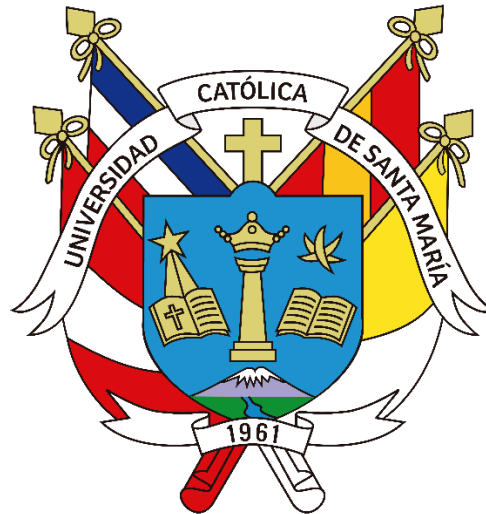


Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



“PRODUCCIÓN DE XILOOLIGOSACARIDOS (XOS) POR HIDRÓLISIS DE LA FRACCIÓN DE HEMICELULOSA OBTENIDA A PARTIR DE RESIDUOS DE QUINUA”

Tesis presentada por el bachiller:

Rosas Vega, Fernando Enrique

Para optar por el Título Profesional de:

Ingeniero Biotecnólogo.

Asesor: **Phd. Terán Hilares, Ruly.**

Arequipa – Perú

2023

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
INGENIERIA BIOTECNOLOGICA
TITULACIÓN CON TESIS
DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 24 de Enero del 2023

Dictamen: 007101-C-EPIB-2023

Visto el borrador del expediente 007101, presentado por:

2014600461 - ROSAS VEGA FERNANDO ENRIQUE

Titulado:

**PRODUCCIÓN DE XILOOLIGOSACARIDOS (XOS) POR HIDRÓLISIS DE LA FRACCIÓN DE
HEMICELULOSA OBTENIDA A PARTIR DE RESIDUOS DE QUINUA.**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

**2394 - CORDOVA BARRIOS CINTHIA CAROL
DICTAMINADOR**



**2780 - VALDIVIA CARPIO WILLY ANIBAL
DICTAMINADOR**



**3135 - LOPEZ ALVAREZ NATALIA PAOLA
DICTAMINADOR**





DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado y puesto en las manos de Dios, reconociendo siempre la labor de mi padre, mi madre, mi hermano, mi abuela y todas las personas que me quieren y me ayudaron a llegar a ser el profesional de éxito del que puedan estar orgullosos, aquellas que con sus sabios mensajes y consejos siempre me dan fuerzas y me motivan para seguir adelante y me impulsa a siempre dar lo mejor de mí en cada día y en cada compromiso.

AGRADECIMIENTOS.

Mi más sincero agradecimiento al Laboratorio de Bioprocesos de la UCSM quien me dio la oportunidad de ser su tesista y me presento de la misma manera personas maravillosas con buenas ideas y ganas de enseñar, en especial al Dr. Ruly Terán Hilares por su confianza, dedicación y constante enseñanza, todo esto para culminar de manera exitosa esta tesis vanguardista y de innovación en bioprocesos.

Asimismo, agradezco a mi alma mater la Universidad Católica de Santa María (UCSM) la cual financio el desarrollo del Proyecto N° 7797-CU-2021. Agradezco a la Dra. Adriane Milagres Ferreira de la Escuela de Ingeniería Lorena (EEL) de la Universidad de Sao Paulo de Brasil (USP); a la MSc. Daniele García Ribeiro de la Facultad de Ingeniería de Alimentos de la Universidad Estatal de Campinas de Brasil (UNICAMP) y al Dr. Ahmed Muhammad Ajaz de Govt College Women University of Madina Town Faisalabad – Pakistan, colaboradores que hicieron posible la culminación del proyecto.

*El contenido de la presente tesis fue previamente publicado: Fernando E. Rosas Vega, Salvador Sanchez Muñoz, Igor Severo Gonçalves, Félix Terán Hilaes, Thércia Rocha Balbino, Marcus B. Soares Forte, Silvio Silvério da Silva, Julio C. dos Santos, Ruly Terán Hilaes. *Carbohydrates valorization of Quinoa (Chenopodium quinoa) stalk in xylooligosacharides and carotenoids as emergent biomolecules*. *Industrial Crops & Products*. 194(2023), 116274.

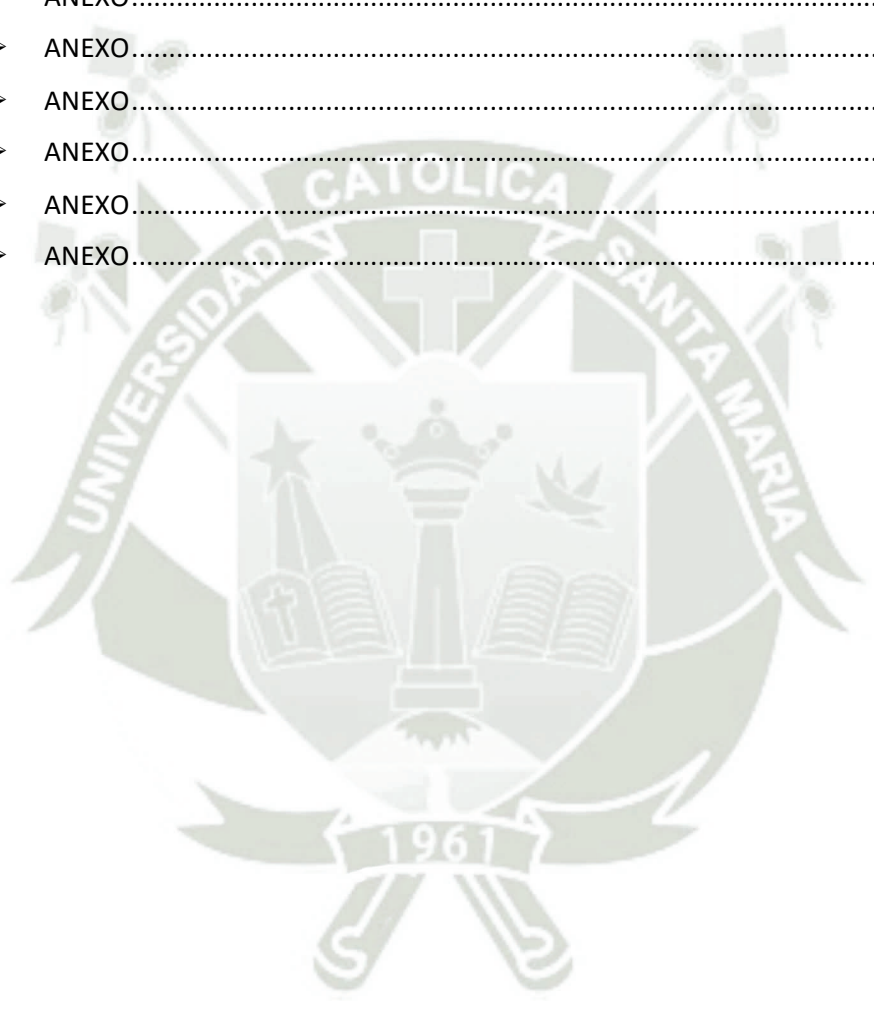


INDICE GENERAL

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS.	III
INDICE GENERAL	V
INDICE DE TABLAS	VIII
INDICE DE FIGURAS	IX
RESUMEN	XI
ABSTRACT.....	XII
INTRODUCCIÓN	1
HIPOTESIS	3
OBJETIVOS	4
Objetivo General	4
Objetivos específicos	4
TABLA DE VARIABLES E INDICADORES	5
CAPITULO I	6
1. MARCO TEORICO.....	6
1.1. Quinoa (<i>Chenopodium Quinoa willd</i>).	6
1.1.1. Descripción de la planta.	6
1.1.2. Producción mundial y nacional de la quinoa	8
1.1.3. Residuos generados en la cosecha de quinoa.	9
1.1.4. Alternativas para la revalorización de la quinoa.	10
1.2. Materiales lignocelulósicos	11
1.2.1. Hemicelulosa.....	12
1.2.2. Celulosa.....	15
1.2.3. Lignina	16
1.3. Extractivos en granos y residuos de quinoa.....	18
1.4. Hidrolisis de materiales lignocelulósicos	19
1.5. Xilooligosacaridos (XOS)	20
1.5.1. Identificación de XOS por HPLC y TLC.	22
1.5.2. Técnicas de purificación.....	24
1.6. Carotenoides.....	25

CAPITULO II.....	26
2. MATERIALES Y METODOLOGIAS	26
2.1. Lugar de ejecución.	26
2.2. Materiales.....	26
2.2.1. Material biológico.	26
2.2.2. Reactivos e insumos químicos.....	27
2.2.3. Material de laboratorio.	27
2.2.4. Aparatos y Equipos.	27
2.2.5. Software.	32
2.3. Metododos.....	33
2.3.1. Acopio y trituración de las muestras de quinua.	33
2.3.2. Caracterización de las variedades de quinua.....	34
2.4. Análisis de lignina soluble e insoluble por hidrólisis acida.	35
2.5. Análisis de azúcares reductores totales.....	36
2.6. Remoción de saponina para su posterior uso en la producción de XOS.	36
2.7. Tratamiento Hidrotermal para la producción de XOS	38
2.7.1. Tratamiento realizado en Reactor Parr de 2 L.	38
2.7.2. Tratamiento realizado en Reactor Parr de 50 mL.	38
2.8. Purificación de XOS por tecnología de membranas.	40
2.9. Identificación y cuantificación de XOS obtenidos por TLC y HPLC.....	41
2.10. HPLC de líquidos hidrolizados en el reactor Parr de 50 mL.....	42
2.11. HPLC de líquidos hidrolizados en el reactor Parr de 2 L.....	43
2.12. Producción de carotenoides usando el hidrolizado celulósico.	43
2.12.1. Caracterización e hidrólisis enzimática de material celulósico remanente.....	43
2.12.2. Preparación del Inoculo.....	44
2.12.3. Proceso de fermentación en hidrolizado.	44
2.12.4. Extracción de bio pigmentos.	45
CAPITULO III.....	46
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
3.1. Caracterización Química de los Tallos de Quinua.	46
3.2. Optimización del proceso de auto hidrólisis para producción de XOS.	47
3.3. Tratamiento hidrotermal para la producción de XOS en reactor Parr de 2L.	50
3.4. Analisis de XOS analizados por técnicas de HPLC.....	51
3.5. Purificación XOS usando membrana.....	52

