de las materias primas más prometedoras para la producción de biocombustibles en México, ya que las emisiones netas de CO₂ son sustancialmente menores en comparación con el uso de biocombustibles fósiles y de primera generación, además de que hay una gran producción a gran escala y su procesamiento tiene potencial para generar oportunidades en diferentes sectores comerciales y puede contribuir al desarrollo económico regional sostenible. El Congreso mexicano aprobó la Ley y el Desarrollo de la Bioenergía en 2008, para promover el uso de biocombustibles como bioetanol y biodiesel. En el 2016 el gobierno mexicano y la Comisión Reguladora de la Energía publicaron y aprobaron la norma oficial mexicana NOM-016-CRE-2016, que permite la mezcla E6 (5.8 %) de etanol anhidro oxigenado en gasolina regular y Premium vendida por la compañía petrolera nacional Petróleos Mexicanos (PEMEX) [5].

Es por todo esto, que se ha impulsado la búsqueda de otras fuentes de materias primas como: residuos agrícolas, forestales, domésticos y de especies vegetales que no compitan con la alimentación y que sean a bajo costo. Pero debido a la naturaleza de algunos de

estos materiales, ocasionalmente se requerirá del desarrollo de tecnologías y tratamientos previos para hacerlos viables para la obtención de etanol por fermentación [6].

La disponibilidad de materias primas locales también es un tema importante que debe abordarse cuando se evalúa la viabilidad de la materia prima. En este sentido, una fuente alternativa de almidón es la semilla del árbol *Brosimum alicastrum* Sw. (conocido como ramón). Este árbol es nativo de la región mesoamericana y del Caribe, habitando climas cálidos, semi-cálidos, tropicales y templados, de 10 a 1600 m sobre el nivel del mar, y crece en asociación con la vegetación [7]. La semilla del ramón contiene un 72.25 % de carbohidratos, un 11 % de proteína, y alrededor de 1 % de grasa [8]. Es por ello que la harina de semilla de ramón tiene potencial para ser empleada como materia prima en la producción de bioetanol, por su alto contenido de carbohidratos del cual el 61% es almidón [9]. Olgún en el 2015 [7] realizó diferentes tratamientos para optimizar la obtención de azúcares fermentables siendo el tratamiento térmico el mejor, en el cual obtuvo un 72% de hidrólisis, quedando un 28% sin hidrolizar.

Es por ello que en el presente trabajo se evaluaron pretratamientos fisicoquímicos y biológicos combinados, como es el uso del ultrasonido con diferentes enzimas comerciales y extractos enzimáticos a diferentes concentraciones y temperaturas, para obtener un mayor rendimiento de azúcares reductores fermentables, y de este modo, ofrecer opciones viables para el aprovechamiento de la materia prima en la producción de bioetanol a partir de la harina de ramón.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 Generalidades

El impacto negativo de la quema de combustibles fósiles sobre el ambiente, la incertidumbre dada por el precio fluctuante de los mismos, las regulaciones que se están legislando acerca de las emisiones de gases de efecto invernadero y la creciente demanda mundial de energía, a causa del crecimiento de la población y el desarrollo económico, impulsan la necesidad de usar la energía renovable a gran escala [5].

Actualmente, el sector de transporte sigue dependiendo en gran medida de combustibles obtenidos a partir del petróleo, incluyendo la gasolina, el queroseno de la aviación, y el diésel. Para hacer frente a la escasez de recursos fósiles y proporcionar alternativas renovables y ecológicas, muchos científicos de todo el mundo y de diferentes disciplinas, están buscando, desarrollando y optimizando procesos para generar biocombustibles.

A pesar del uso de otras fuentes de energía renovable en el sector del transporte (vehículos que usan energía eléctrica, a partir del hidrógeno y solar), los combustibles líquidos siguen siendo la principal fuente de energía de los motores. Por este motivo, es muy importante la producción de biocombustibles líquidos procedentes de fuentes renovables, abundantemente disponibles y de bajo costo. Además de desarrollar procesos eficientes, a gran escala y económicamente competitivos para producir biocombustibles alternativos entre los diversos biocombustibles líquidos [10].

Con su enfoque ecológico, la producción de bioenergía y biocombustibles proporcionó una oportunidad para abordar las cuestiones de seguridad energética, utilizando recursos biológicos y residuos disponibles localmente para producir combustibles sólidos, líquidos y gaseosos y reducir gradualmente las emisiones de gases de efecto invernadero y, por lo tanto, contribuir a mitigar el calentamiento global [10].

1.1.1 Uso de bioetanol a nivel mundial y en México.

La producción y uso de bioetanol como combustible en el mundo se ha incrementado debido a las exigencias y cambios en las políticas energéticas (Tabla 1.1). En el año 1990 se fomentó el aumento de su producción con leyes como la Clean Air Act Amendments (CAAA) en Estados Unidos de América, el mayor productor de bioetanol a nivel mundial, cuyo objetivo era la reducción de CO₂ y ozono en el aire. Por otro lado, en el año 2000, la US Environmental Protection Agency (USEPA) recomendó el desuso a nivel nacional del MTBE (Éter metil terbutílico) como oxigenante de la gasolina, y California fue el primer estado en utilizar etanol en lugar de MTBE [11]. En Brasil, el segundo mayor productor de bioetanol, el uso obligatorio de etanol en gasolina es de entre el 20 y 25%, en las mezclas denominadas E20 y E25, respectivamente. Actualmente, más del 50% del combustible utilizado en vehículos ligeros en Brasil, es bioetanol [11]. Además de Estados Unidos de América y Brasil, en muchos otros países es obligatorio el uso de etanol en gasolinas [1].

En México, sólo 9.5 % de la oferta total de energía es renovable. Además, habría que aclarar que la poca energía renovable que se produce es fundamentalmente hidráulica, solar y eólica, y no se utiliza hasta el momento la producción comercial de biocombustibles a partir de cultivos agrícolas o forestales [12].

Tabla 1.1: Producción de etanol en el mundo en el año 2018 [13].

REGIÓN	MILLONES DE LITROS
Estados Unidos de América	60,797
Brasil	29,980
Unión Europea	5,413
China	3,974
Canadá	1,817
India	1,514
Tailandia	1,476
Argentina	1,097
Resto del Mundo	2,078

La producción de energía primaria en México está altamente concentrada en los hidrocarburos; del total de la energía producida, más de 90% está basada en ellos, dividida de la siguiente manera: petróleo crudo 72%; gas asociado 11.5%; gas no asociado 5.5%; condensados 1.7% [14].

De acuerdo a un estudio sobre biocombustibles de la Secretaría de Energía, la situación real sobre la producción de bioetanol combustible es aún incierta. No obstante, existe un gran potencial para el establecimiento de plantas productoras en estados como Jalisco, Veracruz, Tamaulipas, Morelos, Chiapas, Oaxaca, Nayarit, entre otros, donde se produce caña de azúcar y podría implantarse la del sorgo dulce [1].

La producción de biocombustibles líquidos está destinada principalmente a sustituir en forma parcial la gasolina y el diésel en el sector transporte. Un estudio realizado por García [15], señala que en México existe un potencial de producción de etanol con caña de azúcar de 338 PJ/a (Petajoule/año) y 84 PJ/a a partir de sorgo dulce. Mientras que, para la producción de biodiesel, existe un potencial de 120 PJ/a con palma aceitera y 36 PJ/a con *Jatropha curcas*. El mismo estudio señala que las tierras marginales con potencial para nuevas plantaciones energéticas corresponden a 2.9, 2.6, 1.8 y 3.2 Mha (millones de hectáreas) respectivamente para los cultivos mencionados. Además, para el 2035 el etanol de caña de azúcar podría reemplazar al 8.9% de la gasolina, mientras que el etanol de sorgo podría lograr el 2.2%. Ríos y Kaltschmitt [16] señalaron que en México existe un potencial biomásico para producir etanol con caña de azúcar y sorgo dulce de 226 PJ/año, y estimaron que las tierras marginales con potencial sustentable para cultivos energéticos alcanzan los 16 Mha [1].

México ha realizado cambios significativos en las políticas públicas para desarrollar las energías renovables. Por ejemplo, en 2005, se promulgó la Ley de Desarrollo Sostenible del Cultivo de Caña de Azúcar, que proporciona la orientación necesaria para el uso de este cultivo energético. En este contexto, el Congreso mexicano aprobó la Ley y el Desarrollo de la Bioenergética en 2008, para promover el uso de biocombustibles como bioetanol y biodiesel [5]. El gobierno mexicano y la Comisión Reguladora de la Energía publicaron y aprobaron la norma oficial mexicana NOM-016-CRE-2016, que permite la mezcla E6 etanol anhidro oxigenado en gasolina regular y Premium, vendidas por la compañía petrolera

nacional, Petróleos Mexicanos (PEMEX). El estándar oficial, sin embargo, no incluye las tres principales áreas metropolitanas: Ciudad de México, Guadalajara y Monterrey [2].

1.1.2 Bioetanol a partir de biomasa

Por biomasa se entiende al conjunto de materia orgánica renovable de origen vegetal, animal o procedente de la transformación natural o artificial de la misma. Aunque puedan provenir de cualquier actividad, desde el punto de vista de su posible utilización industrial, los más importantes son los que se denominan biomasa residual o residuos de origen vital [17].

La Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), utiliza la definición de la Especificación Técnica Europea CEN/TS 14588 para catalogar la “biomasa” como “todo material de origen biológico excluyendo aquellos que han sido englobados en formaciones geológicas sufriendo un proceso de mineralización”. Entre estos últimos estarían el carbón, el petróleo y el gas, cuya formación y composición hace miles de años no es comparable con lo que llamamos “el balance neutro de la biomasa” en las emisiones de dióxido de carbono (CO₂). La combustión de biomasa no contribuye al aumento del efecto invernadero, porque el carbono que se libera forma parte de la atmósfera actual (es el que absorben y liberan continuamente las plantas durante su crecimiento) y no del subsuelo, capturado en épocas remotas, precisamente como el gas o el petróleo [18].

Los recursos de biomasa para energía comprenden una variada gama de fuentes. Entre las fuentes primarias destacan los bosques y selvas nativos, y las plantaciones o cultivos para energía. Entre las secundarias están los residuos del aprovechamiento y la industrialización de la madera, los residuos de cultivos agrícolas y los residuos agroindustriales, entre otros [1].

Basado en las condiciones climáticas y la experiencia en prácticas agrícolas, las industrias de producción de bioetanol, tienden a depender de cultivos específicos. Por ejemplo, en áreas tropicales como la India, Brasil y el Caribe, la caña de azúcar es la primera opción. En otras partes del mundo, incluidos los Estados Unidos de América, Europa y China, los granos como el maíz y el trigo son la principal materia prima [19].

Según algunas estimaciones, la producción de bioetanol a partir de cultivos de fécula representa alrededor del 60% y de cultivos azucareros (principalmente caña de azúcar y remolacha azucarera) casi el 40% [10].

1.1.3 Obtención de bioetanol a partir de almidón

El almidón es una materia prima con un amplio campo de aplicaciones, que van desde la aportación de textura y consistencia a los alimentos hasta la manufactura de papel, adhesivos y empaques biodegradables. Es la principal fuente de almacenamiento de energía en los vegetales, ya que se encuentra en grandes cantidades en las diversas variedades de plantas, por ejemplo, en los granos de cereales, los cuales contienen entre 60 y 75% de su peso seco de almidón, así como también, puede encontrarse en tubérculos, semillas de leguminosas y en algunas frutas [20].

Estructuralmente, el almidón está formado por dos polisacáridos químicamente distinguibles: la amilosa y la amilopectina. La amilosa es un polímero lineal de unidades de glucosa unidas por enlaces α (1-4), en el cual algunos enlaces α (1-6) pueden estar presentes (Figura 1.1) puede formar micelas hidratadas por su capacidad para enlazar moléculas vecinas por puentes de hidrógeno y generar una estructura helicoidal (Figura 1.3).

Mientras que la amilopectina es un polímero ramificado de unidades de glucosa unidas en un 94-96% por enlaces α (1-4) y en un 4-6% con uniones α (1-6) (Figura 1.2). Dichas ramificaciones se localizan aproximadamente a cada 15-25 unidades de glucosa. Los gránulos de almidón se encuentran en un sistema polimérico semicristalino, donde la cristalinidad varía de 15 a 45%, y es atribuida a las cadenas cortas lineales de la amilopectina, que forman dobles hélices organizadas en una estructura cristalina tridimensional (Figura 1.4) [20].

Debido a que el almidón es un polisacárido, constituido por unidades de glucosa (de quinientos a varios cientos de miles de unidades) que podrían ser hidrolizadas (termoquímica o enzimáticamente) en azúcares simples [10], el proceso de producción de bioetanol a partir de la biomasa basada en almidón, es más complejo comparado con el

azúcar, ya que requiere el paso extra de sacarificación para despolimerizar las estructuras de amilosa y amilopectina y liberar los azúcares fermentables [10].

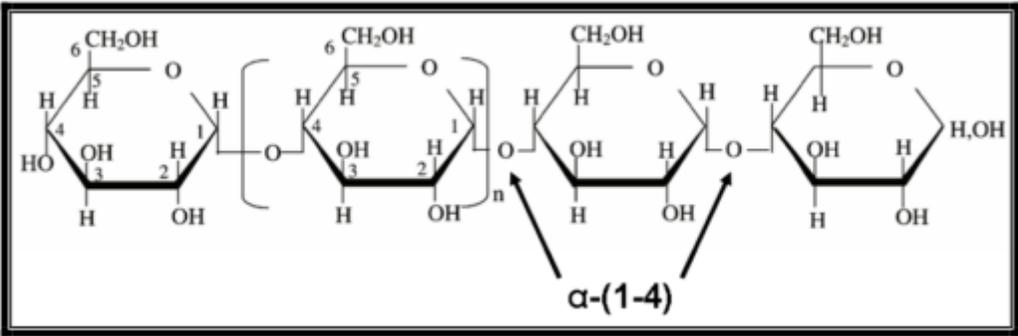


Figura 1.1: Estructura química de la amilosa [20].

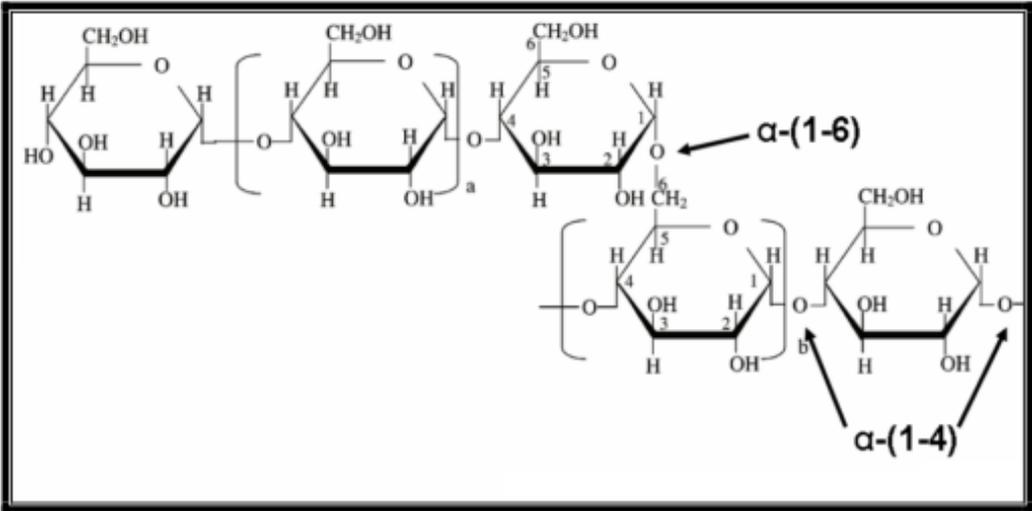


Figura 1.2: Estructura química de la amilopectina [20].

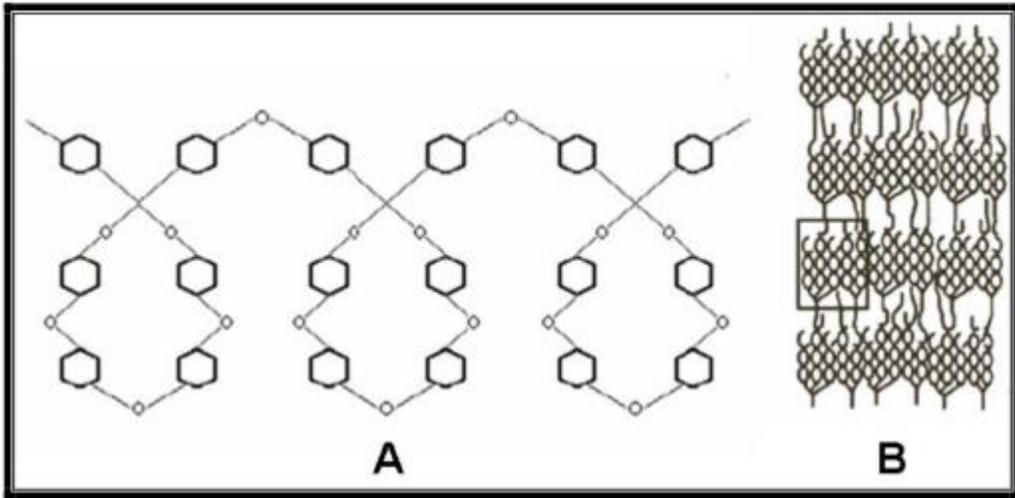


Figura 1.3: Estructura helicoidal de la amilosa (A) y estructura en racimos de la amilopectina (B) [21].