3.6. Composición de sólidos residuales e hidrólisis enzimática.	55
3.7. Producción de carotenoides usando hidrolizado celulósico.	57
CONCLUSIONES	60
RECOMENDACIONES	61
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	62
ANEXOS.....	71
➤ ANEXO.....	71
➤ ANEXO.....	71
➤ ANEXO.....	72
➤ ANEXO.....	72
➤ ANEXO.....	73
➤ ANEXO.....	73



INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Tabla de variables significativas e unidades indicadoras.....	5
Tabla 2: Valor nutricional de los granos de quinua.....	7
Tabla 3. Composición química de los tallos de las 3 variedades de quinua.....	46
Tabla 4. Composición química de los tallos de las 3 variedades de quinua.....	47
Table 5. Condiciones de hidrólisis térmica en reactor Parr de 50 mL.....	48
Tabla 6. Caracterización de residuos sólidos tras hidrólisis hidrotermal.....	56
Tabla 7. Azúcares totales liberados obtenidos después del tratamiento hidrotérmico de tallos de quinua.....	57
Tabla 8. Rendimiento de hidrólisis de celulosa en los sólidos residuales obtenidos después del tratamiento hidrotérmico de tallos de quinua.....	57



INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Tallo muestra de la quinua, variedad Huancayo. Altura promedio 1.5 metros, Pantoja roja y grano blanco; Registro de investigación.....	6
Figura 2: Aumento de producción de quinua en los últimos años en el Perú.	9
Figura 3: Proceso de siembra, cultivo y cosecha de la quinua.	10
Figura 4: Identificación del material lignocelulósico y sus componentes.....	12
Figura 5: Estructura química de la hemicelulosa.....	13
Figura 6: Derivados de la Hemicelulosa de alto interés.	14
Figura 7: Cadena estructural de la Celulosa compuesta desde 300-1500 moléculas de glucosa.	15
Figura 8: Precursores en la formación de la Lignina.....	16
Figura 9: Modelo estructural de la Lignina.....	17
Figura 10: Estructura química de la saponina.	19
Figura 11: Esquema operacional de la hidrolisis hidro-térmica para la recuperación de XOS.	20
Figura 12: Esquema estructural de los xilooligosacaridos más comunes.	21
Figura 13: Esquema operacional del HPLC para la identificación de XOS.....	23
Figura 14: Tallos de quinua “Huancayo” de la zona Salcedo.	33
Figura 15: Tallos de quinua “Illpa Inia” de la zona Chucuito.	33
Figura 16: Tallos de quinua “Salcedo Inia” de la zona Vilque.....	34
Figura 17: Muestras de quinua después del proceso de molienda.	35
Figura 18: Tallos de quinua de 3 variedades. a), b) y c) corresponden a biomasa natural posterior a la molienda de las variedades Huancayo, Illpa Inia y Salcedo Inia, respectivamente; d), e) y f) corresponden a biomasa sin extractivos; g), h) e i) corresponden a extractos acuosos correspondientes a cada variedad.	35
Figura 19: Tallos de quinua de 3 variedades, en la primera fase de limpieza de extractivos.	37
Figura 20: Tallos de quinua de 3 variedades, en la segunda fase de limpieza de extractivos.	37
Figura 21: Reactor Parr de 2L donde se realizó el primer diseño experimental de la hidrolisis térmica o auto hidrolisis.....	38
Figura 22: Reactores Parr de 50mL utilizados para la hidrolisis.	39
Figura 23: Interacción de las condiciones de hidrolisis en la obtención de XOS; A) Interacción de la Temperatura-Tiempo; B) Interacción de la Temperatura-concentración S/L %; C) Interacción de la concentración S/L %-Tiempo. Nota: En relación a lo observado podemos decir que las mejores condiciones fueron una temperatura de 178 °C, un tiempo de 45 min y una relación solido liquido del 5% mismas que se usaron para la hidrolisis en el reactor de 2 L.	49

Figura 24: Producción de xilosa y xilooligosacáridos a 178 °C y 10 bar en reactor Parr a diferentes tiempos de retención. Nota: Esta grafica muestra la relación porcentual de los mg de los XOS obtenidos los datos cuantitativos fueron dados por HPLC y relacionados con la materia prima tratada.50

Figura 25: Primer análisis de la hidrolisis optimizada por HPLC. Nota: Esta grafica fue obtenida gracias al software Chromeleon que estaba enlazado con el HPLC donde se leyeron las muestras, las curvas de la grafica representa las concentraciones de xilosa, xilobiosa y xilotriosa.....52

Figura 26: Proceso de Ultra y nanofiltracion con membranas para la purificación de xilooligosacáridos (XOS) a partir de hidrolizado de tallos de quinua. A) contenido de XOS en el permeado y B) contenido de XOS en el retenido. Nota: se probaron diferentes niveles de pH para evaluar la permeabilidad de nuestros XOS, las concentraciones en mg también se evaluaron por cuantificación con HPLC.....54

Figura 27: Filtración secuencial por membranas de UF y NF para la purificación de xilooligosacáridos (XOS) a líquidos hidrolizados por 45 min de tallos de quinua.55

UF:10kDa: Donde la primera fase del retentado tubo un 80.31% de pureza de XOS.55

NF1:500Da: Nanofiltración 1 donde el retentado tubo un 72.15% de pureza de XOS.55

NF2:150-300Da: Nanofiltración 2 donde el retentado tubo un 56.02% de pureza de XOS entre xilobiosa-xilohexosa. Nota: Se presenta así la filtración secuencial de los líquidos, se conservaron los retentados para purificación secuencial y los permeados para continuar con la filtración la cuantificación se hizo por HPLC y el software chromeleon.....55

Figura 28: Producción de pigmentos carotenoides por R. Glutinis utilizando hidrolizado enzimático de celulosa del tallo de quinua pretratado en proceso hidrotermal. Nota: En esta imagen se ven las concentraciones en gr/L que se producen de R. Glutinis y gracias a las curvas de calibración con carotenos entendimos que se produjeron 20.8mg de carotenoides como máximo resultado.59

RESUMEN

El tallo de la quinua (*Chenopodium quinoa*) es un desecho lignocelulósico no valorizado y renovable. Con el objetivo de valorizar este desecho agroindustrial, se evaluó el proceso de hidrólisis hidro-térmica (178 °C y 10 bar) en reactores Parr para la producción directa de xilooligosacáridos (XOS) y posterior hidrólisis enzimática de los sólidos residuales para la producción de carotenoides por *Rhodotorula glutinis*. Como resultado, el mayor rendimiento de XOS (79 mg/g de biomasa) conteniendo principalmente xilotetraosa (X4) a xilohexaosa (X6) se obtuvo en 20 min del proceso; sin embargo, se observó un alto contenido de xilobiosa (X2) y xilotriosa (X3), XOS de bajo peso molecular, a 45 min del proceso. En el desarrollo de purificación por membranas de ultrafiltración (10 kDa de tamaño de poro) el pH 6.6 permitió mayor flujo de permeado que el obtenido a pH bajo (3.6, 4.6, 5.6). Además, el extracto obtenido mediante el proceso de NF (~500 Da) y retentato en membrana NF (150~300 Da) permitió obtener un 70% de productos totales (X1-X6) con un 56% de pureza (X2-X6). Finalmente, en la etapa de fermentación, la levadura *Rhodotorula glutinis* produjo 4.1 mg de carotenoides/g (peso de células secas) y 6.27 mg de carotenoides/g de azúcar total consumido. Por consiguiente, el tallo de la quinua es una fuente interesante para la producción de biomoléculas de interés y con alto valor económico.

Palabras clave: Tallos de quinua; xilooligosacáridos; carotenoides; prebióticos; bioeconomía circular.

ABSTRACT

The stalks of quinoa (*Chenopodium quinoa*) is a non-renewable and renewable lignocellulosic waste. In order to valorize this agro-industrial waste, the hydro-thermal hydrolysis process (178 °C and 10 bar) was evaluated in Parr reactors for the direct production of xylooligosaccharides (XOS) and subsequent enzymatic hydrolysis of the residual solids for the production of carotenoids by *Rhodotorula glutinis*. As a result, the highest yield of XOS (79 mg/g biomass) was obtained, containing mainly xylohexaose (X6) to xylohexaose (X6) in 20 min of process; however, a high content of xylobiose (X2) and xylotriose (X3), low molecular weight XOS, was observed in 45 min of process. In the purification process using ultrafiltration membranes (10 kDa pore size), pH 6.6 allowed a greater flow of permeate than that obtained at low pH (3.6, 4.6, 5.6). In addition, the extract obtained through the NF process (~500 Da) and retained in the NF membrane (150~300 Da) allowed to obtain 70% of total products (X1-X6) with 56% purity (X2-X6) . Finally, in the fermentation stage, the yeast *Rhodotorula glutinis* produced 4.1 mg of carotenoids/g (dry cell weight) and 6.27 mg of carotenoids/g of total sugar consumed. Therefore, the quinoa stem is an interesting source for the production of biomolecules of interest and with high economic value.

Keywords: Quinoa stalks; xylooligosaccharides; carotenoids; prebiotics; circular bioeconomy.

INTRODUCCIÓN

La quinua (*Chenopodium quinoa*), planta de la familia *Amaranthaceae*, división *Magnoliophyta* y clase *Magnoliopsida*, es uno de los cereales proteicos sin gluten más cultivados en los países de América del Sur, considerado como un “superalimento” gracias a sus características nutricionales, como sus altas cantidades proteicas, presencia de aminoácidos, minerales esenciales, vitaminas y antioxidantes que son beneficiosos para la salud⁽¹⁾.

Actualmente, el Perú es uno de los principales productores de quinua, representando el 57% de la producción mundial de quinua, logrando cosechar 106.643 toneladas en el año 2021, con un aumento de la producción anual del 6,4%. Sin embargo, el aumento en la producción de quinua ha implicado también el aumento en la cantidad de residuos generados en su cosecha, representados en forma de tallos, ramas, cascara y hojas, ya que el grano es el único producto aprovechable del cultivo, el cual corresponde apenas el 20% del peso total de cosecha de cada parcela de quinua, con estos cálculos podemos decir que cada año se producen alrededor de 470.000 toneladas de residuos por el cultivo de quinua, siendo los tallos los que más volumen y peso representan⁽²⁾.

El tallo de la quinua es un material lignocelulósico compuesto por fracciones de carbohidratos (celulosas y hemicelulosas), ligninas y saponinas, sin embargo, la proporción de estos compuestos varían según la variedad genética de quinua. Este tipo de residuos a la fecha tiene pocos estudios sobre su revalorización, pero son materiales que se podrían reaprovechar y convertir en masa comercial. Por ejemplo, la fracción de hemicelulosa que se extrae de los materiales lignocelulósicos pueden ser valorizados como xilooligosacáridos (XOS) que son potenciales prebióticos además de poder obtener otros bio-productos en un contexto de biorrefinería^(3,4).

Es necesario que estos residuos se sometan a un proceso de remoción de componentes tóxicos y de poco interés, como las saponinas⁽⁵⁾, para continuar con la hidrólisis de los tallos y lograr recuperar los carbohidratos de interés y de alto valor comercial que estamos buscando, para esto también será necesario escoger el tipo de hidrólisis que presente mejor resultados, sea más eco-amigable y reproducible⁽⁶⁾.

Los xilooligosacáridos (XOS) son oligómeros con xilosa en su cadena estructural, dentro de ellos se encuentran las formas (X2-xilobiosa, X3-xilotriosa, X4-xilotetraosa,

X5-xilopentanos, X6-xilohexosa, etc) que se consideran prebióticos importantes y emergentes debido a su estimulación selectiva de especies como *Bifidobacteria sp.*⁽⁷⁾. Además, estos carbohidratos también tienen otras características que aumentan su atractivo industrial, debido a que poseen resistencia al calor, tolerancia a los ácidos, bajo valor calórico y poder edulcorante. Estas características llamativas hacen que los XOS sean complementos ideales como aditivos para producir alimentos funcionales⁽⁸⁾.

Los XOS se pueden obtener a partir de la hidrólisis de la fracción hemicelulósica de diferentes materiales lignocelulósicos, utilizando procesos químicos, hidrotérmicos y enzimáticos o por una combinación de estas estrategias. En el caso de la hidrólisis térmica o proceso hidrotérmico para producción de XOS, se emplea agua como solvente de extracción y convirtiéndolo en un proceso sustentable y eco-amigable. Los residuos obtenidos de esta fase contienen elevados porcentajes de celulosa que también pueden ser utilizados como sustratos para procesos fermentativos, por ejemplo, en la producción de carotenoides^(9,10). Estas metodologías eco-amigables y bio-sustentables se han venido realizando por la facilidad de su desarrollo, sin embargo, a la fecha no se ha investigado la obtención de carbohidratos de valor comercial a partir de los tallos de quinua^(11,12).

La purificación de XOS por tecnología de membranas es una estrategia interesante. Por ejemplo, La ultrafiltración (UF) y la nanofiltración (NF) fueron usadas previamente para la producción de XOS. Sin embargo, existen diversos factores, como la dispersión del tamaño de poro de las membranas seleccionadas, las condiciones operativas de filtración, el flujo tangencial, la temperatura y la presión que requieren ser estudiados a fin de optimizar el proceso⁽¹³⁾.

Con estas consideraciones, el objetivo de la presente investigación fue la revalorización de la fracción de carbohidratos (celulosa y hemicelulosa)⁽¹⁴⁾, presente en los tallos de quinua. Inicialmente, se evaluó el proceso de hidrólisis hidro-térmica en un diseño experimental para encontrar las condiciones óptimas en un reactor Parr, posterior a esto, se evaluaron los parámetros en la filtración con membranas con el propósito de obtener XOS con alta concentración. Finalmente, el sólido remanente del proceso de hidrólisis hidro-térmica se hidrolizó enzimáticamente empleando celulasas y se utilizó para la producción de carotenoides⁽¹⁵⁾.

HIPOTESIS

Debido a que los residuos de quinua contienen carbohidratos en forma de celulosa y hemicelulosa es probable que, puedan ser utilizados para la producción de XOS y azúcares fermentables empleando procesos hidrotérmicos y de autohidrólisis o hidrólisis hidro-termica.



OBJETIVOS

Objetivo General

Valorizar los residuos de quinua como carbohidratos a través de procesos hidrotérmicos de la fracción de hemicelulosa de los residuos de quinua para la producción de xilooligosacáridos.

Objetivos específicos

1. Caracterizar químicamente tres tipos de variedades de la quinua (celulosa, hemicelulosa, lignina, extractivos, saponinas y cenizas).
2. Evaluar la obtención de xilooligosacáridos por proceso hidrotérmico en reactores de 50 mL y 2 L.
3. Evidenciar la actividad de las membranas poliméricas de ultrafiltración y nanofiltración para la concentración y cuantificación de xilooligosacáridos por HPLC, obtenidos por procesos hidrotérmicos.
4. Evaluar la obtención de carotenoides con ayuda *R. glutinis* empleando el líquido hidrolizado celulósico como fuente de carbono.

TABLA DE VARIABLES E INDICADORES

Tabla 1: Tabla de variables significativas e unidades indicadoras.

TRATAMIENTO	VARIABLES			
	INDEPENDIENTES	VALORES DE MEDICION	DEPENDIENTES	VALORES DE MEDICION
CARACTERIZACION DE MUESTRAS	Variedades de quinua	Porcentaje de componentes (%)	Contenido de: Celulosa Hemicelulosa Ligninas Ceniza	Gramos (g) de cada compuesto/gramos (g) de muestra.
HIDROLISIS DE HEMICELULOSA	Temperatura Tiempo Cantidad de solido	°C min Relación S/L Porcentual	Rendimiento de XOS	Miligramos (mg) de XOS/Gramos (g) de muestra.
MEMBRANAS	PH Tipo de filtración Ultrafiltración (UF) y Nanofiltración (NF)	Dalton (Da)	Flujo del permeado (mL/min)	Concentración y pureza de XOS (mg)

CAPITULO I

1. MARCO TEORICO

1.1. Quinua (*Chenopodium Quinoa willd*).

1.1.1. Descripción de la planta.

La quinua (*Chenopodium Quinoa willd*), es un cereal oriundo de las tierras altoandinas, específicamente de las partes altas de la cordillera de los Andes, este cereal que creció por primera vez en los alrededores del Lago Titicaca entre los países de Perú y Bolivia fue cultivada por las civilizaciones prehispánicas y tomada como un alimento necesario para las poblaciones⁽¹⁾.

Sus características principales son: tamaño entre 1.5 a 2.2 metros, puede presentarse en diferentes tonalidades (blancas, rojas, negras, amarillas y marrones), las panículas o pantojas crecen en la punta de los tallos y sus flores pequeñas carecen de pétalos^(16,17), como se puede ver en la Figura 1. La calidad nutricional de los granos es una de las razones por las que se guarda germoplasma de este cultivo, en instituciones como el Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria (INIEA) o la Universidad Nacional del Altiplano localizada en Puno y el Centro de Investigación en Cultivos Andinos (CICA), en donde se tiene por lo menos 3000 accesiones de quinua⁽¹⁸⁾.



Figura 1: Tallo muestra de la quinua, variedad Huancayo. Altura promedio 1.5 metros, Pantoja roja y grano blanco; Registro de investigación.

La importancia de este cultivo radica en su composición nutricional, presentando un 14 a 18% de proteína total en toda su masa consumible, además, contiene 16 de los 24 aminoácidos existentes en concentraciones que ayudan a

las personas a completar el % VD (porcentaje de valor diario de un determinado compuesto que una persona debe consumir para tener una dieta balanceada), entre estos encontramos, el ácido aspártico, treonina, serina, ácido glutámico, prolina, glicina, alanina, valina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina, lisina, histidina, arginina, metionina, cistina, triptófano, amilosa en un 20% VD y amilopectina en un 80 % VD, además, de sus azúcares libres, con fibra bruta y soluble, por último encontramos sus minerales, como el Calcio, Fósforo, Hierro y 2 % de Nitrógeno en su peso total⁽¹⁹⁾ (Tabla 2).

Tabla 2: Valor nutricional de los granos de quinua.

INFORMACION NUTRICIONAL	CANTIDAD /PORCION DE 180 gramos.	
Proteínas	8.14 gramos	
Carbohidratos	39.41 gramos	
Agua	132.48 gramos	
Grasas	3.55 gramos	
Fibra	5.2 gramos	
Azúcares	1.61 gramos	
MINERALES	CANTIDAD	VALOR DIARIO
MANGANESO	1.167 mg	51% VD
COBRE	0.355 mg	39% VD
MANGNESIO	118 mg	28% VD
FOSFORO	281 mg	22% VD
ZINC	2.02 mg	18% VD
HIERRO	2.76 mg	15% VD
SELENIO	5.2 mg	9% VD
POTASIO	318 mg	7% VD
CALCIO	31 mg	2% VD
MINERALES	CANTIDAD	VALOR DIARIO
ACIDO FOLICO	78 ug	20% VD
TIMANIA	0.198 mg	17% VD
RIBOFLAVINA	0.204 mg	16% VD

COLINA	42.5 mg	8% VD
ALFA-TOCOFEROL	1.17 mg	8% VD
NIACINA	0.762 mg	5% VD
PIRIDOXINA	0.228 mg	5% VD

Nota: Adaptado de QUINUABOL S.R.L.⁽²⁰⁾.