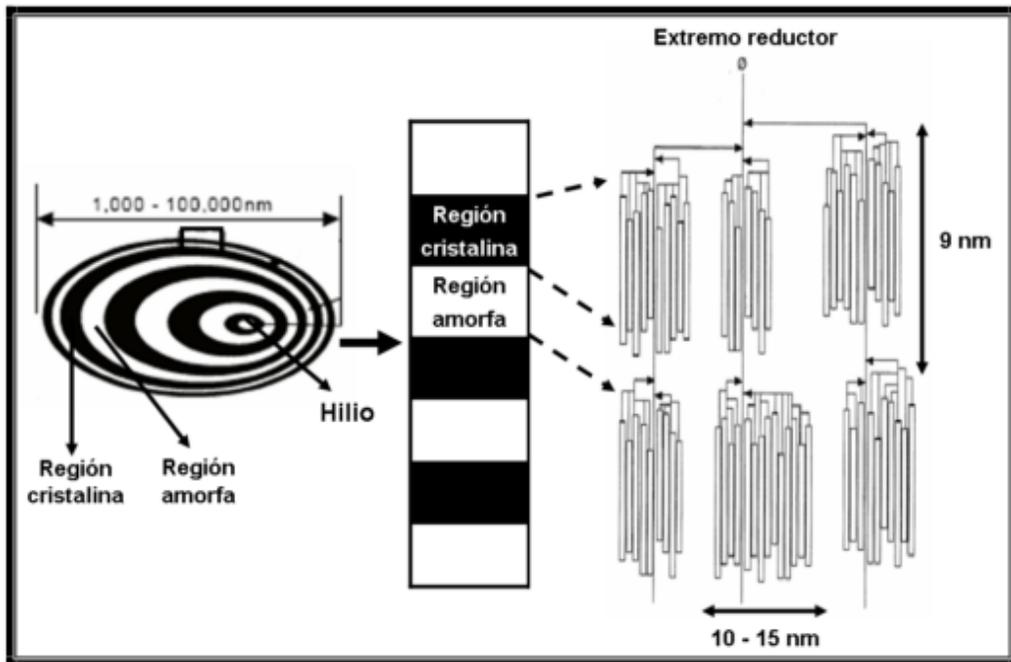


Figura 1.4: Estructura del gránulo de almidón [22].

En una planta, el almidón es sintetizado y almacenado en las células como gránulos que difieren en tamaño y forma. En general, todos los gránulos de almidón tienen una estructura muy densa y semicristalina, insoluble en agua fría, que actúan como reservas de carbono durante diferentes períodos de tiempo, el contenido de amilopectina se estima en un 75% y el de la amilosa en un 25% [21].

Existen varias fuentes que contienen almidón, como cereales, tubérculos y también algunas nueces y legumbres. Cabe señalar que el contenido de almidón en granos y tubérculos puede fluctuar considerablemente dentro de la misma especie, de acuerdo con el nivel de madurez, los rasgos genéticos y los factores ambientales durante el cultivo y la posterior fase de almacenamiento (Tabla 1.2) [10].

Tabla 1.2: Contenido de almidón en diversas fuentes de biomasa (% en peso sobre base seca) [10].

ORGANO DE ALMACENAMIENTO	PLANTA	CONTENIDO DE ALMIDON %
Granos	Maíz	60 - 68
	Trigo	60 - 65
	Sorgo	60 - 65
	Avena	50 - 53
	Centeno	60 - 65
	Arroz	70 - 72
Tubérculos de raíz	Yuca	25 - 30
	Ñame	08 - 18
	Camote	10 - 29
Tubérculos de tallo	Papa	22 - 24

1.1.4 Árbol de ramón (*Brosimum alicastrum* Sw).

El ramón (*B. alicastrum*), uno de los árboles dominantes de las selvas de México y Centroamérica, toma su nombre científico del griego *brosimos*, que significa comestible. En México y Guatemala se le conoce comúnmente como “ramón”. Este nombre, que proviene del verbo ramonear, hace referencia a que el ganado vacuno y otros animales domésticos consumen sus semillas, plántulas y hojas [15].

Es un árbol perennifolio de 20 a 30 m de altura, pudiendo alcanzar los 45 m (Figura 1.5). Se distribuye por la vertiente del Golfo de México desde Tamaulipas hasta Yucatán y Quintana Roo; por el Pacífico desde Sinaloa a Chiapas (Figura 1.6).

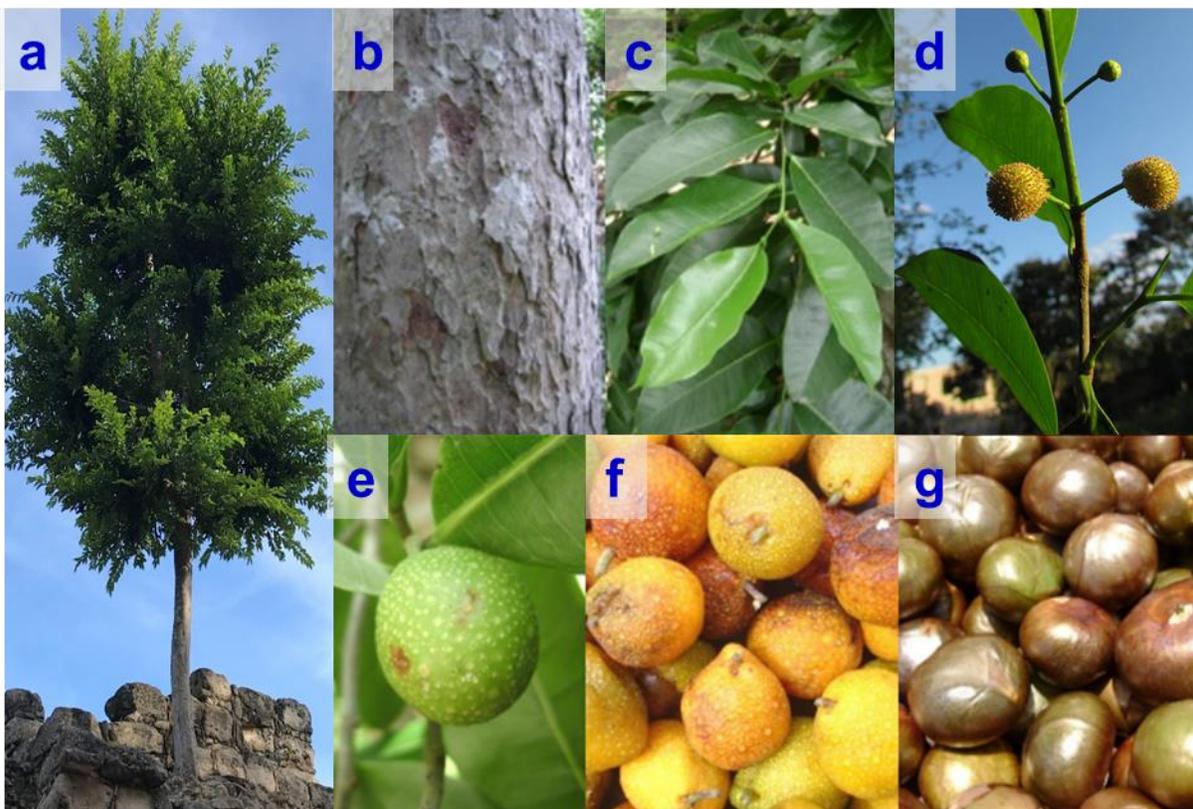


Figura 1.5: *Brosimum alicastrum* Sw. Árbol (a), corteza (b), hojas (c), flores (d), fruto inmaduro (e), fruto maduro (f) y semillas (g).



Figura 1.6: Distribución del árbol ramón en la República Mexicana [25].

El ramón se distribuye desde el norte de México hasta el estado de Acre en Brasil, incluyendo las islas caribeñas de Jamaica y Cuba. Debido a esta gran presencia, dependiendo de la región y país se le conoce por diversos nombres comunes (Tabla 1.3).

La especie puede prosperar exitosamente en plantaciones comerciales. Por lo que es factible capitalizar los servicios ambientales que ofrece y ayudar a la conservación de los ecosistemas tropicales [23].

En el área de las tierras bajas de la Península de Yucatán en México, el árbol crece en un ambiente semiárido caracterizado por una baja precipitación, una capa fina de suelo con afloramientos rocosos de piedra caliza y poca o ninguna superficie de agua. Además, hay una rápida filtración de agua debido a la topografía kárstica y la roca madre porosa del área. Como tal, las condiciones de cultivo para las especies de plantas son difíciles, y las especies que prosperan en tales ambientes pueden ser importantes para el desarrollo rural [24].

Tabla 1.3: Nombres indígenas de *Brosimum alicastrum* en México [22].

NOMBRE	LENGUA	ESTADO
A-agl	Tepehuana	Durango
Ash-Ahx	Tzeltal	Chiapas
Gueltzé	Zapoteca	Oaxaca
Hairi-te	Huichola	Jalisco
Jauri	Cora	Nayarit
Juskapu	Totonaca	Veracruz
Lan-fe-lá	Chontal	Oaxaca
Moj-cuji	Popoluca	Veracruz
Oox	Maya	Yucatán y Quintana Roo
Tlatlacóyic	Náhuatl	México
Tunumi-taján	Mixteca	Oaxaca
Yashalash	Lacandona	Chiapas

En Yucatán, el ramón es muy apreciado por ser un árbol forrajero. Se reporta que las hojas son altamente digeribles (> 60%) y contienen hasta el 13% de proteína. Se utiliza como forraje para el ganado vacuno, caprino y porcino principalmente. También se le considera medicinal, ya que el látex diluido con agua se usa como remedio para el asma y la bronquitis. Otro uso importante en la región es como árbol de sombra y ornato. La madera no ha sido aprovechada con fines domésticos o comerciales [25].

El ramón ha sido descrito como una de las especies tropicales con alto potencial; sin embargo, en la actualidad está subutilizado [26].

La semilla proveniente del árbol del ramón es una fuente importante de aminoácidos, es alta en fibra, calcio, potasio, ácido fólico y vitaminas A, B y C. En el periodo clásico (250-900 d.C.) fue el alimento más importante de los mayas [22]. Estudios realizados por la FAO reportan que la semilla del ramón presenta aproximadamente un 75 % de carbohidratos, entre un 11 % de proteína, y alrededor de 1 % de grasa (Tabla 1.4) [8].

Tabla 1.4: Composición de macronutrientes de la harina de semilla de ramón (*Brosimum alicastrum*) [8,27,28].

Nutrientes	Fuente			
	FAO (1993)	Peters et al. (1982)	Maya Nut Institute (2007)	Barquera (2014)
Carbohidratos*	76.1	-	76.2	72.25
Fibra cruda*	6.2	4.6	18.94	4.96
Proteína*	11.4	12.8	9.28	12.24
Lípidos*	1.6	-	0.44	1.10
Energía **	363	361	345.9	347.86
Humedad (%)	6.5	40-50	10.95	5.88

*g en 100 g de muestra **kcal en 100g de muestra

Barquera en el año 2008 [9] demostró que la harina de la semilla de ramón tiene potencial para ser empleada como materia prima en la producción de bioetanol, por su alto contenido de carbohidratos (72.25 %) del cual 61% es almidón.

Olgúin-Maciel en 2015, usó diferentes pretratamientos térmicos en el proceso de producción de bioetanol, logrando alcanzar concentraciones de ARD (azúcares reductores directos) en el rango de 67 a 97 g·l⁻¹, el 50% de la producción máximo teórica de azúcares reductores, logrando un aumento del 33% en comparación con el de la harina no tratada y demostró que los granos de almidón se encuentran embebidos en una matriz proteica que limita su accesibilidad para ser hidrolizados por las enzimas amilolíticas [6].

En el año 2017, Olgúin-Maciel y col. realizaron el primer estudio sobre la producción de bioetanol a partir de la harina de semilla de ramón y una cepa de levadura nativa aislada del pericarpio (*Candida tropicalis* PL1). La cepa de levadura nativa fue superior a la cepa comercial *Saccharomyces cerevisiae* (Safoeno), fermentando el 98.8% del azúcar reductor (RS) a las 48 h y generando un 31% más de etanol que la levadura comercial. Se estimó que a partir de una tonelada de harina se pueden obtener 213 L de etanol. Estos resultados sugirieron que la harina de ramón es un excelente candidato para la producción de etanol [7]

1.1.5 Pretratamientos.

El pretratamiento es un paso esencial para obtener azúcares potencialmente fermentables en la etapa de hidrólisis. El objetivo del tratamiento previo, es descomponer la estructura de la lignina e interrumpir la estructura cristalina de la celulosa y del almidón, para mejorar el acceso de las enzimas durante la etapa de hidrólisis [29].

Es empleado para modificar la estructura de carbohidratos complejos usados en la producción de bioetanol, y facilitar su transformación en compuestos más simples. En fuentes o sustratos con almidón, tiene como objetivo favorecer la hidrólisis enzimática. Desde una simple extracción hasta una hidrólisis de polisacáridos más elaborada, el primer paso es maximizar la extracción de azúcares fermentables y luego pasar a las etapas de fermentación y purificación [10].

Un pretratamiento, en este caso, debe tener las siguientes características [30]:

- (1) Mejorar la digestibilidad de la celulosa y el almidón en la posterior hidrólisis enzimática.
- (2) Evitar la degradación o pérdida de carbohidratos.
- (3) Evitar la formación de subproductos inhibidores para los procesos posteriores, hidrólisis enzimática y fermentación de azúcares.
- (4) Ser costo-efectivo.

Se pueden emplear métodos mecánicos, químicos, físicos, biológicos y enzimáticos.

Métodos mecánicos: reducción de tamaño de partícula por medio de molido, extrusión.

Físicoquímicos: Ultrasonido, explosión con vapor, explosión con fibra de amoníaco (AFEX), hidrotérmico.

Químicos: hidrólisis ácida y/o básica, proceso organosolvente.

Métodos biológicos: Uso de microorganismos y degradación enzimática

Otra opción es usar la combinación de dos o más de estos pretratamientos para mejorar la conversión del almidón en azúcares fermentables [31].

1.1.5.1 Pretratamiento mecánico.

Trituración mecánica: La molienda es usada principalmente para reducción de las partículas a un tamaño de malla inferior a 40 micras [32]. Para los procesos húmedos los granos se muelen y suspenden con agua para formar una mezcla. Para el proceso de molienda en seco, el grano de maíz entero se muele y luego se mezcla con agua y enzimas. En este caso, los componentes del núcleo no fermentados, incluido el germen, la fibra y la proteína, podrían separarse y producirse como coproductos [33]. La ventaja de este tipo de tratamiento es que reduce el tamaño de las partículas del material (0,2-2 mm), mejorando así la eficacia de los pretratamientos físicos y / o químicos posteriores mediante el aumento de la superficie de contacto con los reactivos [10]. El principal inconveniente de esta etapa es su elevado consumo energético, lo que depende del tamaño final de partícula y del tipo de material [34].

1.1.5.2 Pretratamiento Fisicoquímico.

Tratamiento de calentamiento en seco (DHT): es un tratamiento físico que cambia las propiedades fisicoquímicas del almidón, sin destruir su estructura granular. Comparado con los métodos químicos, el calor seco es un método simple, seguro y saludable [35].

Ultrasonido: Es un proceso de pretratamiento que sustituye el calentamiento convencional. Sus principales ventajas son la disminución de los tiempos de reacción, lo que ahorra tiempo y energía, además de homogeneizar el calentamiento de la mezcla de reacción y minimizar la generación de inhibidores.

El tratamiento con ultrasonido (ondas de sonido en un rango de frecuencia de 15-20 kHz o superior) es uno de los métodos físicos de modificación del almidón que conduce a su despolimerización. Este proceso, en contraste con los métodos químicos, se considera respetuoso con el medio ambiente, ya que reduce el uso de productos químicos, la producción de desechos y el consumo de energía [36].

La aplicación de microondas a la biomasa lignocelulósica, es una de las técnicas de pretratamiento más prometedoras que permiten cambiar la estructura nativa de la celulosa e inducir la degradación de la hemicelulosa y en menor medida, de la lignina [37].

Cuando los materiales en una suspensión líquida se tratan por ultrasonidos, las partículas se someten a erosión superficial (por colapso cavitacional en el líquido circundante) o a reducción de tamaño (debido a la fisión a través de colisión interpartícula o el colapso de las burbujas de cavitación formadas en la superficie) [38]. A través de la cavitación, que es un fenómeno producido cuando la presión alcanza el valor de la tensión de vapor, el fluido que circulaba en estado líquido, cambia de estado y se evapora, apareciendo burbujas o "cavidades" en los puntos de baja presión en la onda de sonido [39,40]. Los efectos sonoquímicos están relacionados con las concentraciones de radicales libres en la interfaz entre las burbujas y el líquido circundante. También puede estar presente un tercer efecto basado en las fuerzas mecánicas y de corte causadas por microtransmisión y shock [41].

Los tratamientos con ultrasonido han demostrado ser de gran utilidad ya que permiten mejorar el proceso de licuefacción y sacarificación, dando como resultado un mayor rendimiento de hidrólisis. Todo esto, debido a los efectos físicos causados por las ondas de choque y fuerzas de corte provocadas por la transmisión acústica, el colapso de las micro burbujas generadas y los efectos químicos provocados por la formación de radicales libres de la descomposición del agua como son los radicales hidroxilos (-OH) e hidrógeno (-H). El tratamiento ultrasónico, conduce a la destrucción de la estructura de doble hélice de algunos de los almidones, lo que contribuye a la gelatinización y licuefacción del almidón [42,43].

Explosión por vapor: La explosión por vapor es el método más comúnmente utilizado para el pretratamiento de materiales lignocelulósicos [30]. La materia prima se somete a temperaturas entre 160 - 260 °C, mediante la inyección directa de vapor saturado, por un intervalo entre 1 y 10 minutos. Seguidamente se lleva el producto a una rápida descompresión hasta presión atmosférica. Como resultado se obtiene biomasa con alteraciones físicas (desagregación y ruptura de las fibras) y químicas (despolimerización y rotura de enlaces) y una celulosa más accesible a la hidrólisis enzimática. Las variables a controlar, en este tipo de procedimiento, son la temperatura, el tiempo de residencia, el tamaño de partícula y la humedad [44]. Estudios recientes indican que una temperatura más baja y un tiempo de residencia más largo son más favorables. Las ventajas del pretratamiento por explosión de vapor incluyen el bajo requerimiento de energía en

comparación con la trituración mecánica y sin costos de reciclaje o ambientales. Los métodos mecánicos convencionales requieren un 70% más de energía que la explosión por vapor para lograr la misma reducción de tamaño de partícula [30].