1.1.2. Producción mundial y nacional de la quinua

La producción de quina en el 2020 fue aproximadamente 175 188 toneladas a nivel mundial, de los cuales el Perú contribuyó con el 57.15 % y Bolivia con el 40.04%. Este cultivo siempre ha sido consumido y exportado en masa sin embargo las estadísticas indican que desde que el año 2010 a la actualidad, se ha evidenciado un aumento del 9.1 % a nivel nacional. Por ejemplo, en regiones como Arequipa con 24.5 %, Ayacucho con 22.7 %, Apurímac con 22.1 %, Cusco 19.2 %, Junín 11.9 % y La Libertad 11.7 % representando los mejores y más importantes crecimientos hasta la fecha siendo Arequipa la región más productora anualmente⁽²⁰⁾. Sin embargo y tomando estadísticas de años anteriores revelamos que en el año 2014 hubo una sobreproducción de este cultivo, llegando a las 114000 toneladas de grano, mostrando así un incremento del 119% con respecto al año anterior, demostrando así, que la producción en el Perú es factible si se cultiva con las condiciones adecuadas⁽²¹⁾. En ciudades como Ayacucho, la cantidad de hectáreas en la que se siembra este cereal ha tenido un incremento de 2300 hectáreas de producción en los últimos 10 años lo que significa un incremento del 939 % a lo largo de todos esos 10 años, hasta la fecha dicho patrón sigue en aumento exponencial gracias a la demanda de este cereal (Figura 2).

La quinua posee un alto valor comercial y nutricional frente a los otros cereales de la zona como la kiwicha, cañihua, cebada y avena, además posee ventajas en la productividad y el tipo de cosecha, por la adaptabilidad genética que posee y el empleo de recursos naturales en la limpieza final. Sin embargo, resulta preocupante que sean los países donde más se produce, los mismos que presentan la menor tasa de consumo, ya sea por el alto costo o la poca divulgación de información nutricional los agricultores prefieren exportar este

grano al extranjero que venderlo en el mercado nacional, este también es un problema que se busca resolver con la investigación agregando valor a la cosecha de quinua para su mayor producción⁽²²⁾.

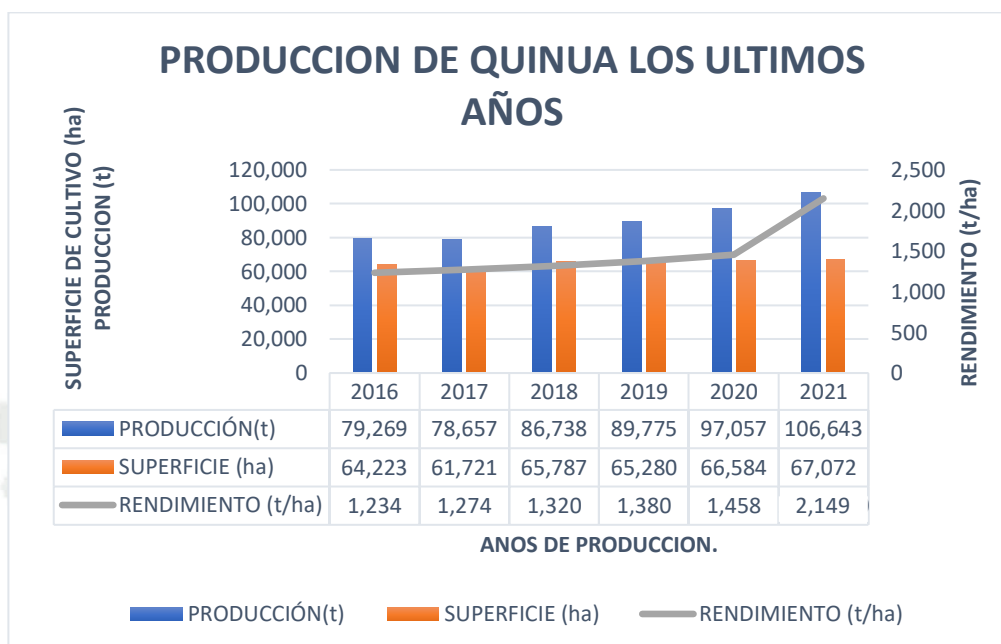


Figura 2: Aumento de producción de quinua en los últimos años en el Perú. Adaptado de Zegarra⁽²⁰⁾.

1.1.3. Residuos generados en la cosecha de quinua.

Los residuos generados en la cosecha de la quinua son un conjunto de ramas, hojas, tallos e inflorescencias, todo esto es desechado o quemado sin reaprovechar la biomasa de lignocelulosa que posee. Como se observa en el Figura 3, la etapa principal en donde se van a generar este tipo de desechos es en la fase de la trilla, ya sea manual o mecánica esta parte del proceso de la producción es donde se escogerá solo los granos para proseguir con su empaquetado y los desechos se llevarán a los depósitos comunes.

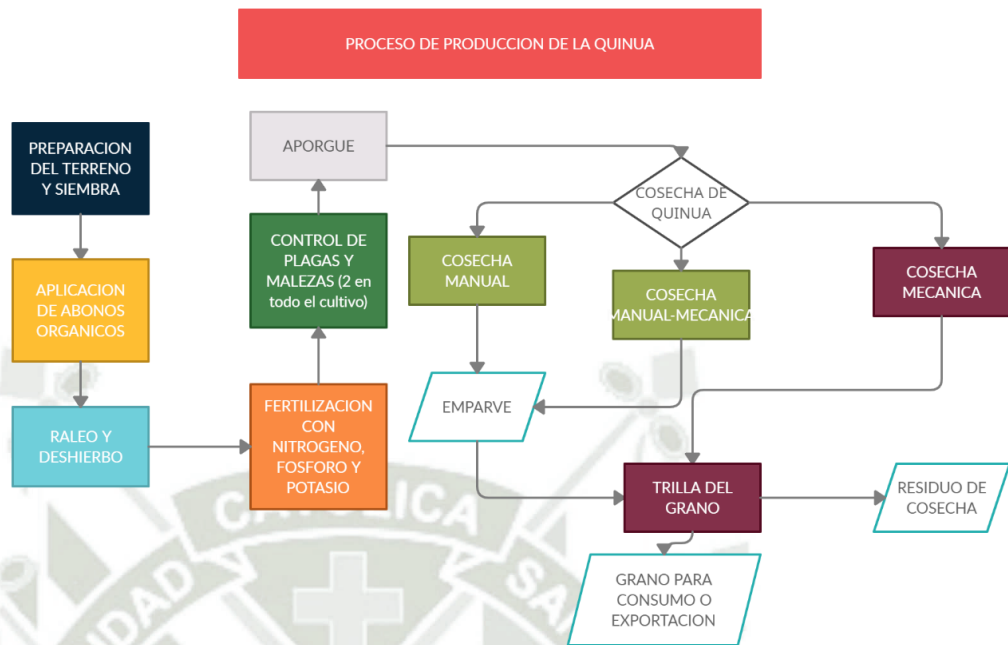


Figura 3: Proceso de siembra, cultivo y cosecha de la quinua. Adaptado de Zegarra ⁽²⁰⁾.

1.1.4. Alternativas para la revalorización de la quinua.

El desecho principal en la cosecha de quinua son los tallos, por el volumen que representan. En el año 2020 llegaron a generarse aproximadamente 84000 toneladas, los mismos que pueden ser utilizados en menor proporción como alimento para animales después de un proceso de remoción de saponinas⁽²³⁾. Sin embargo, considerando el gran volumen generado y el reducido beneficio comercial, a la actualidad los productores prefieren descartarlos en los propios campos agrícolas para su degradación natural⁽²⁴⁾. Esta forma de descarte contribuye también a la contaminación ambiental por su proceso de eliminación por combustión. Otro desecho generado en el procesamiento de la quinua corresponde al pericarpio el cual se genera en la trilla manual o mecánica, el mismo que no contine saponina y por lo tanto se puede ser utilizado en la formulación de alimento balanceado para animales⁽²⁵⁾.

Los tallos son los residuos más atractivos para su valorización debido a su composición y disponibilidad, en su composición se destaca la presencia de celulosa, hemicelulosa, pectinas y lignina, los mismos que pueden variar en

función de varios factores, entre ellos, agrícolas (suelo), especie (variedad) y condiciones climáticas⁽²⁶⁾.

Con relación a su valorización, pocos estudios se han realizado a la fecha, por ejemplo, en la base de datos de SCOPUS se han llegado a publicar algunos trabajos que buscan aprovechar todas las fracciones lignocelulósicas de estos residuos, específicamente hablando, los carbohidratos presentes en este material. Con relación a la hemicelulosa, apenas se realizó un trabajo para producción de XOS, donde realizó un tratamiento relacionando la subespecie y la morfología de planta con la cantidad de hemicelulosa que se puede recuperar⁽²⁷⁾. Puesto que, solo se trabajó con la fracción de hemicelulosa de estos tallos es necesario mejorar las condiciones para obtener el mayor rendimiento de xilooligosacaridos (XOS), purificándolos después, con la ayuda de membranas para evaluar su capacidad prebiótica. Finalmente, buscando aprovechar todo el residuo se utiliza el material celulósico remanente como fuente de carbono en la producción de carotenoides⁽²⁸⁾.

1.2. Materiales lignocelulósicos

Los materiales lignocelulósicos están compuestos principalmente de lignina, celulosa y hemicelulosa., como se puede ver en la Figura 4. Estos materiales pueden resultar de la actividad agrícola, forestal y municipal, estas macromoléculas son producidas alrededor de todo el mundo en cantidades excesivas, llegando aproximadamente a los 200000 millones de toneladas por año⁽²⁹⁾.