Tratamiento hidrotérmico: En este proceso se somete la biomasa al efecto de agua caliente, a una temperatura entre 170 – 230 °C por 46 min. El objetivo de este pretratamiento es solubilizar principalmente la hemicelulosa para hacerla más accesible y evitar la formación de inhibidores. Para ello, el pH debe mantenerse entre 4 y 7 durante el pretratamiento, a fin de minimizar la formación de monosacáridos y, por lo tanto, también la formación de productos de degradación, que puede seguir catalizando la hidrólisis del material celulósico durante el pretratamiento [45].

Proceso de explosión de fibra con amoníaco (AFEX): Es otro tipo de tratamiento previo, físico-químico, en el que los materiales lignocelulósicos se exponen a amoníaco líquido a alta temperatura y presión durante un período de tiempo, y luego la presión se reduce rápidamente. El concepto de AFEX es similar a la explosión por vapor [30]. El pretratamiento con amoníaco se realiza con cargas de amoníaco en proporción 1:1 (amoníaco kg/kg peso biomasa seca), a temperaturas que van desde la temperatura ambiente (20 – 25 °C), donde es requerida una presión superior a 12 ATM, con una duración de 10 a 60 días, a temperaturas de hasta 120 °C, con una duración de varios minutos [46]. El pretratamiento con amoníaco no produce inhibidores para los procesos biológicos posteriores, por lo que no es necesario el lavado con agua y no requiere un tamaño de partícula pequeño para su eficacia [21,30].

1.1.5.3 Pretratamiento Químico.

Hidrólisis ácida: El objetivo principal del pretratamiento ácido es la solubilización de la fracción hemicelulósica de la biomasa, para aumentar la accesibilidad de las enzimas en la reacción de hidrólisis enzimática. Se han usado ácidos inorgánicos como H₂SO₄, HCl y H₃PO₄ para el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica, con el fin de mejorar la hidrólisis enzimática. Se pueden usar ácidos inorgánicos concentrados y diluidos. El pretratamiento de la biomasa con ácidos concentrados, a temperatura ambiente, conducirá a mayores rendimientos de azúcares fermentables ya la hidrólisis tanto de la celulosa como de las

hemicelulosas. Se usan frecuentemente ácidos como H_2SO_4 72%, HCl 41% y ácido trifluoroacético 100% [47].

Hidrólisis alcalina: El pretratamiento con soluciones alcalinas aumenta la digestibilidad de la celulosa y favorece la solubilización del almidón y la lignina. Puede ocurrir a temperatura ambiente y el tiempo de reacción puede variar de segundos a días. Produce una menor degradación de los azúcares que en el pretratamiento con ácido, pero se ha demostrado que es más eficiente para residuos de cultivos que para biomasa lignocelulósica. Para la optimización de las condiciones de pretratamiento, se debe tener en cuenta la posibilidad de perder los azúcares fermentables y la formación de algunos compuestos inhibidores. Los reactivos que se usan frecuentemente para el pretratamiento alcalino son NaOH, KOH, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, NH_4OH . El más utilizado es el NaOH. Por ejemplo, el pretratamiento con soluciones de NaOH conduce a la hinchazón y al aumento de la superficie interna de la celulosa [29].

Tratamiento con solventes orgánicos: Se utilizan varios disolventes orgánicos o acuosos (metanol, etanol, acetona, etilenglicol) para solubilizar la lignina y obtener una celulosa tratada para el proceso de hidrólisis. La ventaja del procedimiento con organosolventes consiste en la recuperación de lignina como producto secundario. La temperatura máxima de trabajo es de 205 °C, con respecto al solvente usado. La rentabilidad del proceso depende de la recuperación del disolvente orgánico [48].

Oxidación húmeda: Un pretratamiento oxidativo consiste en la adición de un compuesto oxidante, como el peróxido de hidrógeno o ácido peracético a la biomasa, que está sumergida en el agua. Durante el pretratamiento oxidativo, pueden tener lugar reacciones como sustitución electrofílica, el desplazamiento de cadenas laterales, rompimientos de vínculos de alquil, aril, éter o de núcleos aromáticos. Esto dará como resultado la descomposición de los gránulos de almidón y la liberación de almidón [10].

Tratamientos con ozono: El ozono ha sido utilizado para degradar la lignina y la hemicelulosa. Se lleva a cabo en condiciones de presión y temperatura ambiente. La degradación es esencialmente limitada a atacar la lignina y la hemicelulosa, aunque la celulosa es afectada [30]. Las ventajas que se plantean son la efectiva degradación de la lignina, la no producción de productos tóxicos que afecten a los procesos posteriores y la

simplicidad del tratamiento, ya que se realiza a temperatura ambiente y presiones atmosféricas. El inconveniente del proceso es el elevado costo por el empleo de una gran cantidad de ozono [34].

1.1.5.4 Pretratamiento biológico.

El pretratamiento biológico es favorable al ambiente y puede llevarse a cabo en condiciones sencillas, consume poca energía y requiere procedimientos y equipos simples. Los hongos de pudrición blanca son los microdeconstructores de lignina más efectivos organismos en la naturaleza. Pueden degradar completamente la lignina en dióxido de carbono, y han recibido una gran atención para la biodeslignificación de la biomasa lignocelulósica. Las habilidades de deslignificación de los hongos de podredumbre blanca difieren entre géneros, especies e incluso variedades [49]. Para el pretratamiento biológico de la biomasa lignocelulósica se utilizan tanto microorganismos (hongos y bacterias) como enzimas. Se utilizan los hongos de la podredumbre blanca, podredumbre marrón o de la podredumbre blanda para solubilizar la hemicelulosa y también para degradar la lignina. Los hongos de la podredumbre blanca (basidiomicetos) son los más eficaces para el pretratamiento biológico de materiales lignocelulósicos [50]. Para el pretratamiento enzimático de la biomasa, se utilizan diferentes celulasas como endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas [30].

En este tratamiento, el material lignocelulósico se somete a la acción de determinadas enzimas o microorganismos, como los hongos de la podredumbre blanca, marrón o blanda. El objetivo es degradar la lignina y la hemicelulosa, eliminando las barreras que protegen la celulosa y haciéndola más accesible al posterior ataque enzimático, por lo que generalmente se necesita hacer primero un tratamiento con hongos y posteriormente con las enzimas [32].

1.1.6 Hidrólisis de almidón.

El almidón es la segunda fuente de carbono (energía) más importante y abundante y en las plantas, y por lo tanto tiene gran demanda en el mercado y muchas aplicaciones en la

industria. Puede usarse para producir muchos productos alimenticios valiosos en la industria de procesamiento de alimentos, como maltosa, glucosa, fructosa, jarabes de glucosa y fructosa, ácidos orgánicos, aminoácidos, etc. Además, el almidón es también una importante materia prima en la industria de la fermentación y puede ser sacarificado y fermentado para producir etanol, que se utiliza como base para bebidas o como biocombustible alternativo [51].

Convencionalmente, la forma de convertir el almidón en oligosacáridos más pequeños y glucosa en la industria incluyen la licuefacción y sacarificación, que principalmente implican hidrólisis con α -amilasa, que es una endo-enzima que se obtiene principalmente de bacterias termo resistentes como *Bacillus licheniformis*, *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis* y glucoamilasa bajo condiciones de alta temperatura [9].

La Hidrólisis enzimática del almidón a alta temperatura requiere grandes aportes de energía y equipo adicional, lo que resulta en un aumento en el costo de producción de productos derivados del almidón [51,52].

1.1.7 Licuefacción.

El almidón se encuentra en la naturaleza como gránulos insolubles, resistentes a la degradación enzimática. Los granos que contienen almidón, como el maíz, el trigo, el centeno y el sorgo, se deben triturar hasta obtener una harina fina, de por lo menos de 12-16 mallas, para exponer los gránulos de almidón en la suspensión y dar lugar a la gelatinización que es la hinchazón del gránulo de almidón en presencia de agua y a una temperatura superior a 60 °C. El almidón pierde sus características cristalinas y se convierte en un gel amorfo que puede ser degradado por enzimas. En este punto, la suspensión de almidón se espesa considerablemente, y sería difícil de procesar si no se añadiera una enzima α -amilasa termófila a alta temperatura (85 -105 °C) y a pH 6.0 - 6.5 [9], capaz de degradar el polímero de almidón, mediante la hidrólisis rápida e aleatoria de los enlaces alfa 1 - 4. La alta temperatura y la trituración mecánica, mejoran la ruptura de moléculas de almidón, especialmente las de carbohidratos de alto peso molecular a peso molecular más bajo, llamadas azúcares de almidón o dextrinas, la solución adquiere una consistencia menos viscosa; por lo tanto, decimos que el almidón se gelatinizó y licuó. La α -amilasa sirve

para reducir la viscosidad de la solución al producir un sustrato de menor tamaño molecular. Esta molécula de sustrato más pequeña es necesaria para la acción eficiente de la glucoamilasa que hidroliza las dextrinas a glucosa [21,53].

1.1.8 Sacarificación.

Este proceso es una hidrólisis adicional a la licuefacción, donde se produce principalmente maltosa, maltotriosa, glucosa y algunos oligómeros. El almidón licuado se enfría y el pH se ajusta a 4.0 - 4.5. Utilizando amilogucosidasas, que son exo-amilasas obtenidas principalmente de *Aspergillus niger* o *Rhizopus* sp. [36], cuya función es catalizar la hidrólisis de los enlaces glucosídicos α -(1,4) y α -(1,6), se obtiene la glucosa de los extremos no reductores de los oligosacáridos. Esta reacción se lleva a cabo a temperaturas menores que las de la licuefacción (60 - 70 °C) [51]. La respuesta de afinidad que presenta la enzima amilogucosidasa sobre el sustrato depende de los productos formados durante la etapa de licuefacción [9].

1.1.9 Fermentación

Es un proceso celular conservador de energía, típicamente (pero no necesariamente) anaeróbico en el que los compuestos orgánicos sirven tanto como donadores que como aceptores de electrones y los compuestos orgánicos son convertidos en compuestos más simples y se produce energía química (ATP). Los microorganismos empleados suelen ser levaduras, bacterias y hongos filamentosos, que se nutren de azúcares simples y en el proceso producen alcohol etílico y otros subproductos, ellos son capaces de producir enzimas, proteínas causantes de la degradación de la materia orgánica y obtener energía en forma de ATP [34].

La fermentación alcohólica es una bioreacción que permite degradar azúcares en alcohol y dióxido de carbono. La conversión se representa mediante la ecuación:



La mayoría de los microorganismos en el proceso de fermentación, pueden usar típicamente azúcares de hexosa, especialmente glucosa, pero también manosa y galactosa. Otros, limitados en número, usan azúcares pentosas como la xilosa y, en menor medida, arabinosa y ribosa. Por lo tanto, la biomasa con alto contenido de celulósico es más fácil de convertir a bioetanol [10].

Los principales microorganismos que llevan a cabo dicha reacción son las levaduras. *Saccharomyces cerevisiae*, es la especie de levadura empleada con mayor frecuencia. Este tipo de levaduras solamente fermentan hexosas y no son capaces de degradar las pentosas. Sin embargo, existen diversos estudios donde han logrado la producción de biocombustibles empleando otros tipos de levaduras y algunas bacterias, como *Zymomonas mobilis* [34,54].

Teóricamente, 100 g de glucosa producirán 51,4 g de bioetanol y 48,8 g de dióxido de carbono. Pero, en la práctica, los microorganismos en fermentación consumirán algo de la glucosa para su crecimiento, por lo que el rendimiento real siempre será inferior al 100% [21].

El éxito de una buena fermentación depende de la eficacia del tratamiento preliminar, así como de la concentración de azúcar, el pH y la temperatura de la materia que se quiera fermentar [34].

1.1.10 Destilación y Deshidratación.

El principal problema de la producción de bioetanol anhidro, es el alto costo energético que conlleva su separación, ya que, durante la etapa de fermentación, se obtienen grandes cantidades del producto de la fermentación, con bajas concentraciones de alcohol (entre 5-12% en peso) por lo que es necesario eliminar el exceso de agua. Los métodos convencionales para la recuperación de etanol anhidro, a partir del caldo de fermentación, comprenden al menos tres etapas, las cuales se describen a continuación [54]:

- Destilación convencional del etanol diluido hasta una concentración cercana a su punto azeotrópico (95,57% en peso),

- Destilación extractiva o azeotrópica usando un tercer componente para romper el azeótropo y remover el agua restante.
- Destilación para recuperar el tercer componente y reutilizarlo en el proceso.

El bioetanol se recupera del caldo fermentado a través de la destilación del medio final compuesto por agua y etanol (5-12% en peso). El método convencional separa los compuestos en función de sus volatilidades relativas. Por lo tanto, cualquier mezcla binaria ideal podría calentarse de modo que los componentes de bajo punto de ebullición se concentren en la fase de vapor. Luego, al condensar este vapor, los compuestos menos volátiles se concentran adicionalmente en la fase líquida producida. En una destilación fraccionada, la etapa de evaporación/condensación se repite muchas veces para que en cada momento el vapor resultante se enriquezca más del componente más volátil hasta la purificación completa [10]. La recuperación del etanol por estos métodos implica el consumo de entre 50 y 80% de la energía total requerida en el proceso de fabricación de etanol vía fermentativa. Entre los “arrastradores” que se utilizan más comúnmente para la destilación azeotrópica del alcohol se encuentran el benceno, el tolueno y el ciclohexano. Para el caso de la destilación extractiva, los agentes extractores más utilizados son los glicoles como el etilenglicol y el butilenglicol [54].

JUSTIFICACIÓN

La creciente búsqueda de alternativas para la obtención de energía a partir de fuentes renovables, ha conducido a que la investigación se dirija hacia el uso de la biomasa como fuente energética. Este es el caso de la especie *Brosimum alicastrum* Sw conocida como árbol de ramón, se ha visto que por los contenidos de su semilla puede ser empleada como cultivo energético.

A partir de estudios anteriores, donde se propuso el uso de harina de ramón para la producción de bioetanol por su composición, posteriores estudios demostraron que los gránulos de almidón se encuentran embebidos en una matriz proteica que limita su accesibilidad para ser hidrolizados por las enzimas amilolíticas, pero por medio del uso de un tratamiento térmico y una cepa de levadura nativa, es posible lograr un buen porcentaje de hidrólisis (72%) lo que demuestra que la harina de la semilla de *B. alicastrum* es buen candidato para la producción de bioetanol.

El objetivo de este trabajo fue evaluar diferentes pretratamientos ultrasónicos combinados con el uso de enzimas amilolíticas, que permitieran la liberación de los gránulos de almidón y por lo tanto, una mayor eficiencia en la hidrólisis enzimática, y consecuentemente un incremento en la obtención de azúcares fermentables y una mayor producción de bioetanol a partir de harina de ramón.

HIPÓTESIS

El pretratamiento ultrasónico combinado con enzimas producirá cambios estructurales en el gránulo de almidón, lo cual permitirá un incremento en la eficiencia del proceso de hidrólisis enzimática para la obtención de azúcares fermentables a partir de harina de ramón.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- ✚ Evaluar el pretratamiento ultrasónico sobre la estructura de la harina de *B. alicastrum* Sw. y su efecto en la hidrólisis enzimática.

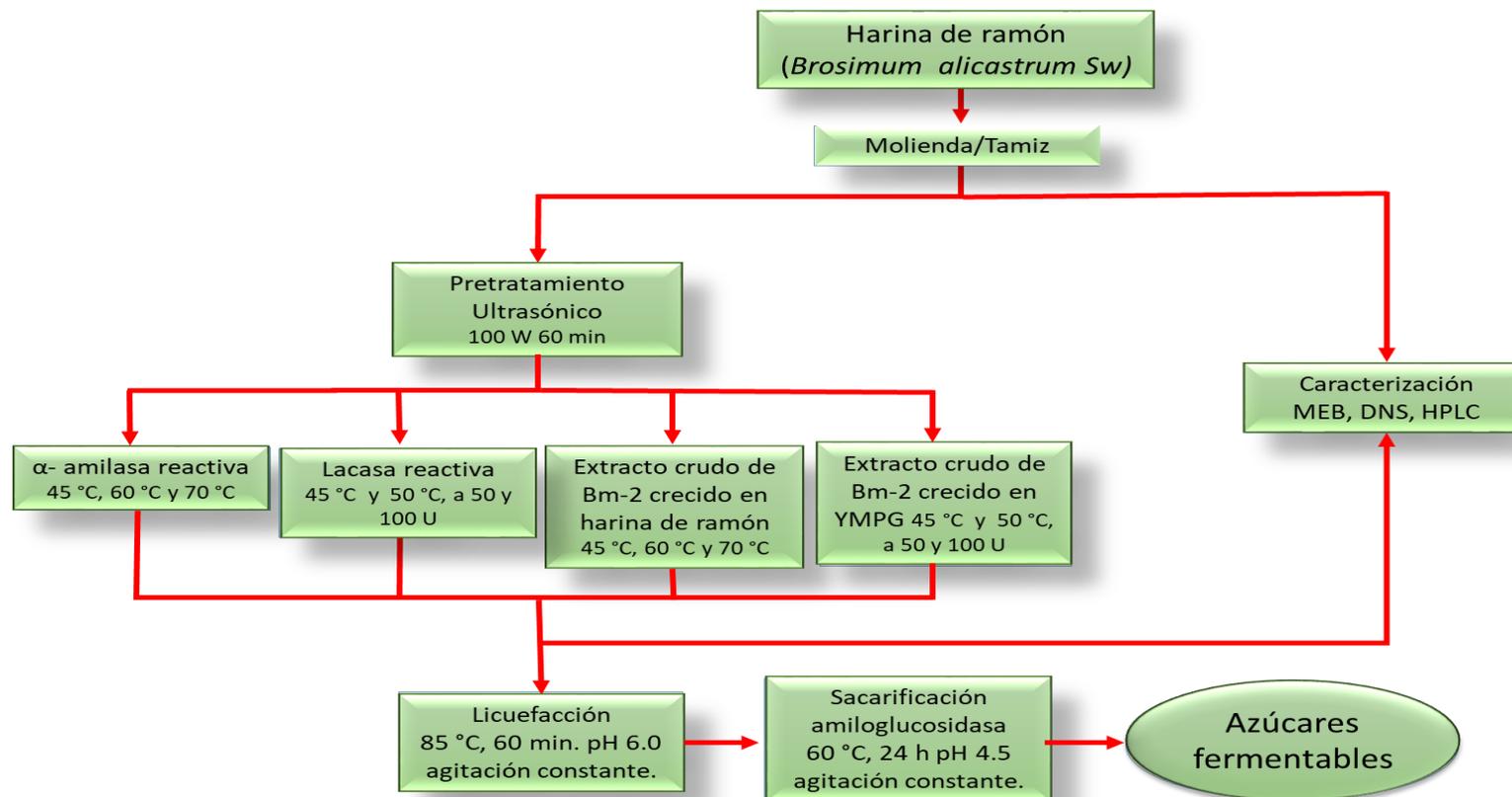
OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✚ Caracterizar la harina de ramón antes y después de los diferentes pretratamientos.
- ✚ Evaluar el efecto simultáneo del ultrasonido a diferentes temperaturas con la enzima α -amilasa en la hidrólisis de la harina de ramón.
- ✚ Evaluar el efecto simultáneo del ultrasonido a diferentes temperaturas con el extracto enzimático obtenido de la cepa *T. hirsuta* Bm-2 con dos medios inductores (YMPG y harina de ramón al 5%) en la hidrólisis de la harina de ramón.
- ✚ Evaluar el efecto simultáneo del ultrasonido a diferentes temperaturas con la enzima lacasa en la hidrólisis de la harina de ramón.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 Estrategia experimental.