La lignocelulosa se encuentra en las paredes celulares de las células vegetales que recubren la mayoría de las plantas, sin embargo, las proporciones de esta macromolécula pueden variar dependiendo las especies, el tiempo de desarrollo o la fase de crecimiento de las plantas que se estén evaluando⁽³⁰⁾.

Entre todos los residuos lignocelulósicos que más se producen encontramos, los residuos forestales, municipales y los agrícolas, estos últimos han ganado

un importante valor comercial por la biodisponibilidad y la posibilidad que se tiene de recuperar subproductos de interés

Residuos agrícolas, como los agaves, los cultivos de arroz, maíz, cebollas, plátanos y cañas de azúcar, se han convertido en biomasa de interés por la cantidad de lignocelulosa que podemos encontrar en ellos, además, el poder de que se investiga el desarrollo de novedosas metodologías para su próximo tratamiento previo al desecho y la purificación de lignina, celulosa y hemicelulosa de valor comercial⁽³¹⁾.

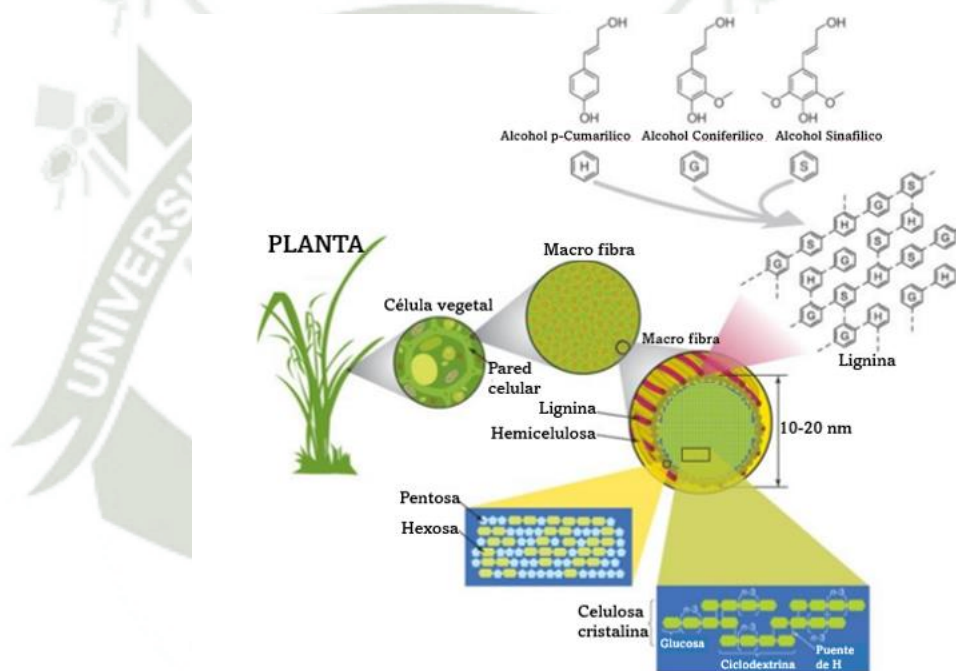


Figura 4: Identificación del material lignocelulósico y sus componentes.

Adaptado de Cuervo et al.⁽³²⁾.

1.2.1. Hemicelulosa

La hemicelulosa es una macromolécula de heteropolisacáridos, como se puede ver en la Figura 5. A diferencia de la celulosa que solo está compuesta por moléculas de glucosa, la hemicelulosa, está compuesta por varios monosacáridos, azúcares como ramosa, arabinosa, manosa, galactosa, xilosa y glucosa en remanentes cantidades, unidos entre sí por enlaces β (1;4) y α (1;3),

está macromolécula se encuentra en las paredes celulares, recubriéndolas con ayuda de las fibras de celulosa facilitando así el enlace de la pectina⁽³³⁾.

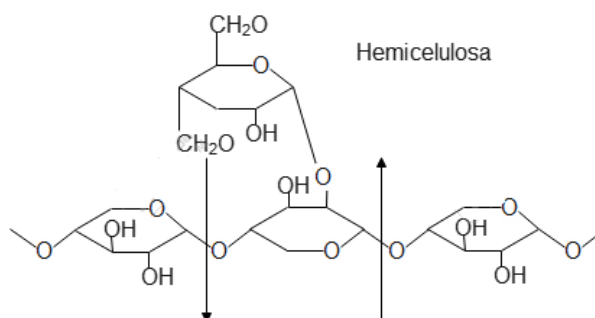


Figura 5: Estructura química de la hemicelulosa. Adaptado de Pasini⁽³⁴⁾.

La hemicelulosa al ser abundante en el planeta también se puede encontrar en los desperdicios de los animales, alimentos como el heno de alfalfa o forrajes criollos o afrechos naturales contienen concentraciones altas de hemicelulosa. Es así, como en algunos desperdicios de animales rumiantes se pueden encontrar concentraciones de hemicelulosa, esta es una de las razones por las que se usa este desperdicio como abono de suelos, por las características benéficas, que puede aportar la hemicelulosa en los ecosistemas del campo, animales como cabras, vicuñas, alpacas producen un tipo de rumen que se puede investigar⁽³⁵⁾. Por otro lado, la presencia de la hemicelulosa es más evidente y abundante en las cortezas de los árboles, junto con la lignina y la celulosa⁽³⁶⁾.

La hemicelulosa posee en su cadena estructural carbohidratos útiles, los mismos que pueden usarse en investigaciones o experimentos de fermentación, hasta desarrollar biocombustibles⁽³⁷⁾. Además, también se encuentra en estudio la actividad prebiótica de estos mismos carbohidratos estructurales, la liberación de los monosacáridos, especialmente la xilosa, manosa, glucosa y la galactosa abren una importante rama de investigación sobre azúcares fermentables y reaprovechables, la recuperación por hidrólisis ácida o enzimática, han convertido en prioridad estas investigaciones, en especial aquellas donde se reaprovechan los desechos agrícolas para el desarrollo de

microorganismos benéficos en la salud de los seres humanos, esto se logra con los xilooligosacaridos que se recuperan de la hemicelulosa⁽³⁸⁾.

Para la recuperación y purificación de la hemicelulosa se utilizan varias metodologías, la hidrólisis acida, enzimática y los tratamientos hidrotérmicos son las más estudiadas, pero los que generan mejores resultados y son los más replicables son aquellas metodologías que involucran la cocción alcalina como pretratamiento⁽³⁹⁾; Para esto, los tratamientos alcalinos con NaOH en diferentes concentraciones a diferentes temperaturas, cumplen con extraer la mayor cantidad de hemicelulosa de los diferentes tipos de biomasa lignocelulósica, sin embargo y gracias a la estructura mixta de la hemicelulosa, se puede descomponer en varias fracciones de interés, como por ejemplo en biopolímeros o azúcares pequeños como la glucosa, manosa, galactosa, pentosa, xilosa y arabinosa, dentro de esta lista encontramos los más importantes y de mayor valor comercial, los xilooligosacaridos, como se puede ver en la Figura 6⁽⁴⁰⁾.

Estos compuestos se diferencian por las concentraciones estructurales de xilosa, va desde las 2 moléculas a más de este azúcar reductor, nombrándolas así, xilobiosa xilotriosa, xilotetraosa, xilopentanosa y la xilohexosa, etc. De esta manera, estos subproductos usados como prebióticos, que no son producidos en masa por la dificultad que tienen en su obtención, por su sensibilidad y volubilidad, son recuperados como subproductos de alto interés comercial y se expone una alternativa para su fácil obtención⁽⁸⁾.

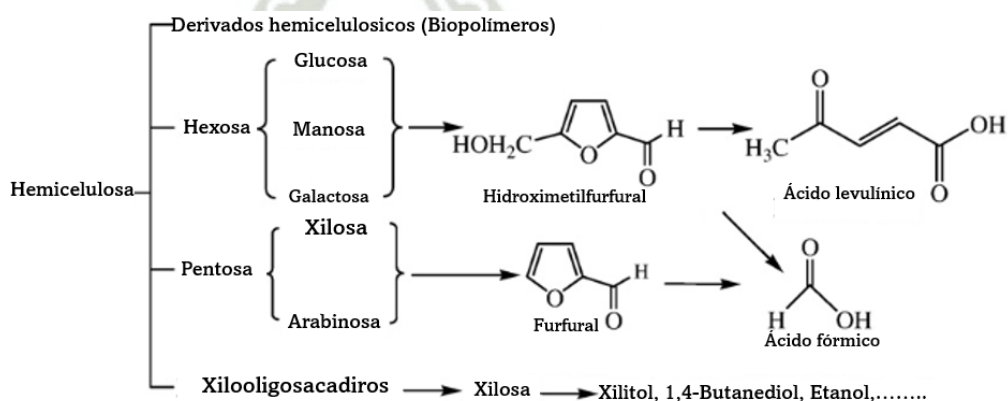


Figura 6: Derivados de la Hemicelulosa de alto interés. Adaptado de Peng et al. ⁽⁴⁰⁾.

1.2.2. Celulosa

La celulosa es un biopolímero compuesto estructuralmente de glucosas unidas entre sí de manera lineal por enlaces β -1,4. Este polímero puede ser obtenido por varias metodologías y de varias fuentes, entre las más comunes encontramos, las cortezas de los árboles y algunas plantas leñosas, siendo la edad y la fase de desarrollo de estas una variable importante en la concentración final de celulosa, además, del tratamiento escogido para estos mismos materiales vegetales⁽⁴¹⁾.

Este biopolímero ha ganado un gran interés en la actualidad por su concentración estructural de glucosa. Esta le da un volumen importante y a diferencia de la Hemicelulosa este es un homopolisacárido, como se puede ver en la Figura 7, esta biomolécula resulta ser la más abundante en la biomasa terrestre, la forma más común de encontrarla es en el algodón ya que este material está compuesto en su 90 % de celulosa⁽⁴²⁾.