2.2 Materia Prima

Para llevar a cabo todos los experimentos se utilizó harina de semillas de ramón, previamente elaborada según la metodología descrita por Larqué [55], con un rango de tamaños de partículas entre 0.5-0.7 mm y humedad del 12%.

2.3 Cuantificación de azúcares reductores directos.

Los azúcares reductores directo (ARD) se cuantificaron mediante el método de Miller [56] el cual se describe a continuación: se adicionaron 0.1 ml de muestra en 1.4 ml de agua destilada y 3 ml de ácido 3, 5-dinitrosalicílico (DNS). La mezcla se hirvió durante 5 minutos, se enfrió a temperatura ambiente (de 20 a 25°C) y se aforó a 15 ml. Se realizaron lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 550 nm, la concentración se determinó extrapolando los valores de absorbancia a una curva estándar de glucosa.

2.4 Cuantificación de azúcares por HPLC

Para la cuantificación de azúcares se utilizó un cromatógrafo HPLC modelo 1260 INFINITY (Agilent Technologies, GA, EUA) equipado con un detector de índice de refracción (RID). La separación se llevó a cabo con una columna ZORBAX Carbohydrate 4.6 x 250 mm x 5 μ (Agilent Technologies, GA, EUA). Las condiciones para el análisis fueron: la fase móvil consistió en una mezcla de solventes con 75% de acetonitrilo y 25% de agua; flujo de 2.0 ml·min⁻¹, a una temperatura de 40°C en los calefactores y 35°C en el detector. Se inyectaron 20 μ l de muestra.

2.5 Caracterización física de la harina de ramón.

La caracterización física se hizo con la harina de *B. alicastrum* sin tratar, y posteriormente se caracterizó la harina que fue sometida a los pretratamientos fisicoquímicos y biológicos. La técnica utilizada se describe a continuación:

2.5.1 Microscopia electrónica de barrido (SEM).

Para conocer la estructura microscópica de la harina y el efecto del pretratamiento, se utilizó la técnica de microscopia electrónica de barrido (SEM, modelo JSM-6360LV, JEOL, Tokio, Japón). Se montaron muestras de harina en un barril metálico con cinta adhesiva de doble cara recubierta con una capa de oro de 15 nm y se observaron en 20 Kv [57].

2.6 Preparación de extractos enzimáticos.

Para la preparación del extracto enzimático (EA) se utilizaron 500 ml de solución de harina de ramón al 5% en agua. Mientras que para la preparación del extracto enzimático (EL) se creció el hongo *T. hirsuta* Bm-2 (GQ280373) en 500 ml de medio YMPG (Anexo 7) usando la metodología de Zapata-Castillo[58]. Para ambos extractos se inocularon 10 discos de la cepa Bm-2 reactivada y crecida en medio YMPG (Anexo 7). Cada uno de los medios inductores con los cultivos fungosos, se colocaron en un reactor aireado a 35°C, a 160 RPM, durante 5 días.

2.7 Pretratamientos

2.7.1 Pretratamiento por Ultrasonido con enzima α -amilasa (EC 3.2.1.1).

Se prepararon suspensiones de harina de ramón en 100 ml de buffer fosfato (0.1 M, pH 6.0) al 20% (p/v) para los pretratamientos con la enzima α -amilasa (0.075 U/g) (A-7595 Sigma-Aldrich®), el extracto EA (50 U/ml de enzima α -amilasa y 100 U/ml de enzima lacasa) y los controles (tabla 2.1). En todos los casos, las suspensiones se transfirieron a un baño ultrasónico (Cole-Parmer®, E.U.A).

Tabla 2.1: Pretratamientos con Enzima α -Amilasa y EA.

Pretratamientos	100 Watts	60 min.
	Enzima	Temperatura (°C)
CA45	-	45
CA60	-	60
CA70	-	70
A45	3.6 μ l de enzima α -amilasa + 166.15 mg de CaCl ₂	45
A60	3.6 μ l de enzima α -amilasa + 166.15 mg de CaCl ₂	60
A70	3.6 μ l de enzima α -amilasa + 166.15 mg de CaCl ₂	70
EA45	1 ml de EA	45
EA60	1 ml de EA	60
EA70	1 ml de EA	70

Cada mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente (25 °C) [59]. El experimento se realizó por triplicado y se tomaron muestras, al terminar el proceso, para medir los azúcares reductores y observarlas con el microscopio electrónico de barrido.

2.7.2 Pretratamiento Ultrasónico con la enzima Lacasa (EC 1.10.3.2).

Se prepararon suspensiones de harina de ramón en 100 ml con agua destilada al 20% (p/v), esto debido a que la enzima no funciona de forma ideal con el buffer fosfato y con el fin de no afectar los procesos subsecuentes se optó por manejar agua destilada como mejor opción, para los pretratamientos con la enzima lacasa de *Aspergillus* Sp (SAE0050 Sigma-Aldrich®), el extracto EL y los controles (Tabla 2.2). Se transfirió cada suspensión a en un baño ultrasónico (Cole-Parmer®, E.U.A).

Tabla 2.2: Pretratamientos con enzima Lacasa y EL.

Pretratamientos	100 Watts		60 min.
	Enzima	Concentración (U/ml)	Temperatura (°C)
CL45	-		45
CL50	-		50
L50-45	1 ml de enzima lacasa	50	45
L50-50	1 ml de enzima lacasa	50	50
L100-45	1 ml de enzima lacasa	100	45
L100-50	1 ml de enzima lacasa	100	50
EL50-45	1 ml de EL	50	45
EL50-50	1 ml de EL	50	50
EL100-45	1 ml de EL	100	45
EL100-50	1 ml de EL	100	50

La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente (25 °C) [59]. El experimento se realizó por triplicado y terminado el proceso se tomaron muestras para medir los azúcares reductores y para observar al microscopio electrónico de barrido.

2.8 Hidrólisis

2.8.1 Licuefacción.

Todas las muestras pretratadas se enfriaron a temperatura ambiente (25 °C ± 2), se ajustó el pH a 6.0 con hidróxido de potasio (KOH) 1N. Se agregaron 60 ppm de Ca⁺² en forma de cloruro de calcio y 3.6 µl de enzima α-amilasa (A-7595 Sigma-Aldrich®), lo que equivale a aplicar 0.075 unidades de la enzima por gramo de almidón presente en la harina,

únicamente a los tratamientos con enzima α -amilasa y EA no se adicionó la enzima ni el CaCl_2 .

Se homogenizaron las mezclas y se colocaron en una placa de calentamiento, donde se calentaron en baño María a 85 ± 2 °C durante 1 hora, con agitación constante de 25 rpm [9].

2.8.2 Sacarificación.

Las suspensiones obtenidas de la licuefacción se ajustaron a pH 4.5 con ácido clorhídrico 1N. Se adicionaron 14.4 μl (0.36 U/g) de la enzima amiloglucosidasa (A-7095, Sigma-Aldrich ®); y se incubaron a 60 ± 2 °C durante 24 h [9], con una agitación constante de 100 rpm, en un equipo de agitación MaxQ™ 4000 Benchtop Orbital Shaker, Thermo Scientific, EUA.

2.9 Análisis de los resultados

Concluida la hidrólisis de los pretratamientos se hizo el análisis de azúcares reductores a cada una de las muestras. Posteriormente se hizo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y prueba de medias de Tukey $\alpha=0.05$, para poder determinar qué pretratamiento fue mejor.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1 Efecto del pretratamiento ultrasónico sobre la estructura de la harina de semillas de ramón.

En la figura 3.1a, se puede apreciar que los gránulos de almidón se encuentran empaquetados en una matriz proteica, lo que confirma lo reportado por Olgún-Maciél y col. en el 2017 [7] al igual que Warren y col. [60], quienes afirman que dicha matriz les brinda protección y disminuye el porcentaje de amilólisis de las enzimas. En este caso, se puede ver como se encuentra intacta, ya que no ha sido expuesta a ningún pretratamiento o a la acción de alguna enzima. La figura 3.1b, se aprecia que los gránulos de almidón pueden presentar diversas formas: redondas, ovaladas, esféricas-truncadas, tal como se ha reportado en estudios y caracterización de almidón en tubérculos como la Yuca y el Camote [20].

Las dimensiones del gránulo de almidón se muestran en la figura 3.1c, con un diámetro de 9.81 μm , lo que coincide con lo reportado por Pérez-Pacheco y col. [61] quienes determinaron que los gránulos de almidón obtenidos de *B. alicastrum* tienen una forma oval-esférica con un diámetro aproximado de 10.8 μm , que varía de 6.5 a 15 μm .

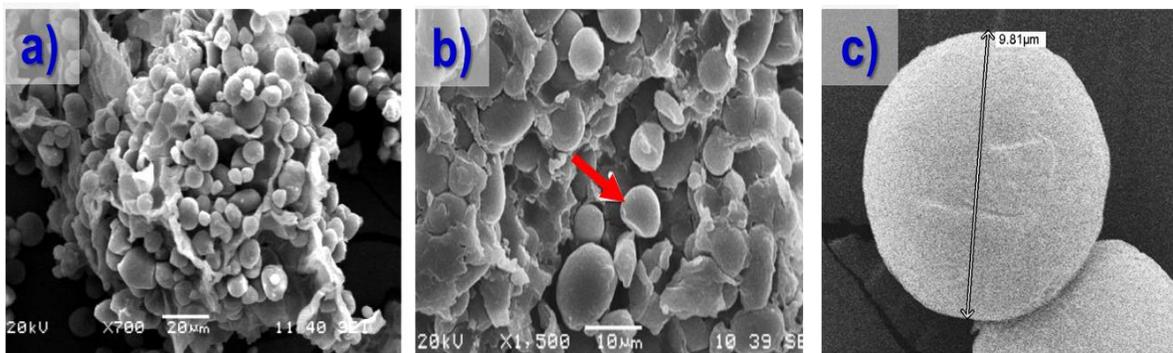


Figura 3.1: Estructura de la harina de ramón. a) Empaquetamiento de los gránulos por la matriz fibroproteica; b) Diferentes formas de los gránulos de almidón; c) Tamaño del gránulo de almidón.

En la figura 3.2, se puede observar el efecto que tuvieron los pretratamientos control CA y CL sobre la estructura de los gránulos de almidón. En ambos casos ocurrieron los mismos cambios estructurales, en la figura 3.2a se puede apreciar una desagregación parcial de los gránulos de almidón de la matriz fibroproteica, aunque esta matriz se encuentra parcialmente en la harina ya no tiene el mismo efecto de empaquetamiento sobre los gránulos como lo hacía antes del pretratamiento, esto permite que algunos gránulos de almidón se encuentren totalmente expuestos.

Los cambios morfológicos puntuales sobre la superficie lisa del gránulo de almidón se pueden apreciar en la figura 3.2b, las flechas rojas indican los sitios donde dichos gránulos fueron golpeados por las ondas ultrasónicas, ocasionando ondulaciones, fisuras y resquicios en su superficie, coincidiendo con lo reportado por Olgún [6] en el pretratamiento realizado con ultrasonido a 70 W, donde se observaron pequeñas fisuras en la superficie del gránulo de almidón, pero en su caso no se lograron apreciar las ondulaciones, esto puede estar dado a que la frecuencia que utilizó en su pretratamiento ultrasónico es menor a la que se utilizó en este trabajo (100 W).

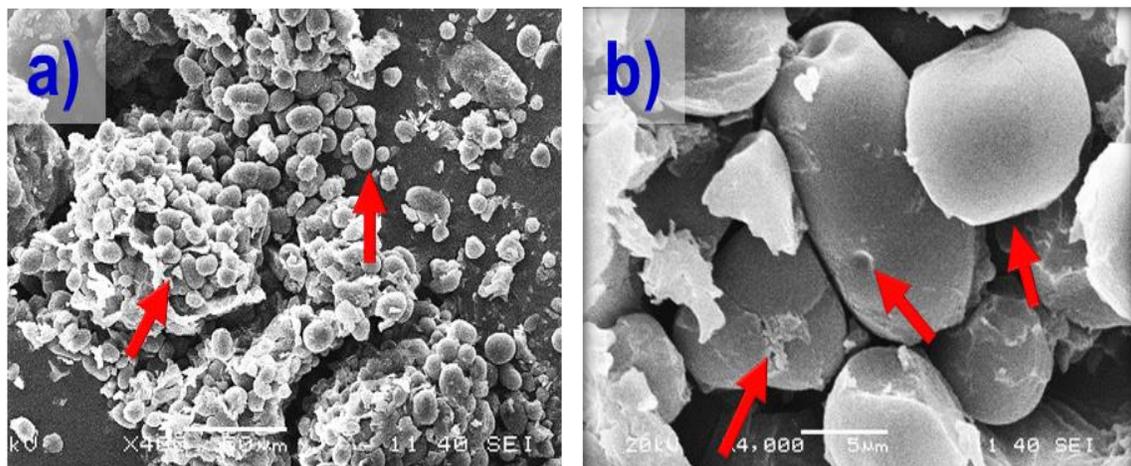


Figura 3.2: Efecto del pretratamiento ultrasónico CA y CL a) Cambios estructurales en la harina; b) Cambios morfológicos en el gránulo de almidón.

3.1.1 Pretratamiento ultrasónico con enzima la α -amilasa y el extracto enzimático de *Trametes hirsuta* Bm-2 crecido en harina de ramón.

Se evaluaron por medio de la microscopía electrónica de barrido, los efectos que tuvieron los pretratamientos con la enzima α -amilasa y el extracto (EA), sobre la harina de ramón, los cuales se pueden apreciar en la figura 3.3.

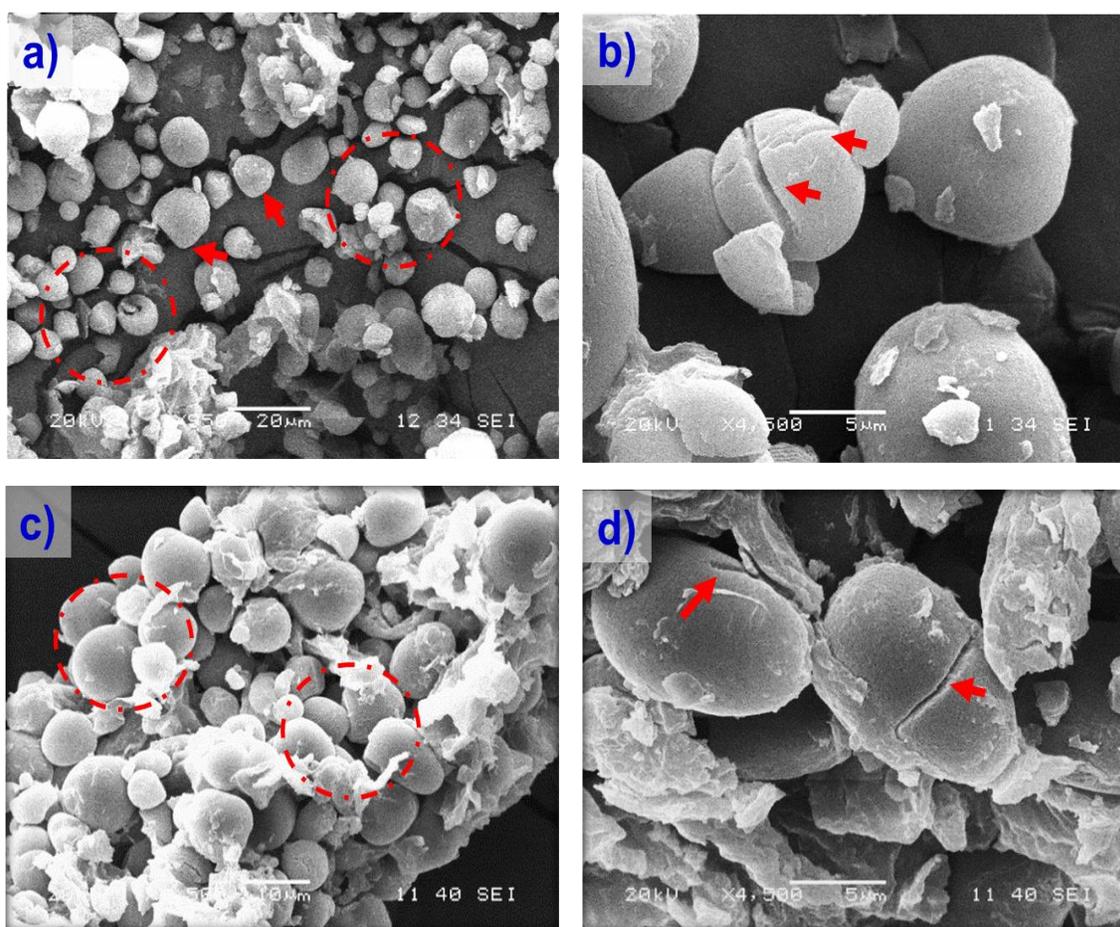


Figura 3.3: Efecto del tratamiento ultrasónico combinado con enzimas Amilolíticas a) Cambios morfológicos en los gránulos de almidón con α -Amilasa a 45 y 60 °C; b) Cambios morfológicos en el gránulo de almidón con α -Amilasa a 70 °C; c), Cambios morfológicos en los gránulos de almidón con EA a 45 y 60 °C; d) Cambios morfológicos en los gránulos de almidón con EA a 70 °C.