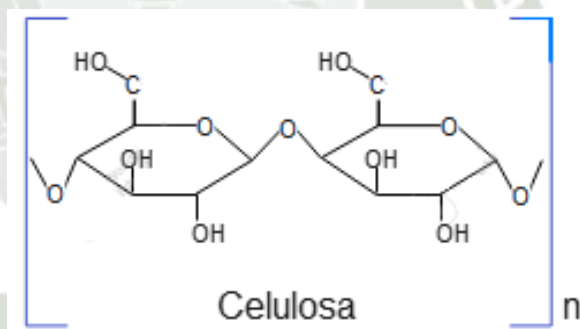


Figura 7: Cadena estructural de la Celulosa compuesta desde 300-1500 moléculas de glucosa. Adaptado de Sanz⁽⁴²⁾.

La unión entre las moléculas de glucosa por puentes β -1 y 4- α -glucosídicos le da firmeza y estabilidad frente a cambios físicos que se pudieran presentar. La fórmula base de la glucosa es $(C_6H_{10}O_5)_n$ siendo “n” la cantidad de moléculas de glucosa, no siendo menor a 300⁽⁴³⁾. La función de esta macromolécula en las plantas es de soporte, el 40% de las paredes celulares jóvenes están formadas de este compuesto. Dentro de los usos que pueden darse a la celulosa los encontramos en la fabricación de papel, barnices, explosivos y seda artificial, además, se puede aprovechar su estructura para sacarificaciones ya

que es posible someter a la celulosa a pretratamientos para degradarla hasta productos que sean fermentables por rutas metabólicas⁽⁴⁴⁾.

1.2.3. Lignina

La lignina es un polímero aromático, heterogéneo, compuesto principalmente por 3 tipos de monómeros, como fenilpropanoides, el alcohol p-cumarílico derivado del p-hidroxifenilo, el alcohol coniferílico derivado del guayacilo y el alcohol sinapílico derivado del siringilo (Figura 8)⁽⁴⁵⁾.

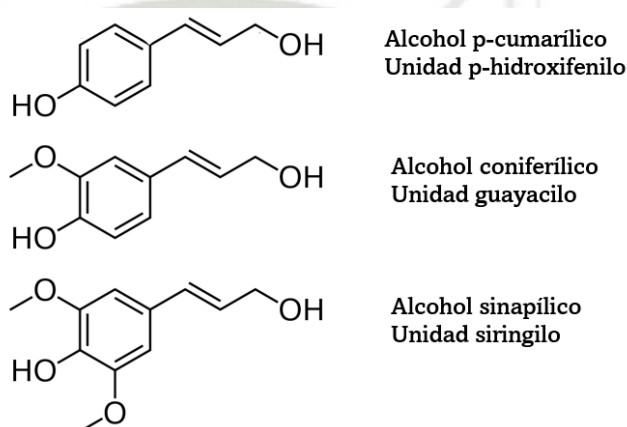


Figura 8: Precursores en la formación de la Lignina. Adaptado de Mateus⁽⁴⁶⁾.

La lignina está constituida por monolignoles acetilados, como los esteres de coniferilo y de sinapilo, además puede presentar hidroxicinamatos, como el ácido p-cumárico, el ferulato, el sinapato, coniferaldehidos, sinapaldehidos, ácidos ferulícos y el alcohol 5-hidroxiconiferaldehido. Estas son estructuras que también podemos encontrar en la cadena formativa de la lignina, pero en menores cantidades o como derivados de los estructurales⁽⁴⁷⁾. Estos monolignoles se unen entre sí por 20 enlaces distintos, como lo son el β -O-4, β -5, 5-5, 4- α -5, β - β y el β -1, formando así cadenas estructurales como el guayacilglicero-Baril éter, fenilcumaranos, diarilpropanos, resinoles, bifenilos y difenilos de eter⁽⁴⁸⁾. Sin embargo, los enlaces estructurales de la lignina son los β -aril éteres o β -O-4, pero este es más débil que los anteriores mencionados (Figura 9)⁽⁴⁹⁾.

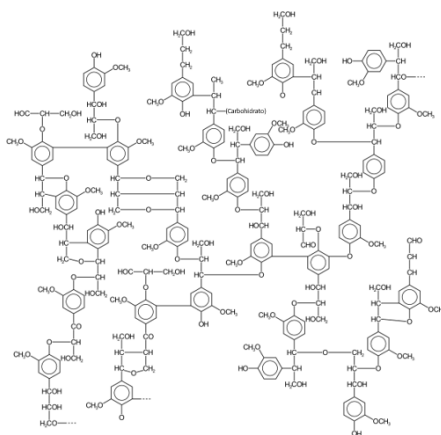


Figura 9: Modelo estructural de la Lignina. Adaptado de Mateus⁽⁴⁶⁾.

Gran parte esta molécula se encuentra en las paredes celulares de los organismos vegetales, la característica multifuncional de la lignina ofrece propiedades químicas muy variadas lo que le permite a su vez un gran número de transformaciones químicas⁽⁵⁰⁾. Una de las primeras aplicaciones de la lignina fue en el ámbito medicinal en la fabricación de Polifepan, un medicamento que se usa para el tratamiento de trastornos digestivos en los seres humanos⁽⁵¹⁾.

También se encuentra en evaluación varias propiedades de esta molécula, como su capacidad de remediar cultivos como el tabaco, inhibiendo el crecimiento del mosaico, la proliferación del hepatoma AH414 y su posterior hepatocarcinogenesis, gracias a esto, también se descubrió que sirve como antibiótico para las personas protegiendo el hígado. A su vez es un antiviral usado para el virus del herpes, la encefalitis equina y el VIH⁽⁵²⁾.

Sin embargo no todas las ligninas son iguales, ya que, varían dependiendo de la fuente de extracción o fabricación, es así, como encontramos ligninas sintéticas como las sulfonadas y las Kraft que son producidas a base de papel, dentro de los productos que podemos obtener de la lignina encontramos el LIGMED-A, un producto químico de la lignina alcalina obtenido del bagazo de la caña de azúcar, que viene de los licores residuales de la producción de los mismos, este compuesto tiene capacidades germicidas, además, de tener la capacidad de atrapar radicales libres, usado también como antioxidante en los eritrocitos humanos, por lo que, también es considerada como una medicina

contra problemas estomacales, ya que, está demostrado que no afectan la actividad enzimática del intestino⁽⁵³⁾.

1.3. Extractivos en granos y residuos de quinua

La quinua, es un cereal muy adaptable y resistente, sin embargo, para su correcto cultivo y cosecha estas parcelas deben tener muchos cuidados y consideraciones, en vista que se encuentran amenazadas por muchas plagas y malas hierbas silvestres, es así como estas plantas y sus “residuos” terminan con una gran cantidad de extractivos, provenientes de los germicidas suministrados a lo largo de su cultivo, presentados como compuestos de poco interés y tóxicos para la salud humana⁽⁵⁴⁾.

Por esto se considera que, para comenzar a trabajar con este residuo, es necesario pretratarlo con un proceso de limpieza hidrotérmica. Para cualquier intento de recuperación que se quiera hacer de este material, es necesario depurarlos de los compuestos tóxicos que se encuentran en la parte externa de los tallos, según lo documentado se debe realizar un tratamiento hidrotermal en temperaturas y medios donde estos extractivos se puedan disolver como el agua para colorantes naturales y el alcohol para saponinas triterpénicas⁽⁶⁾.

Estos extractivos contaminantes son un obstáculo en la bio-refinería de la quinua, en especial, las saponinas de naturaleza triterpénica, la cual se expresa como ácido oleanólico y se estudia también por su propiedad antioxidante, hepato protectora y actividad antitumoral⁽⁵⁵⁾. De los tipos de quinua que se tienen registradas se han podido clasificar 30 tipos de saponinas triterpénicas diferentes, que se distribuyen alrededor de los tallos, las hojas, las flores, los frutos y las semillas⁽⁵⁶⁾.

Estructuralmente, las saponinas son compuestos derivados de una mezcla de glucósidos tri terpénicos, (Figura 10) estos también derivados del ácido oleanólico, hederagenina, el ácido fitolacagénico, el ácido deoxifitolacagénico, el ácido serfanico y el ácido trihidroxi oleanoico. Los enlaces glucosídicos de estas macromoléculas se forman con la ayuda de arabinosa, glucosa, galactosa, xilosa, ácido glucurónico y ramosa⁽⁵⁷⁾.

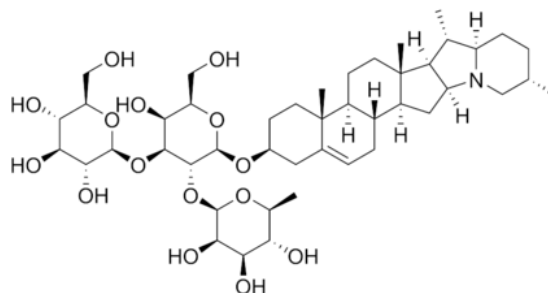


Figura 10: Estructura química de la saponina. Adaptado de Zuñiga⁽⁵⁸⁾.

1.4. Hidrolisis de materiales lignocelulósicos

La hidrólisis es un proceso químico en donde moléculas de agua se descomponen a nivel atómico degradar macromoléculas, la hidrolisis es considerada una alternativa llamativa en la descomposición de macromoléculas de cadenas estructurales muy largas como la hemicelulosa, es necesario, este tipo de tratamientos para descomponer esta macromolécula y lograr la recuperación de xilooligosacaridos, existen muchos tipos de hidrolisis, ya que estas varían dependiendo del soluto que se vaya a usar para sus reacciones⁽⁵⁹⁾.

La hidrolisis enzimática, la hidrolisis ácida y la auto hidrólisis, mejor explicada como la hidrolisis en agua, son las más utilizadas, para la fragmentación de materiales lignocelulósicos, en relación a la química, este proceso podría ser considerado como el antagonista a las reacciones de condensación, que es cuando las moléculas se combinan entre ellas y eliminan moléculas de agua, se busca lograr este resultado en las cadenas de la hemicelulosa y lograr dividir las para obtener los xilooligosacaridos de interés⁽⁶⁰⁾.

La hidrolisis enzimática de la hemicelulosa se ha venido investigando por ser la más específica cuando se quiere extraer un xilooligosacarido en específico, esta se da por enzimas de tipo glucano xilanasas (GH) de la familia 10 y 11^(61,62), sin embargo, cuando se emplea enzimas las condiciones de hidrolisis y el tiempo son parámetros mucho más críticos, lo que la convierte en una metodología más costosa^(63,64).

En la presente investigación se estudió la metodología de hidrólisis en agua o hidrolisis hidro-térmica por intervalos de tiempos y temperaturas, debido a que

dichas variables permiten liberar azúcares reductores y los xilooligosacáridos deseados en diferentes concentraciones (Figura 11)⁽⁶⁵⁾.

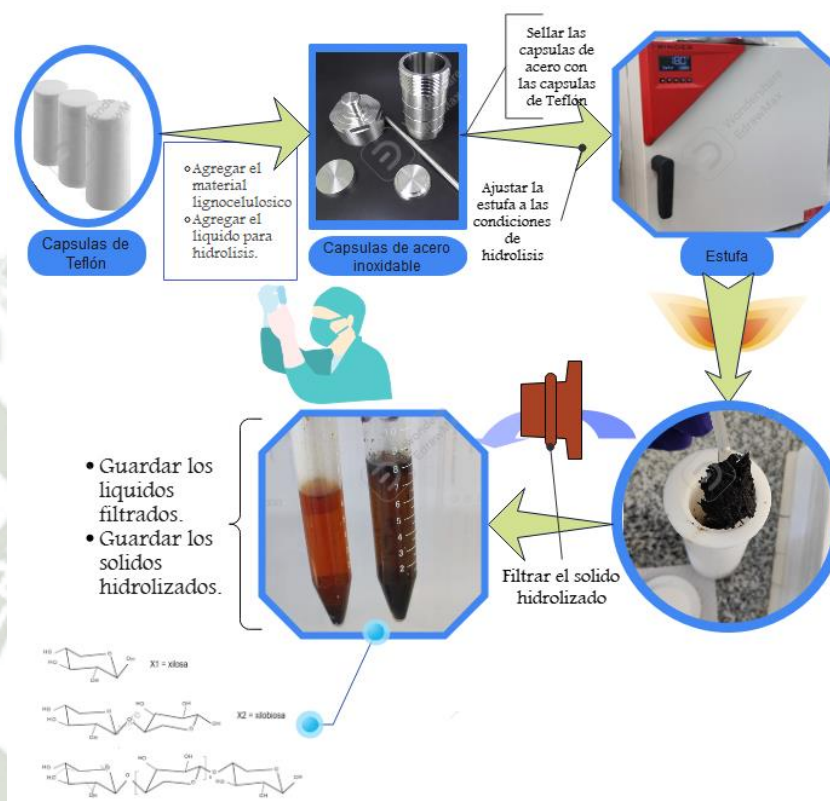


Figura 11: Esquema operacional de la hidrólisis hidro-térmica para la recuperación de XOS.

Además, dichas variables, tienen que estar controladas y estandarizadas pues, una sobre hidrólisis de hemicelulosa en la muestra conllevará a obtener productos no deseados como monómeros de azúcares, derivados ácidos y Xilosa⁽⁶⁶⁾.

1.5. Xilooligosacáridos (XOS)

Estos compuestos son oligosacáridos que poseen en su estructura a la xilosa, además, estos ganan su nombre dependiendo la cantidad de xilosas que puedan poseer en su cadena estructural conforme se observa en la Figura 12⁽⁶⁷⁾.

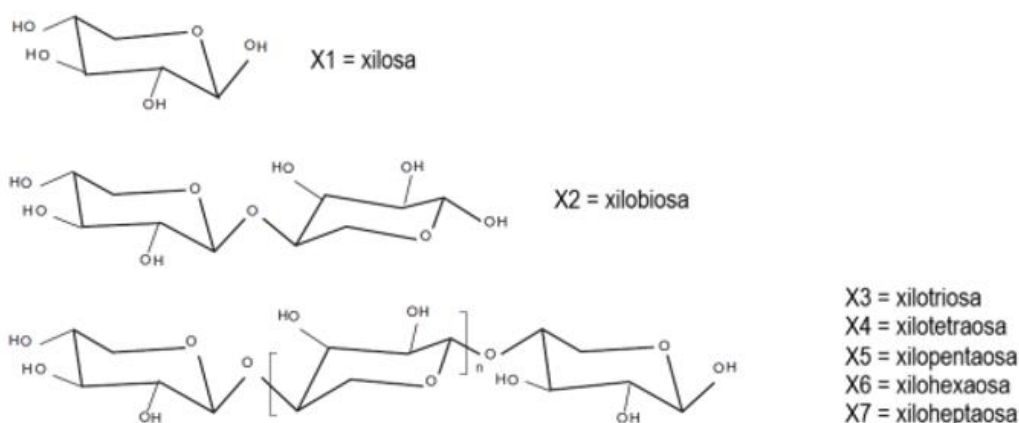


Figura 12: Esquema estructural de los xilooligosacáridos más comunes.
Adaptado de Carvalho et al.⁽⁶⁷⁾.

En la actualidad, han ganado interés por sus efectos prebióticos y la actividad que tienen sobre microorganismos benéficos que se favorecen de los ácidos grasos de cadena corta liberados en la hidrólisis y por metabolismos de estos mismos⁽¹³⁾. Los XOS de los que se han obtenido mejores resultados por su actividad prebiótica son la xilobiosa y la xilotriosa; además, existen otros XOS prebióticos formados por derivados de arabinosas denominados arabinoxilooligosacáridos que también son otra fuente prometedora de material prebiótico⁽⁶⁸⁾.

En la actualidad, el enfoque reside en buscar fuentes de residuos agrícolas con mayor contenido de lignocelulosa, debido a que, esta es la materia prima de donde se recupera elevadas concentraciones de hemicelulosa. El material que queda después de la actividad agroindustrial resulta ser una de las mejores opciones para este tipo de investigaciones, como el bagazo de la caña de azúcar, el salvado de centeno, el salvado de trigo, la paja de trigo, las mazorcas de maíz, los tallos de la quinua, los tallos de tabaco, la cascara del arroz, los desechos de la cebolla y muchos otros desechos agroindustriales⁽⁶⁹⁾.

1.5.1. Identificación de XOS por HPLC y TLC.

La cromatografía es una técnica usada para la identificación cualitativa y cuantitativa de compuestos específicos, basada en la migración de estos por el peso molecular y el tipo de polaridad que tienen. Para esta investigación se trabajó con 2 tipos, la TLC o cromatografía en capa fina y la HPLC o cromatografía líquida de alta eficacia⁽⁷⁰⁾.

Para emplear la Thin Layer Chromatography o TLC es necesario una fase estacionaria, comúnmente representada por una placa de sílice gel con base de papel o metal. Donde encontramos diferencias es en la fase móvil que se utiliza para la migración de cada compuesto. En la investigación de XOS se documentaron varias fases móviles, una de estas estaría compuesta por propanol – agua – hidróxido de amonio, en proporciones de (79:20:1), agregando a esto el ftalato de p-anisidina como agente revelador para la cromatografía de 8 posibles azúcares para gomas⁽⁷¹⁾.

Algunos estudios como el reportado por Camus, 1993. Emplean estas metodologías para los niveles de sorbitol en muestras de vino, buscando separar la glicerina, el butanodiol, D-manitol, meso inositol y azúcares, como glucosa, sacarosa y fructuosa, teniendo como fase móvil al N-pentanol, ácido acético y agua destilada, revelando finalmente con el nitrato de plata diluido en acetona y al hidróxido de sodio diluido en metanol, evitando así la interferencia con las soluciones, analizando el sorbitol en todas estas⁽⁷²⁾.

Otra de las condiciones de TLC reportadas para el análisis de xilooligosacaridos consiste en trabajarla en placas metálicas de sílice gel, con una fase móvil compuesta por una mezcla de cloroformo-ácido acético-agua en proporción de 6:7:1, esta fase móvil ayudará a migrar a los XOS, concluyendo con la adición de una solución reveladora compuesta por H₂SO₄ al 5 % diluida en etanol absoluto en nuestra placa, para llevarla finalmente a una estufa a 100 °C por 5 minutos⁽⁷³⁾.

La técnica de HPLC, por otro lado, inicia con una fase móvil, un solvente y columnas que funcionan como fase estacionaria, compuestas por diferentes

zonas de separaciones y por último un detector donde se leerá la cantidad del componente analizado (Figura 13)⁽⁷⁴⁾.