A diferencia de la harina sin tratar y el control, en los tratamientos con α -amilasa a 45, 60 y 70 °C, la mayoría de los gránulos de almidón están totalmente dispersos en la superficie,

sin la matriz que los envuelve (figura 3.3a). Sin embargo, otros se encuentran acumulados y dispuestos en forma de ramilletes por la matriz, pero al igual que el caso anterior, sin estar envueltos por ella. Además, se presentan cambios en la morfología de los gránulos de almidón, como son las deformaciones, ya que, de tener forma esférica u ovalada, se presentan amorfas y algunas con rupturas y grietas tal como fue el caso de los tratamientos A45 y A60. En el tratamiento A70 (fig. 3.3b) se pueden apreciar claramente las modificaciones ocurridas en la superficie del gránulo de almidón, como fue una evidente ruptura justamente a la mitad de su superficie, sin dejar de lado los efectos esperados, al igual que en los otros tratamientos, como son los cambios de forma, ondulaciones y la presencia de residuos de la matriz que le brindaba protección. De igual manera en la figura 3.3c, se aprecia el efecto del extracto enzimático combinado con la frecuencia ultrasónica y temperatura (45 y 60°C). Los círculos rojos muestran cambios en la superficie de los gránulos, golpes, fisuras y desprendimiento de la matriz fibroproteica. La figura 3.3d muestra con mayor claridad los cambios en la forma y superficie del gránulo en el tratamiento EA70, se aprecian fragmentos desprendidos de matriz adheridos a la superficie, además de fisuras aún más pronunciadas, mostrándose como estructuras agrietadas.

Estos cambios morfológicos en la superficie del gránulo de almidón de la harina de ramón, producto de la combinación del ultrasonido con enzima y extracto crudos enzimático a diferentes temperaturas coinciden con los estudios realizados por Aijun Hu y col. [62] quienes, observaron los efectos físicos causados por las ondas de choque y fuerzas de corte provocadas por la transmisión acústica y el colapso de las microburbujas generadas sobre la harina de maíz, donde efectivamente, la harina sufrió una serie de cambios en la estructura de sus gránulos de almidón, como fueron la presencia de abolladuras y agujeros en su superficie, lo cual posteriormente facilitó el proceso de hidrólisis enzimática. De modo similar, Olguín [6] en su estudio sobre pretratamientos para optimizar la obtención de bioetanol a partir de semillas de ramón, al usar un ultrasonido a 70 W, observó la liberación de los gránulos de almidón de ramón de la matriz proteica, y en menor medida también se apreciaron cambios en la estructura del almidón. Estos resultados señalaron que el efecto del ultrasonido puede depender de muchos factores, tales como potencia, frecuencia, temperatura y tiempo de pretratamiento, así como la concentración y la fuente botánica del almidón [60].

3.1.2 Pretratamiento ultrasónico con enzima lacasa y con extracto enzimático de *T. hirsuta* Bm-2 crecido en YMPG con salvado de trigo.

Por medio de los análisis microscópicos en la figura 3.4, se pudo observar la fragmentación de la matriz fibroproteica, la cual se encuentra dañada por efecto del pretratamiento ultrasónico en conjunto con la enzima lacasa. En la figura 3.4a, se puede apreciar que la matriz está fracturada y se liberaron los gránulos que no están dispuestos en ramilletes, sino que encuentran dispersos. También se observa un remanente de la matriz despolimerizada por la enzima y el ultrasonido. De esta manera se liberaron los gránulos, lo que permitió que las ondas ultrasónicas choquen directamente sobre la superficie de ellos causando cambios en su morfología como áreas aplanadas y deformaciones.

Este resultado coincide con lo ocurrido en los tratamientos con EL (figura 3.4b), donde la matriz fue degradada por el extracto crudo enzimático, permitiendo el impacto de las ondas ultrasónicas que produjeron muescas, hendiduras, rupturas y golpes que cambiaron la forma del gránulo.

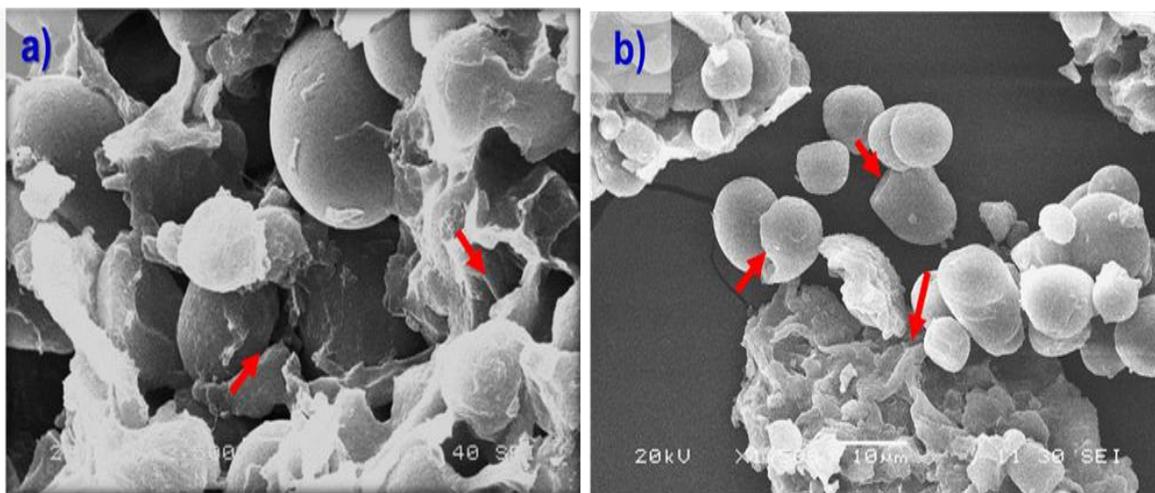


Figura 3.4: Efecto del tratamiento ultrasónico combinado con enzimas ligninolíticas a) Cambios morfológicos en la matriz fibroproteica y los gránulos de almidón con enzima Lacasa; b) Cambios morfológicos en la matriz fibroproteica y en el gránulo de almidón con EL.

El efecto de estos pretratamientos con la enzima lacasa y con EL coincide con los estudios previos realizados por Olgún-Maciel y col. [63], donde observaron que la enzima lacasa

juega un papel importante en la despolimerización de la matriz fibroproteica que cubre los gránulos de almidón de ramón y que además no tiene ningún efecto sobre dichos gránulos.

Es importante recalcar que, los cambios encontrados en todos los pretratamientos por medio de la microscopia electrónica de barrido, también coinciden con lo visto por Mei Li y Col. [42], quienes al someter la harina de maíz a un pretratamiento ultrasónico, observaron que los gránulos de almidón nativo y la capa externa que le confería una fuerte resistencia a las enzimas, cambiaron su apariencia presentando muescas y ranuras en su superficie.

3.2 Efecto de los pretratamientos ultrasónicos sobre el rendimiento de ARD en la harina de semillas de ramón.

Los resultados del análisis de los ARD en la harina de ramón, antes del pretratamiento, mostraron un contenido promedio de $2.905 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Lo cual coincide con la concentración de $1.4153 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ reportada por Olguín [6].

El efecto de la combinación del ultrasonido (100 W) con: enzima α -amilasa y el extracto enzimático (EA) sobre la concentración de ARD se puede apreciar en la figura 3.5. En todos los casos el tratamiento con la enzima α -amilasa mostraron mayor liberación de ARD con valores que se encuentran en el rango de 9.99 a $11.30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, mientras que el tratamiento de EA solo logró liberar concentraciones en el rango de 6.06 a $6.44 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, siendo significativamente superior el tratamiento con la enzima α -amilasa.

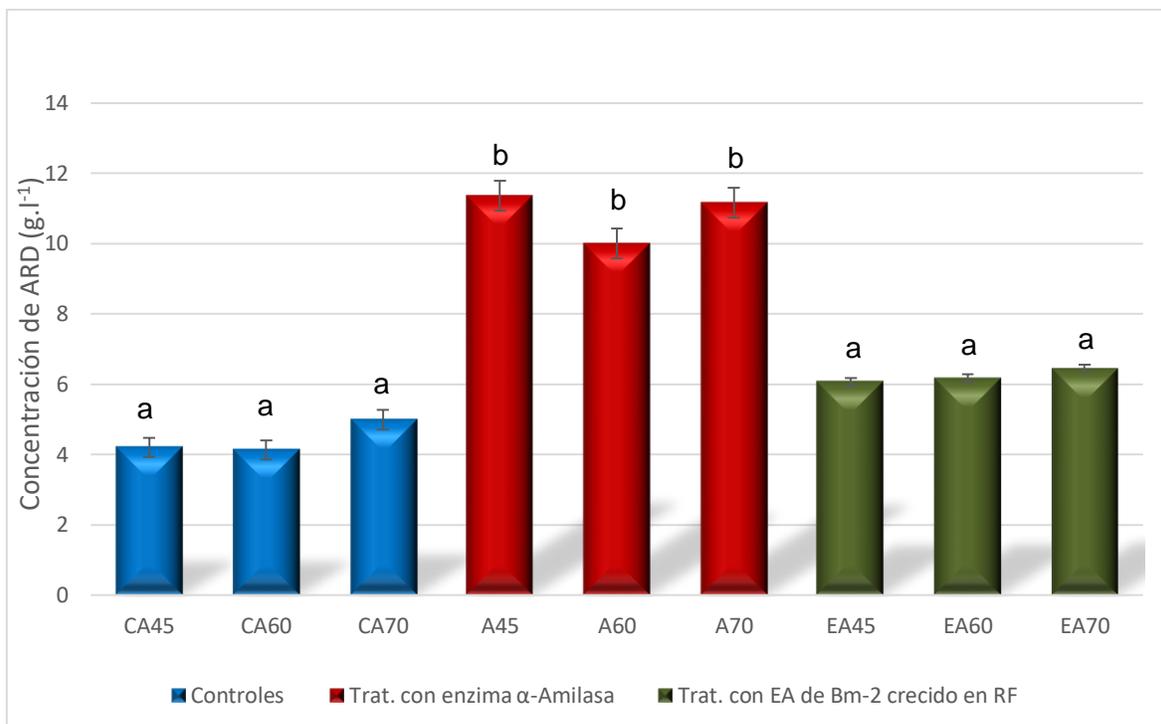


Figura 3.5: Concentración de ARD en la harina de ramón después de los diferentes pretratamientos con α -amilasa y EA a diferentes temperaturas. Anova de una vía, $p < 0.05$, prueba de Tukey.

En la figura 3.6 se puede apreciar el efecto de la combinación ultrasonido con: enzima lacasa a diferentes temperaturas y concentración y el extracto enzimático de lacasa (EL). En el caso de los tratamientos L50-45; L50-50; EL50-45 y EL50-50 la concentración de ARD obtenida están en el rango de $4.72 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a $3.75 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ lo cual no es significativo comparado con el valor de $4.21 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de los controles. Sin embargo, al aumentar la concentración de unidades de Lacasa a 100 U/ml, observamos un incremento en la concentración de ARD a $6.34 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ en el tratamiento L100-45 y $6.92 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ para L100-50. De igual manera ocurrió para los tratamientos EL100-45 y EL100-50 obteniéndose valores de en el rango de 6.06 y $7.33 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ respectivamente. En este caso podemos apreciar que la concentración de la enzima juega un papel primordial en la liberación de los ARD, debido a la despolimerización de la matriz fibroproteica.

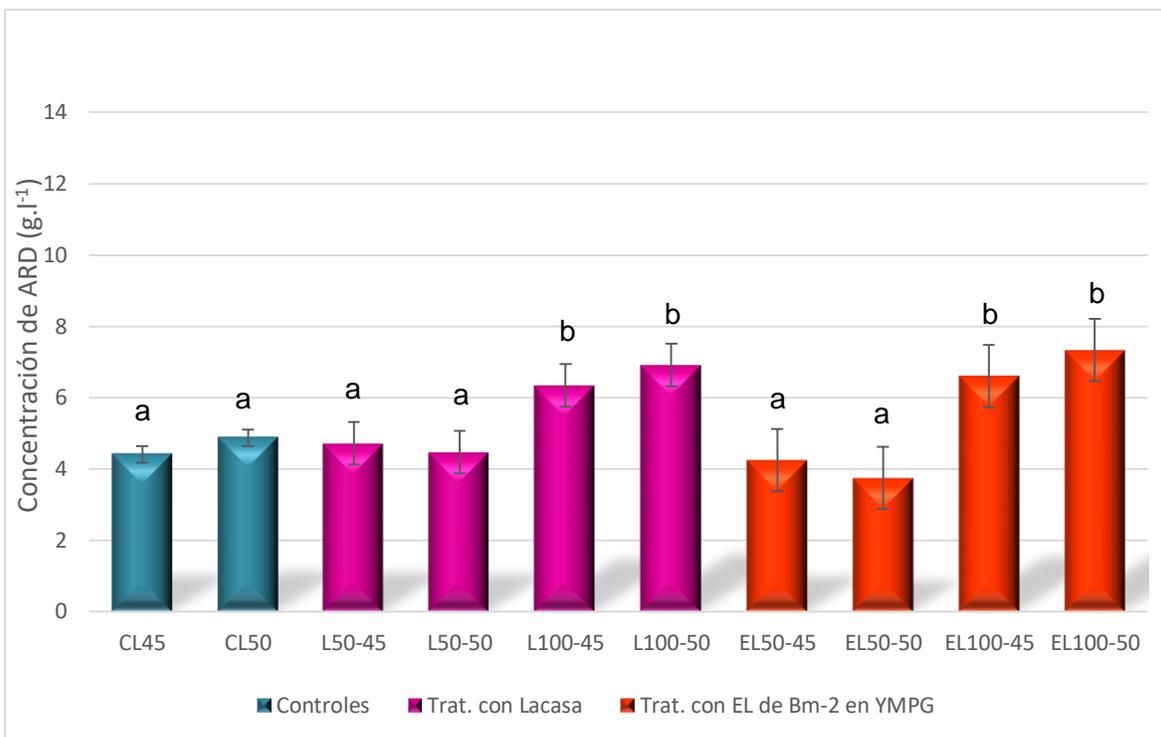


Figura 3.6: Concentración de ARD en la harina de ramón después de los diferentes pretratamientos con Lacasa y EL a diferentes concentraciones y temperaturas. Anova de una vía, $p < 0.05$, prueba de Tukey.

El aumento de ARD está dado por el desarreglo provocado dentro del gránulo de almidón, en este caso, se modificó su forma y estructura por medio de la cavitación, inducida por la fuerza disruptiva provocada durante el tratamiento ultrasónico, permitiendo el ingreso del agua y la enzima al gránulo, lo que provocó el hinchamiento de éste, y el rompimiento de los enlaces en las cadenas de amilosa y amilopectina. Todo esto permitió la salida de algunas moléculas de glucosa y otros azúcares a la solución [40]. El uso simultáneo de enzimas en esta etapa y los cambios de temperatura, provocaron cambios significativos en la estructura de los gránulos, permitiendo mayor liberación de azúcares e induciendo el proceso de licuefacción

No obstante, a pesar de que en esta etapa, algunos de los tratamientos anteriormente mencionados no llegaron a niveles altos en el incremento de azúcares fermentables, es importante mencionar que la mayoría, alcanzaron valores por arriba de los obtenidos por Olgún en el 2015, que logró en el tratamiento ultrasónico una concentración de 5.85 g.l^{-1} [6], probablemente, debido al aumento de la potencia de 70 a 100 Watts y el uso simultáneo

de la enzima durante el tratamiento. Aunque los pretratamientos incrementaron la disponibilidad de ARD, su efecto se evaluó después del proceso de hidrólisis.

3.3 Rendimiento de azúcares obtenidos después de la hidrólisis enzimática.

La figura 3.7 se puede observar la concentración ARD obtenidos al finalizar los procesos de licuefacción y sacarificación enzimática en los tratamientos con la enzima α -amilasa y el extracto crudo enzimático (EA).

Los mejores resultados fueron en el pretratamiento ultrasónico con la enzima α -amilasa a 45°C, obteniéndose concentraciones de 123.72 g·l⁻¹ de ARD lo que se significa un rendimiento de 92% del proceso hidrolítico y a 60°C con valores de 107.45 g·l⁻¹ (80% de hidrólisis), siendo significativamente diferente este pretratamiento con respecto a los tratamiento con extracto enzimático crudo (EA45; EA60 y EA70), donde solo se alcanzan valores de concentración en el rango de 99.9 a 79.5 g·l⁻¹ que representa un 74-59% de hidrólisis.

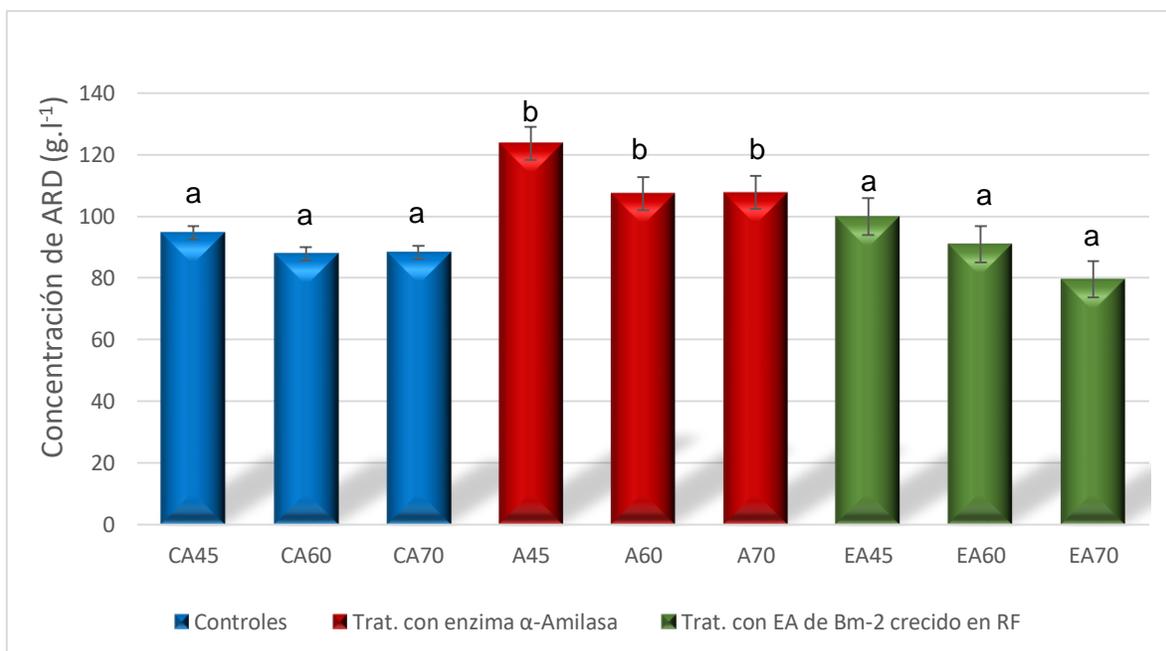


Figura 3.7: Concentración de ARD posterior a la hidrólisis enzimática de los diferentes pretratamientos con α -amilasa y EA a diferentes temperaturas. Anova de una vía, $p < 0.05$, prueba de Tukey.

Aunque en el tratamiento con EA los resultados no tienen diferencia significativa en comparación con el control, ya que, a 45 °C, que fue la mejor condición para este tratamiento, sólo se llegó a un valor de 99.92 g·l⁻¹ (74% de hidrólisis). Es importante mencionar, que estos niveles de ARD son satisfactorios, considerando que en el proceso de licuefacción solo se utilizó el extracto enzimático sin la adición de la enzima α -amilasa reactiva.

Nuestra hipótesis en cuanto a la diferencia obtenida entre los pretratamientos con una enzima comercial (α -amilasa) y el extracto crudo enzimático (EA) obtenido por un microorganismo autóctono, se debe a la pureza y estabilidad que tienen las primeras, sin embargo, son mucho más costosas y por lo tanto su uso es menos viable económicamente.

Estos resultados coinciden con las investigaciones realizadas por Gaquere-Parker [40] y Oliveira [41] donde usaron diferentes fuentes amilolíticas, que fueron sometidas a sonicado en conjunto con la enzima α -amilasa a diferentes condiciones, esto es debido a un probable cambio de la estructura de la enzima que, si bien no llega a desnaturalizarse, permite un mejor acoplamiento al sustrato logrando optimizar el proceso [40].

En la figura 3.8 se puede apreciar el efecto del pretratamiento ultrasónico combinado de forma simultánea con la enzima lacasa y un extracto enzimático crudo obtenido en medio YMPG suplementado con salvado de trigo (EL). En ambos pretratamientos se obtuvieron concentraciones de ARD en el rango de 80.11 a 91.31 g·l⁻¹, esto demuestra que no hay diferencias significativas entre los tratamientos y el control. Es importante destacar que, aunque no hubo diferencia significativa entre los tratamientos, para el caso de L100-45 (100 U/ml a 45 °C) se logró un rendimiento de hidrólisis de 68 % superior a lo reportado previamente por Olguin en el 2015 que obtuvo un rendimiento de 50.29 % [6]. Esto puede estar asociado a que la enzima lacasa tuvo un mayor efecto de despolimerización de la matriz fibroprotéica, lo que permitió que los gránulos de almidón estén más accesibles [7].

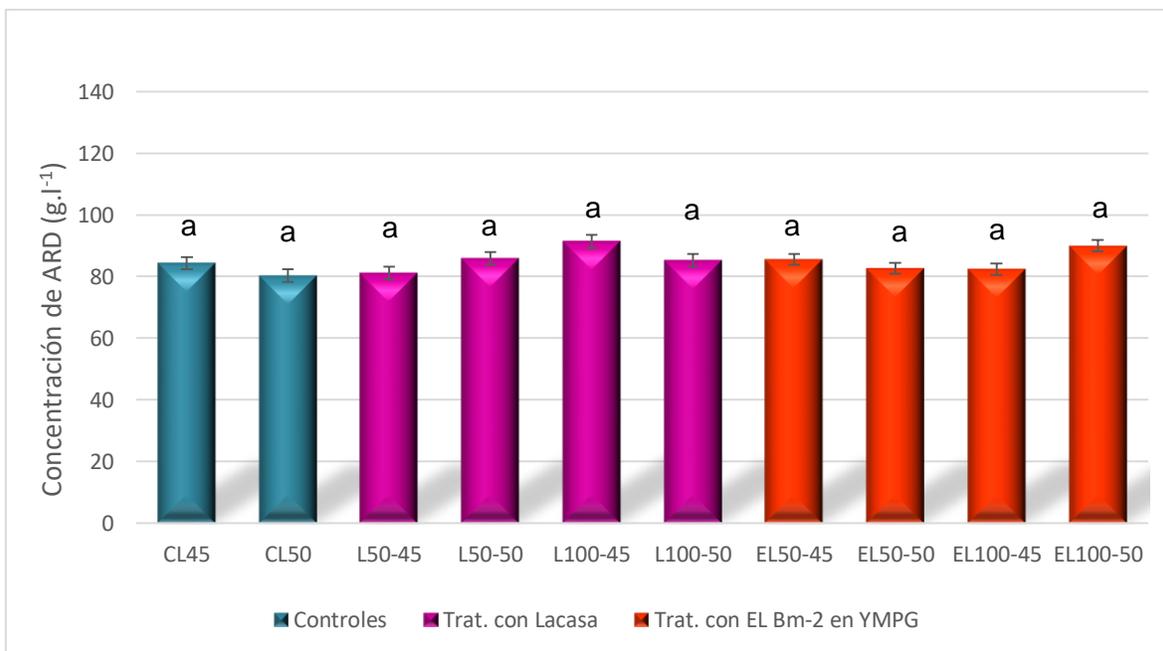


Figura 3.8: Concentración de ARD posterior a la hidrólisis enzimática de los diferentes pretratamientos con lacasa y EL a diferentes temperaturas y concentraciones. Anova de una vía, $p < 0.05$, prueba de Tukey.

La dinámica de hidrólisis de la harina de ramón en cada una de sus etapas se presenta en la figura 3.9. Las muestras que fueron sometidas a la acción de la enzima α -amilasa durante el pretratamiento ultrasónico fueron las que presentaron mayor liberación de ARD, en específico el tratamiento a 45 °C, ya que se obtuvo una concentración de 123.72 g.l⁻¹, alcanzando un porcentaje de hidrólisis del 92%.

Analizando dicha gráfica podemos notar que si bien es cierto que el mejor tratamiento fue el uso simultáneo del ultrasonido con la enzima α -amilasa comercial, el pretratamiento con extracto EA a 45 °C, muestra valores muy cercanos a los alcanzados por la enzima comercial llegando a 99.92 g.l⁻¹, lo cual sería equivalente a un porcentaje de hidrólisis de 74%. Los resultados confirman que la temperatura juega un papel importante en este proceso, ya que los tratamientos a 45°C fueron los que presentaron un mayor rendimiento. Aun cuando el resto de los tratamientos no alcanzaron rendimientos tan altos, como lo fue en los casos anteriores, éstos e incluso los controles tuvieron un diferencia significativa, comparados con la concentración de ARD de 67.50 g.l⁻¹ y un porcentaje de hidrólisis del 50.29% obtenido por Olguín [6] con el tratamiento ultrasónico sin usar la enzima de forma simultánea.

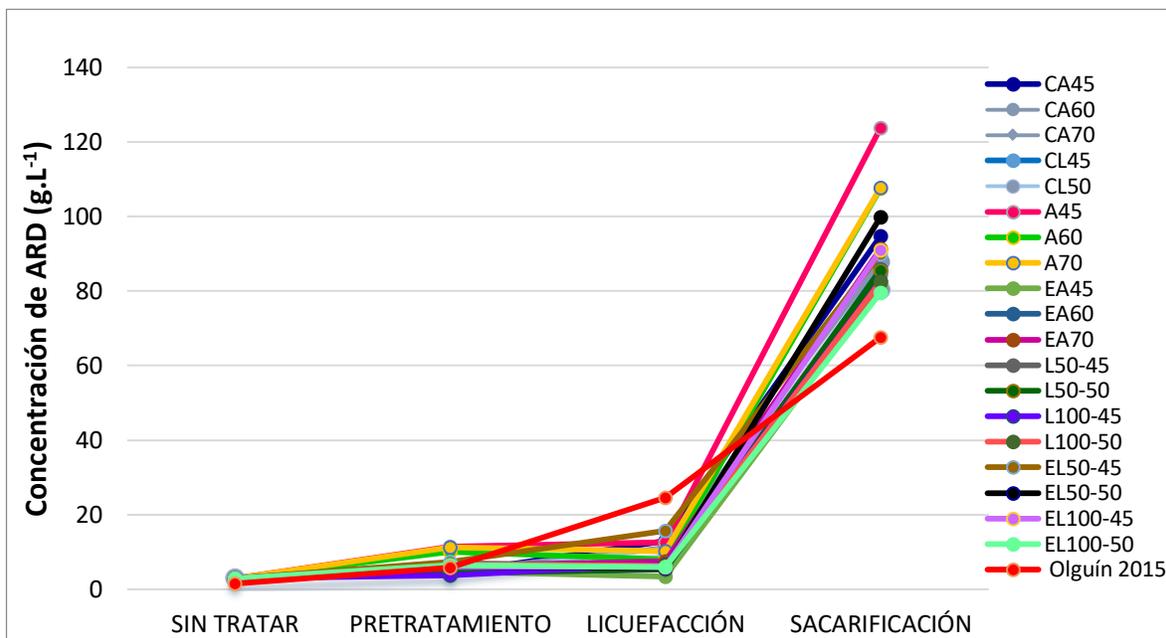


Figura 3.9: Dinámica de hidrólisis de harina de ramón para todos los pretratamientos evaluados. Anova de una vía, $p < 0.05$, prueba de Tukey.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Olgúin [6] quien al realizar un tratamiento térmico, observó que a altas temperaturas la harina de ramón se convirtió en una superficie continua de almidón y demás componentes, reduciendo la superficie expuesta y que aunque fue completamente gelatinizado, la eficiencia enzimática no fue la adecuada. Coincidiendo con los estudios realizados por Gaquere-Parker, que demostró que el uso de la enzima y el ultrasonido, se pueden combinar para mejorar las reacciones de hidrólisis, aumentando su rendimiento y velocidad [40]. Y con los experimentos realizados por Oliveira y col. que manifiestan que los efectos fisicoquímicos del ultrasonido no sólo provocan cambios morfológicos en los gránulos de almidón, sino también están asociados directamente con las modificaciones en la estructura de la enzima, mejorando su actividad, en el proceso simultáneo, optimizando la hidrólisis realizada [41].

3.3.1 Azúcares fermentables obtenidos en cada uno de los pretratamientos empleados.

En la figura 3.10, se muestran los resultados obtenidos en cuanto a la composición de azúcares fermentables en el proceso de hidrólisis cuando se utilizaron enzimas amilolíticas, en todos los casos se detectó glucosa como el monosacárido más abundante del proceso de hidrólisis de igual manera se detectó dextrinas, sacarosa en todas las muestras y solo maltosa en el pretratamiento EA70.

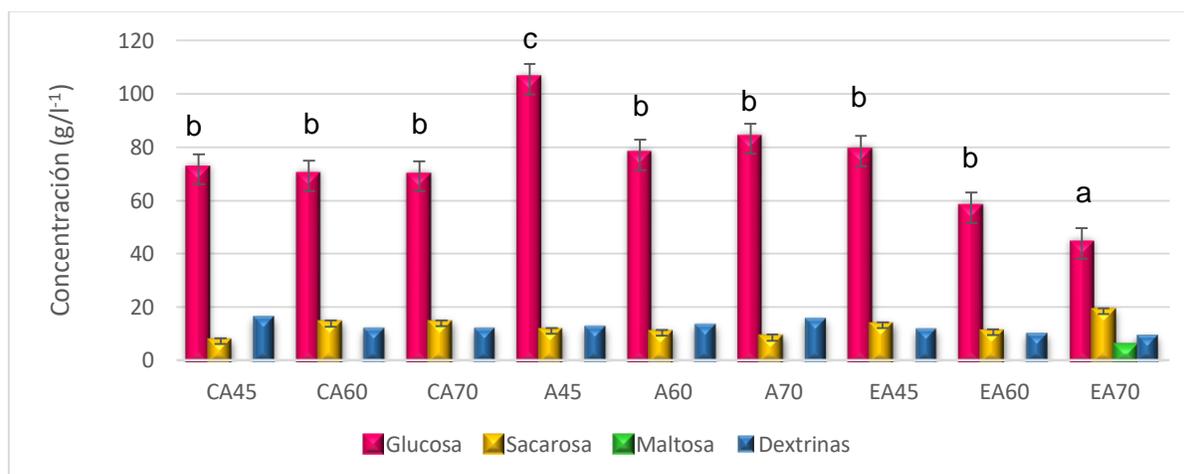


Figura 3.10: Rendimiento de Azúcares fermentables, después de la hidrólisis enzimática, obtenido por cada pretratamiento con α -amilasa y EA. Anova de una vía, $p < 0.05$, prueba de Tukey.

El análisis estadístico arrojó diferencias significativas solo para el tratamiento con α -amilasa a 45 °C, donde se obtienen 105.39 g·l⁻¹ de glucosa y 11.12 g·l⁻¹ de sacarosa. Es necesario destacar que, a pesar de que los tratamientos con EA no presentaron diferencia significativa con respecto al control, en el pretratamiento EA45 se obtuvieron valores de 78.46 g·l⁻¹ de glucosa y 13.21 g·l⁻¹ de sacarosa, lo que lo hace atractivo desde el punto de vista económico puesto que no es necesario utilizar enzimas comerciales, permitiendo disminuir el costo del proceso.

El análisis de la composición de azúcares fermentables en los tratamientos con enzimas ligninolíticas (figura 3.11) mostró el mismo perfil de carbohidratos. En todas las muestras el monómero más abundante es la glucosa, seguidos de sacarosa, maltosa y dextrinas. De igual manera, el análisis estadístico muestra que no hay diferencias significativas entre los

tratamientos y el control. El dímero de maltosa estuvo presente principalmente en las muestras en las que se empleó el extracto crudo enzimático (EL) de igual manera la mayor concentración de glucosa fue en el tratamiento EL50-45.

Todos estos resultados nos confirman que estas enzimas solo juegan un papel preponderante en la despolimerización de la matriz fibroproteica sin tener un efecto sobre el almidón lo que coincide con lo reportado por Olguin-Maciel y col [65], estos valores de concentración de ARD están relacionados con el efecto del ultrasonido sobre la superficie del gránulo de almidón

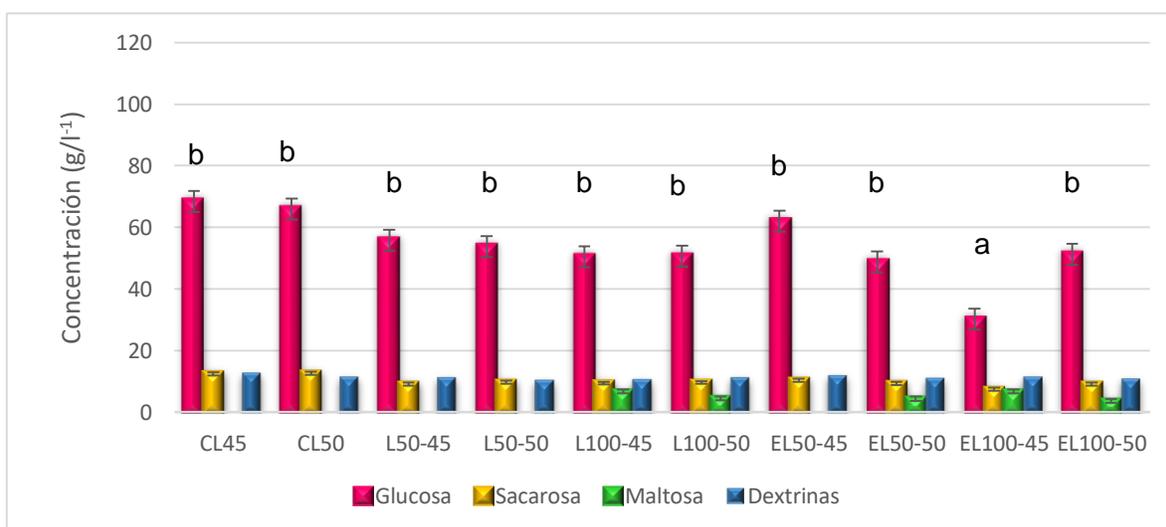


Figura 3.11: Rendimiento de Azúcares fermentables, después de la hidrólisis enzimática, obtenido por cada pretratamiento con Lacasa y EL. Anova de una vía, $p < 0.05$, prueba de Tukey.

El análisis de los resultados de HPLC, concuerda con Langenaeken y col. [66] que estudiaron las diferentes características de gelatinización de los gránulos de almidón de cebada y si el tamaño de gránulo afecta su hidrólisis enzimática y la producción de azúcares fermentables, donde obtuvieron que, por cada gramo de dextrina, se producen 4,5 g de azúcares fermentables, los cuales en este caso fueron maltosa, maltotriosa, glucosa y un pequeño porcentaje de dextrinas.

Del mismo modo, coinciden con Oliveira y col. [67] quienes analizaron el efecto del ultrasonido en dos enfoques complementarios, que fue en la actividad de seis amiloglucosidasas disponibles en el mercado (utilizando almidón soluble como sustrato) y

en la hidrólisis de cuatro almidones puros de diferentes fuentes botánicas. En dicho estudio se destacó la influencia del ultrasonido en el proceso hidrolítico general, comprobando que tiene un efecto evidente sobre la estructura y las propiedades del almidón de maíz. De hecho, las reducciones significativas en el tamaño de partícula y las modificaciones en la porosidad crean condiciones para la hinchazón adicional y la penetración de enzimas, lo cual condujo a un aumento general del rendimiento de glucosa para todas las combinaciones enzima-almidón.

Finalmente, es importante resaltar que, el uso de tratamientos ultrasónicos combinados con enzimas amilolíticas puede mejorar la actividad de estas enzimas, siempre y cuando se maneje en condiciones de trabajo adecuadas como: pH, temperatura, concentración enzimática, potencia ultrasónica y tiempo de exposición. Este aumento, puede atribuirse a los cambios causados por la fuerza disruptiva de las ondas ultrasónicas, tanto en el aspecto y estructura de la harina, como en la enzima. Estos hallazgos tienen una contribución al conocimiento en cuanto al uso del tratamiento ultrasónico en combinación con enzimas hidrolíticas, permitiendo maximizar el rendimiento de la hidrólisis enzimática.

CONCLUSIONES

1. La harina de ramón sufrió cambios considerables en su estructura después de todos los pretratamientos, específicamente alteraciones morfológicas, golpes, grietas y fisuras en los granos de almidón y en la agregación de la matriz.
2. El efecto simultáneo del ultrasonido a 100 W con la enzima α -amilasa (0.075 U/g) a diferentes temperaturas (45, 60 y 70 °C) incrementó la concentración de azúcares reductores con respecto al control.
3. El tratamiento ultrasónico de 100 W a 45°C, combinado con el extracto enzimático EA, fue con el que se obtuvo el mayor porcentaje de hidrólisis.
4. El mejor pretratamiento para la hidrólisis de la harina de ramón fue el que combinó el ultrasonido y la enzima α -amilasa a 45 °C, a 100 Watts, obteniéndose 123 g·l⁻¹ de ARD totales, de los cuales, 105.39 g·l⁻¹ fue de glucosa y 11.12 g·l⁻¹ de sacarosa, lo que representó un 92% de hidrólisis.

PERSPECTIVAS

1. Evaluar el efecto del ultrasonido en conjunto con la enzima α -amilasa, a diferentes frecuencias ultrasónicas.
2. Cuantificar el rendimiento de etanol en la fermentación del mejor pretratamiento.

BIBLIOGRAFÍA

1. Carlos Alberto García Bustamante, O.M.C. (2016). ESTADO DEL ARTE DE LA BIOENERGÍA EN MÉXICO. En: Red Temática de Bioenergía (RTB) del Conacyt). Guadalajara, Jalisco.
2. Vânia Marcia Pasa Duarte, UFMG. (2010) Recomendaciones de especificaciones técnicas para el etanol y sus mezclas (E6) y la infraestructura para su manejo en México. En: Secretaría de Energía (SENER) México, D.F.
3. ONU (2007) Energía pugna por uso sostenible de la bioenergía | Noticias ONU. Available at: <https://news.un.org/es/story/2007/09/1112821>. Consultado: 29 de octubre 29 de 2019.
4. ONU (2009) PNUMA presenta estudio sobre biocombustibles | Noticias ONU. <https://news.un.org/es/story/2009/10/1176621>. Consultado: 29 de octubre de 2019.
5. R Ruiz, H.A., Martínez, A., and Vermerris, W. (2016). Bioenergy Potential, Energy Crops, and Biofuel Production in Mexico by Bioenergy Res. 9, 981–984.
6. Edgar, O.M. (2015). Estudio para optimizar la obtención de bioetanol a partir de harina de semillas de ramón. Tesis maestría, CICY. México.
7. Olguin-maciel, E., Larqu, A., Daisy, P., Barahona-p, L.F., Alzate-gaviria, L., Toledano-thompson, T., and Lappe-oliveras, P.E. (2017). Brosimum Alicastrum as a Novel Starch Source for Bioethanol Production by Energies. <https://doi.org/10.3390/en10101574>
8. FAO (1993). Valor nutritivo y usos en alimentación humana de algunos cultivos autóctonos subexplotados de Mesoamérica (Chile) <http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro11/home11.htm>.
9. Barquera, Z. (2014). Obtención de bioetanol a partir de semillas de ramon (Brosimum alicastrum Sw). Tesis maestría, CICY. México.
10. Mika Sillanpää • Chaker Ncibi (2017). A sustainable Bioeconomy, Springer International Publishing AG, Cham, Switzerland.
11. Ghosh, Tushar, Prelas, M. (2011). Energy Resources and Systems: Volume 2: Renewable Resources, Springer Science & Business Media.
12. Becerra Pérez, L.A. (2009). La industria del etanol en México. Econ. UNAM 6, 82–98.

13. RFA (Renewable Fuels Association) (2018). Annual Ethanol Production. Available at: <https://ethanolrfa.org/statistics/annual-ethanol-production/> [Accessed October 29, 2019].
14. Armando, L., Pérez, B., and Introducción, I. (2009). La industria del etanol en México. *Econ. [en línea]* 2009, 6, 98. <http://www.redalyc.org:9081/home.oa?cid=1518002>. Consultado 13 de noviembre de 2017.
15. Carlos Alberto García Bustamante (2011). Etanol de primera generación, estudio de la sustentabilidad de su producción considerando el ciclo de vida y análisis económico-ambiental de su introducción en el sector transporte Mexicano. Tesis Doctorado, UNAM, México.
16. Rios, M. & Kaltschmitt, M. (2013). Bioenergy potential in Mexico—status and perspectives on a high spatial distribution by Biomass Convers. *Biorefinery* 3, 239-254. <https://doi.org/10.1007/s13399-013-0085-3>
17. Toscano Moreno, L. (2009). Análisis de los parámetros y Selección de hornos para la combustión de biomasa (APLICACIÓN A BIOMASAS LOCALES TÍPICAS). Tesis Licenciatura, ESPL. Ecuador.
18. IDAE, and Javier, R. (2007). Energía de la biomasa Available at: http://www.idae.es/uploads/documentos/documentos_10374_Energia_de_la_biomasa_07_28e17c9c.pdf.
19. Cheng, J.J.; Timilsina, G.R. (2011). Status and barriers of advanced biofuels technologies: a review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 36, 3541–3549.
20. Hernández-medina, M., Torruco-uco, J.G., Chel-guerrero, L., and Betancur-ancona, D. (2008). Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán , México. 2008, 718–726.
21. Lindner, M., and Suominen, T. (2017). Towards a sustainable bioeconomy.
22. Meiners, M., C. Sánchez Garduño, y S.D.B. (2009). El ramón: Fruto de nuestra cultura y raíz para la conservación. *CONABIO. Biodiversitas* 87:7–10, 7–10.
23. Hernandez-Gonzalez, Olivia; Vergara-Yoisura, Silvia; Larque-Saavedra, A. (2015). Primeras etapas de crecimiento de *Brosimum alicastrum* Sw. en Yucatán. *Rev. Mex. Ciencias For.* 6, 38–48.
24. Gillespie, A.R. (2003). The propagation of Ramon Sw .; *Moraceae*) in Mayan homegardens of the Yucatan peninsula of Mexico. 25–38.
25. Morales Ortiz, E., and Herrera Tuz, L. (2007). Ramón (*Brosimum alicastrum* Swartz)

- protocolo para su colecta, beneficio y almacenaje. Conafor, 1–18.
26. Sciences, N.A. of (2017). Underexploited tropical plants with promising economic value. (Washington, D.C.).
 27. Peters, C.M., and Pardo-Tejeda, E. (1982). *Brosimum alicastrum* (Moraceae): uses and potential in Mexico. *Econ. Bot.* 36, 166–175.
 28. Addison, P., and Professional, W. (2007). MAYA NUT (*BROSIMUM ALICASTRUM* SW.) AND MAYA NUT-DERIVED INGREDIENTS FOR USE IN TRADITIONAL FOODS. 84.
 29. Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., and Negro, M.J. (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour. Technol.* 101, 4851–4861. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>.
 30. Sun, Y., and Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review. *Bioresour. Technol.* 83 83, 1–11.
 31. Chuck-hernandez, C., Perez-carrillo, E., and Serna-saldivar, S.O. (2009). Production of bioethanol from steam-flaked sorghum and maize. *J. Cereal Sci.* 50, 131–137. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2009.04.004>.
 32. Sánchez Riaño, A.M., and Gutiérrez Morales, A. I.; Muñoz Hernández, J. A. y Rivera Barrero, C.A. (2010). Bioethanol Production from agroindustrial lignocellulosic byproducts. *Tumbaga.*, 61–91.
 33. Rajagopalan S, Ponnampalam E, McCalla D, S.M. (2005). Enhancing profitability of dry mill ethanol plants: process modeling and economics of conversion of degermed defibered corn to ethanol. *Appl Biochem Biotechnol*, 120:37–50.
 34. Valiente, I.R. (2016). Pretratamiento de hidrolisis hidrotermica para la degradación de los carbohidratos complejos de residuos de frutas para la obtencion de bioetanol. 87.
 35. Sun, Q., Gong, M., Li, Y., and Xiong, L. (2014). Effect of dry heat treatment on the physicochemical properties and structure of proso millet flour and starch. *Carbohydr. Polym.* 110, 128–134. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.03.090>.
 36. Sujka, M. (2017). Ultrasonic modification of starch- impact on granules porosity. *Ultrason. - Sonochemistry*. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.02.001>.
 37. Ionel Balcu, Corina Amalia Macarie, A.-E.S. and R.O.P. (2011). (2011). Combined

- microwave - acid pretreatment of the biomass. *Prog. Biomass Bioenergy Prod.*, 223–240. Available at: <http://www.intechopen.com/books/progress-in-biomass-and-bioenergy-production/combined-microwave-acid-pretreatment-of-the-biomass%5CnInTech>.
38. Yu, J., Zhang, J., He, J., Liu, Z., and Yu, Z. (2009). Bioresource Technology Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull. *Bioresour. Technol.* 100, 903–908. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.07.025>.
 39. Kentish, S., and Feng, H. *Applications of Power Ultrasound in Food Processing*.
 40. Gaquere-parker, A., Taylor, T., Hutson, R., Rizzo, A., Folds, A., Crittenden, S., Zahoor, N., Hussein, B., and Arruda, A. (2018). Low frequency ultrasonic-assisted hydrolysis of starch in the presence of α - amylase. *Ultrason. - Sonochemistry* 41, 404–409. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.10.007>.
 41. Oliveira, H.M., and Cabrita, A.R.J. (2017). Does ultrasound improve the activity of alpha amylase ? A comparative study towards a tailor-made enzymatic hydrolysis of starch. *LWT - Food Sci. Technol.* 84, 674–685.
 42. Li, M., Li, J., and Zhu, C. (2018). Effect of ultrasound pretreatment on enzymolysis and physicochemical properties of corn starch. *Int. J. Biol. Macromol.* 111, 848–856. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.156>.
 43. Koda, S., Miyamoto, M., Toma, M., Matsuoka, T., and Maebayashi, M. (2009). Ultrasonics Sonochemistry Inactivation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans* by ultrasound at 500 kHz. *Ultrason. - Sonochemistry* 16, 655–659. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.02.003>.
 44. Duff, S. J. B.; Murray, W.D.A. (1996). Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol : a review . *Bioresour. Technol.* 55, 1–33.
 45. Kohlmann, K.L., Sarikaya, A., Westgate, P.J., Weil, J., Velayudhan, A., Hendrickson, R., and Ladisch, M.R. (1995). Enhanced enzyme activities on hydrated lignocellulosic substrates. *Enzym. Degrad. Insoluble Carbohydrates* 618, 237–255.
 46. Alizadeh, H., Teymouri, F., Gilbert, T.I., y Dale, B.E. (2005). Pretreatment of Switchgrass by Ammonia Fiber Explosion (AFEX). *Appl. Biochem. Biotechnol.* 121, 1133–1141.
 47. Gírio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S., and Bogel-Łukasik, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresour. Technol.*

- 101, 4775–4800. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.088>.
48. Zhang, Z., and Zhao, Z.K. (2009). Solid acid and microwave-assisted hydrolysis of cellulose in ionic liquid. *Carbohydr. Res.* **344**, 2069–2072. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2009.07.011>.
 49. Sun, F. hui, Li, J., Yuan, Y. xiang, Yan, Z. ying, and Liu, X. feng (2011). Effect of biological pretreatment with *Trametes hirsuta* yj9 on enzymatic hydrolysis of corn stover. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **65**, 931–938.
 50. Fan L. T., Gharpuray, M. M., y Lee, Y.H. (1987). *Cellulose Hydrolysis*. Springer-Verlag. **3**, 1–68.
 51. Xu, Q.-S., Yan, Y.-S., and Feng, J.-X. (2016). Efficient hydrolysis of raw starch and ethanol fermentation: a novel raw starch-digesting glucoamylase from *Penicillium oxalicum*. *Biotechnol. Biofuels* **9**, 216. Available at: <http://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-016-0636-5>.
 52. Moshi, A.P., Crespo, C.F., Badshah, M., Hosea, K.M.M., Mshandete, A.M., and Mattiasson, B. (2014). High bioethanol titre from *Manihot glaziovii* through fed-batch simultaneous saccharification and fermentation in Automatic Gas Potential Test System. *Bioresour. Technol.* **156**, 348–356. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.082>.
 53. Borglum, G.B. (1980). Starch Hydrolysis for Ethanol Production. *ACS Div. Fuel Chem. Prepr.* **25**, 264–269.
 54. Quintero, J., Montoya, M.I., Sanchez, O.J., and Cardona, C.A. (2007). Evaluación de la deshidratación de alcohol carburante mediante simulación de procesos. *Fac. Ciencias Agropecu.* **5**, 73–83.
 55. Dr. Alfonso Larqué Saavedra (2014). Sistema silvoforestal productor de semilla para reducir la importación de granos. Available at: <http://asam.centrogeo.org.mx/index.php/resultado-3?limit=1&limitstart=0> [Accessed October 22, 2017].
 56. Miller, G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426–428.
 57. Vicente Ortiz Gómez, Reinaldo Velasco Mosquera, D.F.R.A. (2016). Obtención y caracterización de una película a base de almidón hidroxipropilado producida por extrusión soplado.

58. P. Zapata-Castillo, L. Villalonga-Santana, I. Islas-Flores, G.R.-M.W.A.-E. and S.S.-P. (2015). Synergistic action of laccases from *Trametes hirsuta* Bm2 improves decolourization of indigo carmine. *Appl. Microbiol.*
59. Nagula, K.N., and Pandit, A.B. (2015). Process intensification of delignification and enzymatic hydrolysis of delignified cellulosic biomass using various process intensification techniques including cavitation. *Bioresour. Technol.* 213, 162–168. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.152>.
60. Dhital, S., Warren, F.J., Butterworth, P.J., Ellis, P.R., and Gidley, M.J. (2017). Mechanisms of starch digestion by α -amylase—Structural basis for kinetic properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57, 875–892. Available at: <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2014.922043>.
61. Pérez-Pacheco, E., Moo-Huchin, V.M., Estrada-León, R.J., Ortiz-Fernández, A., May-Hernández, L.H., Ríos-Soberanis, C.R., and Betancur-Ancona, D. (2014). Isolation and characterization of starch obtained from *Brosimum alicastrum* Swartz Seeds. *Carbohydr. Polym.* 101, 920–927. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.012>.
62. Hu, A., Jiao, S., Zheng, J., Li, L., Fan, Y., Chen, L., and Zhang, Z. (2015). Ultrasonic frequency effect on corn starch and its cavitation. *LWT - Food Sci. Technol.* 60, 941–947.
63. Olguin-Maciel, E., Larqué-Saavedra, A., Lappe-Oliveras, P.E., Barahona-Pérez, L.F., Alzate-Gaviria, L., Chablé-Villacis, R., Domínguez-Maldonado, J., Pacheco-Catalán, D., Ruíz, H.A., and Tapia-Tussell, R. (2019). Consolidated bioprocess for bioethanol production from raw flour of *brosimum alicastrum* seeds using the native strain of *trametes hirsuta* bm-2. *Microorganisms* 7, 1–16.

ANEXO

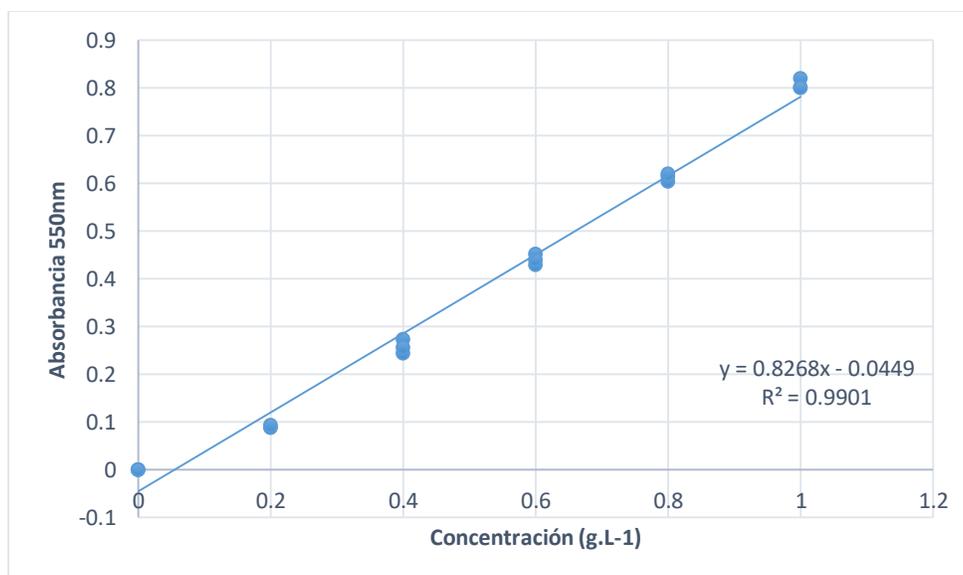
ANEXO 1

Curva de Calibración de ARD (Método DNS)

Absorbancias de las muestras a 550 nm

ARD (g.L ⁻¹)	R1	R2	R3	PROMEDIO
0	0	0	0	0.000
0.2	0.09	0.089	0.094	0.091
0.4	0.244	0.274	0.256	0.258
0.6	0.43	0.452	0.44	0.441
0.8	0.615	0.605	0.621	0.614
1	0.82	0.802	0.8	0.807

Curva de calibración de Azúcares reductores directos.



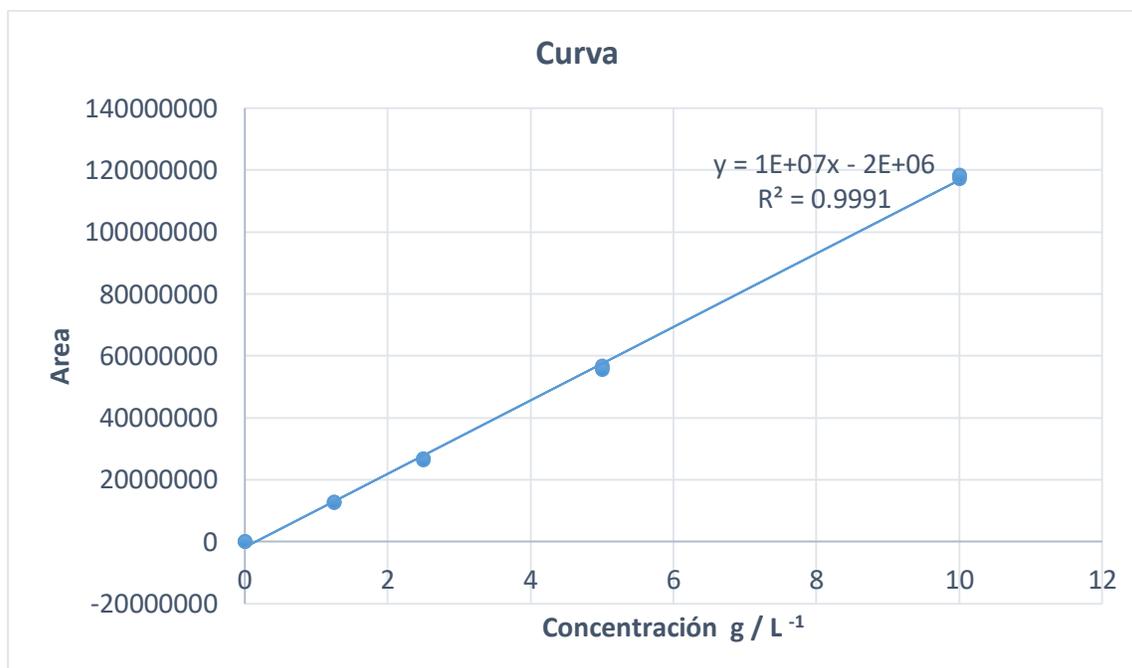
ANEXO 2

Curva de Calibración de HPLC para Glucosa

Áreas bajo la curva de las muestras

GLU (g.L ⁻¹)	R1	R2	R3	PROMEDIO
0	0	0	0	0.000
1.25	12678370	12878346	12748367	12768361.0
2.5	26812659	26670719	26257496	26580291.3
5	56153537	56721600	55627649	56167595.3
10	117099247	118324907	118083473	117835875.7

Curva de calibración de Glucosa.



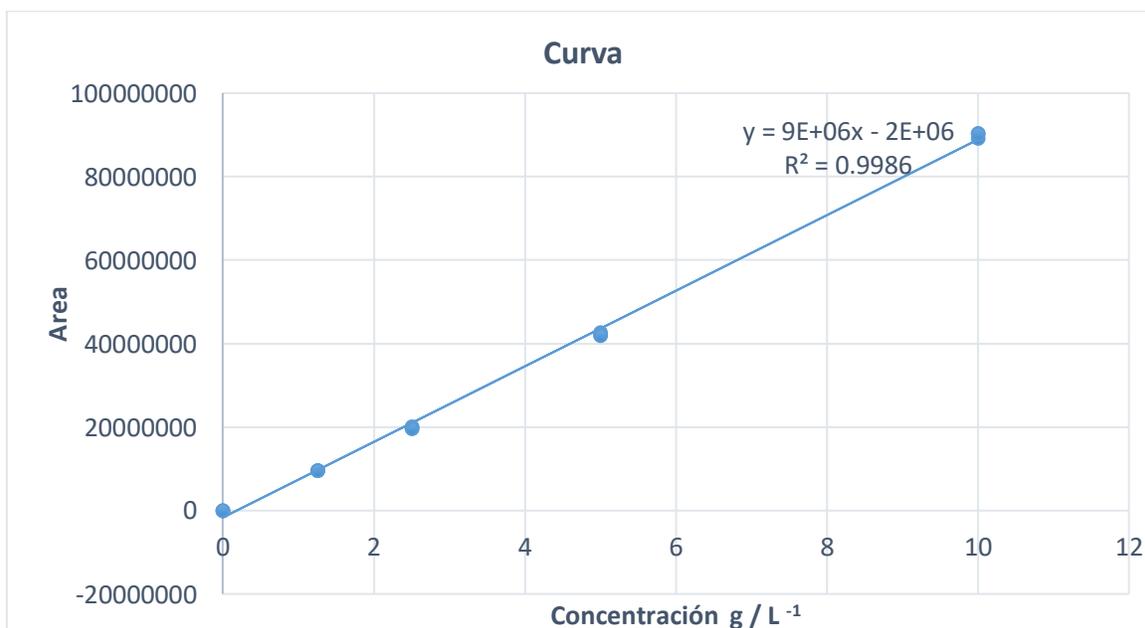
ANEXO 3

Curva de Calibración de HPLC para Sacarosa

Áreas bajo la curva de las muestras

SAC (g.L ⁻¹)	R1	R2	R3	PROMEDIO
0	0	0	0	0.000
1.25	9590442	9563794	9646229	9600155.0
2.5	20090505	19697430	19746451	19844795.3
5	42102621	42667127	41944433	42238060.3
10	89199871	90344053	90281640	89941854.7

Curva de calibración de Sacarosa.



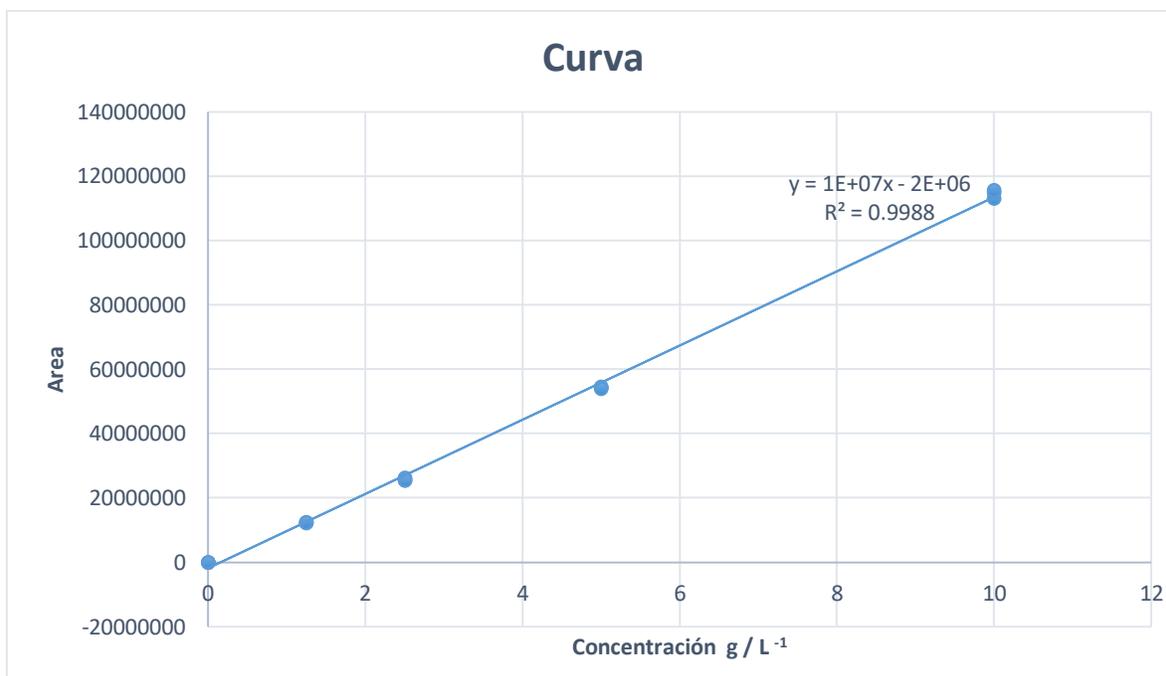
ANEXO 4

Curva de Calibración de HPLC para Maltosa

Áreas bajo la curva de las muestras

MALT (g.L ⁻¹)	R1	R2	R3	PROMEDIO
0	0	0	0	0.000
1.25	12360430	12223328	12312685	12298814.3
2.5	25488455	26138343	25325737	25650845.0
5	54470865	54356309	53907360	54244844.7
10	112946168	114845019	115635396	114475527.7

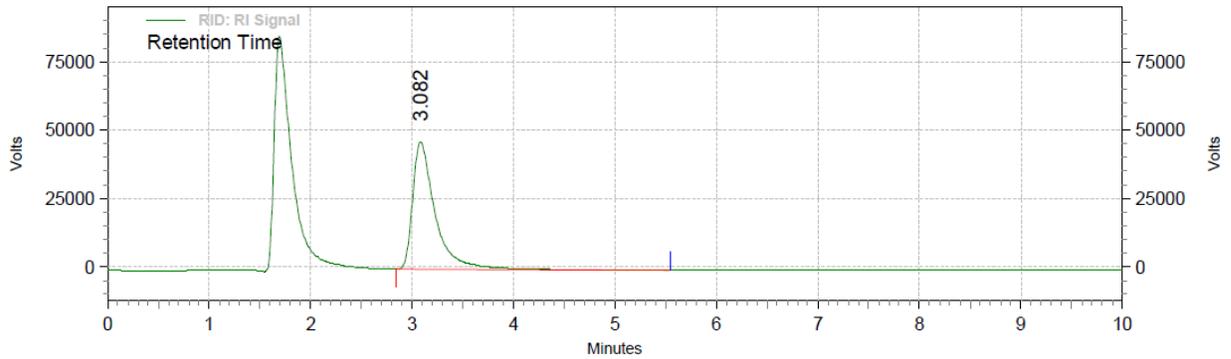
Curva de calibración de Maltosa.



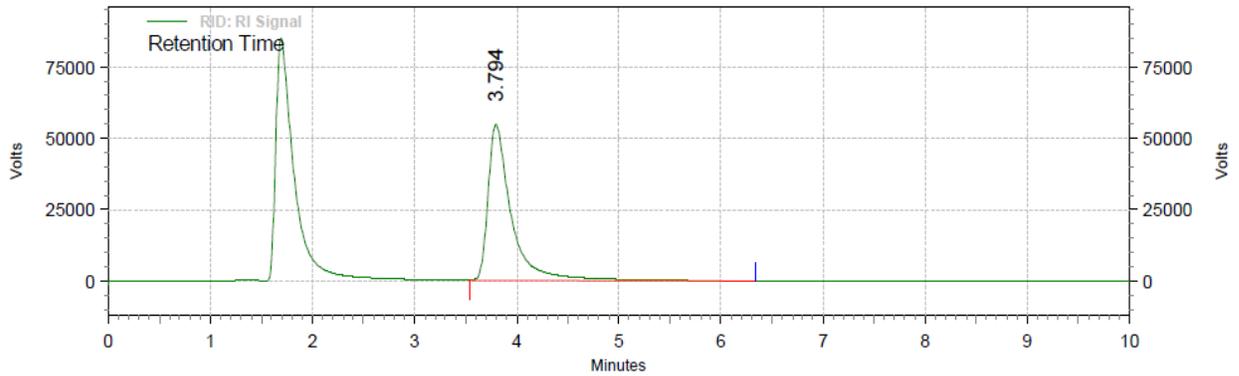
ANEXO 5

Cromatogramas de los estándares usados para la identificación de azúcares fermentables

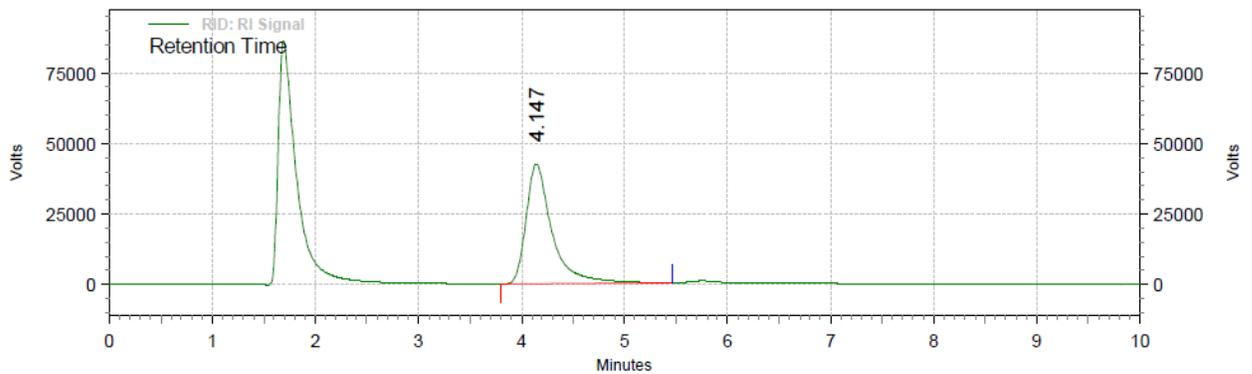
Glucosa



Sacarosa



Maltosa



ANEXO 6

Solución Amortiguadora de fosfatos.

Para obtener un litro de una solución amortiguadora de fosfato 0.1 M, se mezclan soluciones madre 0.1 M de NaH_2PO_4 (monobásico) y 0.1 M Na_2HPO_4 (dibásico), en las relaciones mencionadas en siguiente tabla según el pH al que se desee obtener la solución amortiguadora. Para preparar las soluciones madre se colocan en diferentes matraces aforados con capacidad de 1 L, 12 g NaH_2PO_4 y 14.2 g Na_2HPO_4 ; posteriormente se aforan con agua destilada.

Preparación de una solución amortiguadora de fosfato de sodio

pH de solución amortiguadora de Fosfato de Sodio	NaH_2PO_4 (ml) 0.1 M	Na_2HPO_4 (ml) 0.1 M
6.0	877	123
6.1	850	150
6.2	815	185
6.3	775	225
6.4	735	255
6.5	685	315
6.6	625	375
6.7	565	435
6.8	510	490
6.9	450	550
7.0	390	610
7.1	330	670
7.2	280	720

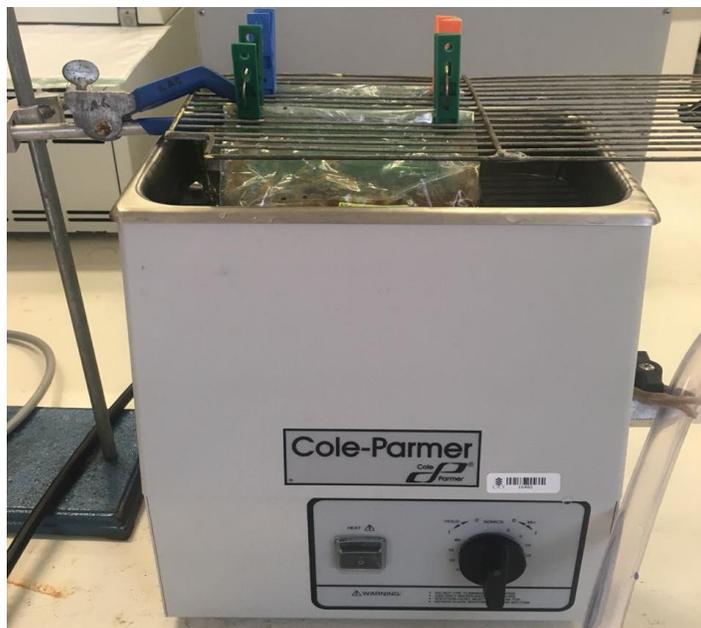
ANEXO 7

Preparación de 1L de Medio YMPG

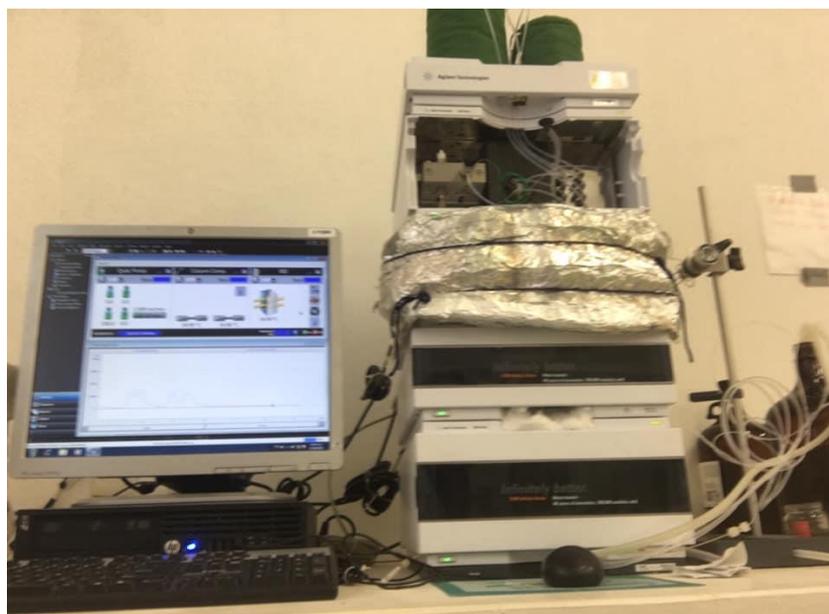
Reactivos	Cantidad (g)
Glucosa	10.0
Extracto de malta	10.0
Peptona	2.0
Extracto de levadura	2.0
KH_2PO_4	2.0
$\text{MgSO}_4 + \text{H}_2\text{O}$	1.0.
Tiamina HCl	.001
Agar	20.0

*Para el medio YMPG usado en el reactor aireado, al ser líquido, únicamente no se incluyó el agar en su preparación.

ANEXO 8



**Equipo de Ultrasonido Cole-Parmer®, E.U.A.
Modelo:08895-14**



**Equipo de Cromatografía de alta resolución (HPLC)
Agilent ZORBAX carbohydrate. Analysis column 5µm, 4.6 x 250mm.**

ANEXO 9



**Microscopio Electrónico de Barrido (MEB).
Modelo: JSM-6360 LV, JEOL, Tokyo, Japan**



Reactor aireado usado para la preparación de los extractos enzimáticos