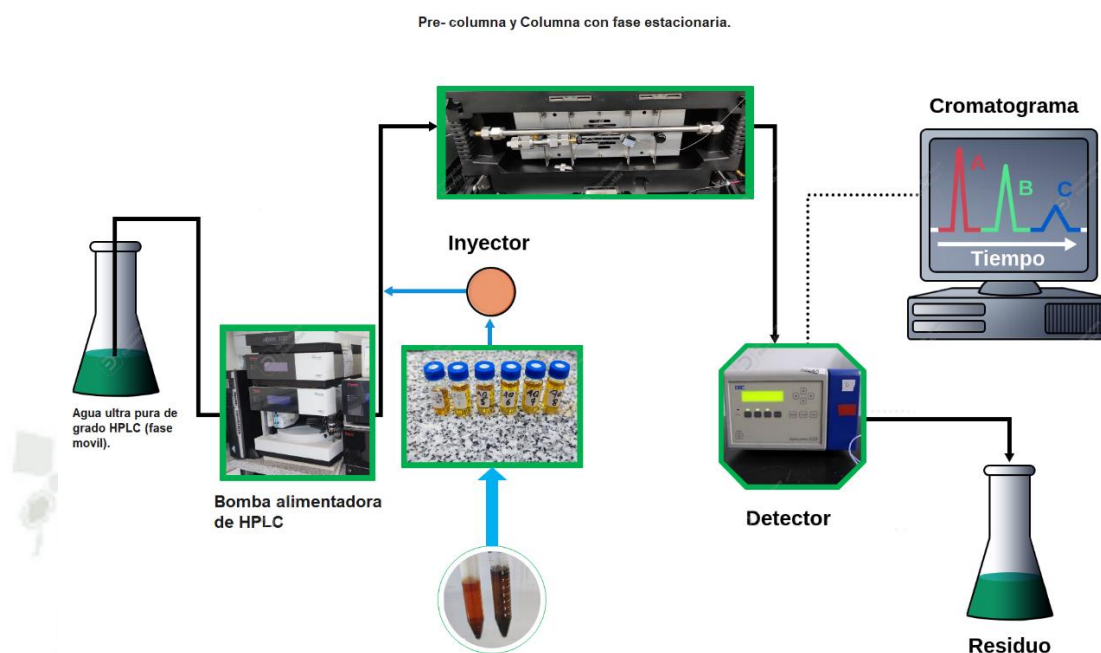


Figura 13: Esquema operacional del HPLC para la identificación de XOS.

En el trabajo de Santibañez et al. Realizaron el análisis cuantitativo de xilooligosacaridos, a través de una columna Aminex HPX-42^a, debido a que, esta cuantifica xilooligosacaridos de cadenas de hasta 6 carbonos. Para este tipo de análisis se suelen realizar curvas de calibración con patrones puros para identificar los XOS o se utiliza cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada o HPAEC-PAD, con columnas de tipo PA1, PA100 o PA200 como en el trabajo reportado por Henriquez Ramirez⁽⁸⁾.

Por otro lado, en el trabajo de Samala et al. La técnica de HPLC que se usa para XOS es extraer una alícuota de la muestra después de la hidrólisis acida y pasarla por filtros de 0.22 micrometros, el equipo que se usa para esta cromatografía es Agilent 1200 series de sistema HPLC, equipado con un detector de índice de refracción, usando la columna Bio-Rad HPX87P a 800c, colocando 20 microlitros de la muestra y diluyendo con agua de grado para HPLC⁽⁷⁵⁾.

1.5.2. Técnicas de purificación

La destilación, extracción, sublimación, cristalización cromatografía, decantación, centrifugación y la filtración son algunas de las técnicas más comunes de purificación que se conocen, sin embargo la filtración por membranas es una de las mejores tecnologías actualmente para la extracción de solutos de valor comercial, el principio principal de esta tecnología es el usar los filtros como barreras selectivas para lograr filtrar las partículas líquidas o para retener macromoléculas de gran tamaño y peso molecular, más grandes que los poros de las membranas que se están utilizando⁽⁷⁶⁾.

Sin embargo dentro de esta tecnología también existen diferentes tipos de filtración entre estas diferenciándose entre ellas solamente por el tamaño de poro por el que se pasara el líquido, para la microfiltración se usarán membranas con poros entre 1 y 0.1 micrómetros de donde nosotros podremos recuperar sólidos suspendidos, después la ultrafiltración utiliza membranas con poros entre 0.1 y 0.01 micrómetros de donde se puede recuperar coloides y macromoléculas, después encontramos la nanofiltración que utiliza poros entre 0.01 y 0.001 micrómetros aquí es donde podremos recuperar iones de gran tamaño y por último esta la ósmosis inversa que utiliza membranas con poros menores a 0.001 micrómetros como resultado de esta última se obtienen 2 fases un retentado de iones y agua como permeado⁽⁷⁷⁾.

Cada una de estas tecnologías se usan para diferentes fines, yendo desde la recuperación de moléculas de valor comercial hasta la purificación de aguas residuales, además, también se relaciona a esto la naturaleza de las membranas, pudiendo ser naturales o sintéticas, las naturales son usadas en varios procesos de la vida cotidiana al mismo tiempo estas se dividen en vivas y no vivas y son usadas en procesos biotecnológicos en los campos médicos y farmacéuticos, las sintéticas por otro lado se usan más en las investigaciones industriales, estas también se dividen en inorgánicas, poliméricas, líquidas y compuestas⁽⁷⁸⁾.

Es por este motivo que se adoptó esta tecnología como la más prometedora para la purificación de los xilooligosacáridos que se obtuvieron después de la autohidrólisis, todo esto por los antecedentes que tiene la nanofiltración en la

separación de XOS de bajo grado de polimerización (DP), para concentrar los XOS de alto valor comercial y asegurar la pureza comercial⁽⁷⁹⁾.

1.6. Carotenoides.

Por último los carotenoides son un tipo de pigmentos naturales orgánicos del grupo de los isoprenoides naturalmente extraídos de la naturaleza de algunas plantas u organismos fotosintéticos, como lo son las bacterias, las algas y algunos hongos de fácil crecimiento, estos pigmentos además se pueden clasificar entre carotenos y xantofilas siendo los primeros cadenas no oxigenadas y las xantofilas derivados oxigenados de los carotenos, el color que estos compuestos pueden presentar van desde un amarillo pálido hasta un rojo oscuro pasando por todas las tonalidades del naranja, esto se encuentra directamente relacionado a su estructura química ya que la presencia de enlaces dobles carbono-carbono aumenta la longitud de onda a la que absorben luz es decir que mientras más enlaces dobles carbono-carbono tenga nuestro caroteno el compuesto será más rojizo⁽⁸⁰⁾.

1.6.1 Producción de carotenos.

Los carotenos no pueden ser producidos por los animales estos deben de ser consumidos en su dieta de otros organismos, entre estos están las algas, plantas o frutos naturales, estos son una fuente importante para las actividades biológicas funcionales, gracias a sus propiedades antioxidantes, anticancerígenas o antimicrobianas, además de que gracias al color que poseen un gran impacto a nivel industrial, cosmética o en la suplementación animal⁽⁸¹⁾. Por este motivo su demanda ha ido en aumento en los últimos años, así como las investigaciones para su obtención, actualmente se han buscado maneras más rentables y reproducibles para la obtención en masa estos compuestos comerciales y una de estas alternativas es el utilizar levaduras, por su fácil acceso, multiplicación y viabilidad, cepas de la familia *Rhodosporium* o *Rhodotorula* se encuentran en investigación por la gran cantidad de carotenoides que se pueden extraer de ellos^(82,83).

CAPITULO II

2. MATERIALES Y METODOLOGIAS

2.1. Lugar de ejecución.

La investigación se realizó en el Laboratorio de Bioprocesos de la Universidad Católica de Santa María. Además, se realizaron algunas actividades de investigación en la Universidad de Sao Paulo de Brasil y Universidad Estatal de Campinas de Brasil.

2.2. Materiales.

2.2.1. Material biológico.

Los residuos agrícolas de la quinua, específicamente de la cosecha de mayo, fueron recolectadas en la región de Puno, a continuación, se explica detalladamente las parcelas específicas.

- Tallos de quinua rosada, la variedad Huancayo INIA se obtuvo de Salcedo, provincia de Puno del departamento de Puno, cuyas coordenadas de la parcela son 15.880091S–70.001161W. Los tallos recolectados presentaron una altura promedio de 140 cm y 1.5 cm de diámetro en su tallo (Figura 14).
- Tallos de quinua blanca, la variedad Illpa INIA se obtuvo de Chucuito, provincia de Puno del departamento de Puno, cuyas coordenadas de la parcela son 15.890498S–69.892110W. Los tallos recolectados presentaron una altura promedio de 164 cm y 2.8 cm de diámetro en su tallo (Figura 15).
- Tallos de quinua de la variedad Salcedo INIA se obtuvo de Vilque, provincia de Puno del departamento de Puno, cuyas coordenadas de la parcela son 15.764578S–70.261029W. Los tallos recolectados presentaron una altura promedio de 160 cm y 2.3 cm de diámetro en su tallo (Figura 16).



2.2.2. Reactivos e insumos químicos.






Ácido sulfúrico (95- 97 %), etanol de grado 97°, estándares de xilobiosa (X2), xilotriosa (X3), xilotetraosa (X4), xilopentaosa (X5) y xilohexaosa (X6) se adquirieron de Megazyme®, estándares de xilosa y glucosa se obtuvieron de Merck & Co. Inc., la enzima celulasa Cellic® CTec2 con 102 FPU/mL de actividad enzimática, al igual que el ácido oleanólico, reactivo Follin y la Vainillina, fueron adquiridos de Merck & Co. Inc.






2.2.3. Material de laboratorio.




Probetas, vasos de precipitado, picetas, matraces, botellas de vidrio, pinzas, tubos de ensayo, pipetas, micropipetas, tips para micropipetas y propipetas, fiolas, espátula, crisoles, motores de aireación, tubos de vidrio, soporte universal, sistema de extracción por Soxhlet, viales de vidrio.

2.2.4. Aparatos y Equipos.



Equipo.	Marca.	Foto.
Bombas peristálticas YZ1515x	Longer Pump	
Espectrofotómetro GENESYS™ 180 UV-Vis	Thermo Fisher Scientific	

<p>Celdas rectangulares de vidrio 10 mm</p>	<p>Spectroquant</p>	
<p>Celdas rectangulares de cuarzo Spectrosil 10 mm</p>	<p>VWR</p>	
<p>Balanza analítica Adventurer</p>	<p>Ohaus</p>	
<p>Estufa de secado y esterilización Conterm, analógica</p>	<p>Binder</p>	
<p>Mufla</p>	<p>Thermo Fisher Scientific</p>	

<p>Crisoles de Ceramica</p>	<p>Haldenwanger</p>	
<p>Medidor de Humedad.</p>	<p>Mettler Toledo</p>	
<p>Shaker con termostato incluido.</p>	<p>Fathul</p>	
<p>Reactor Parr 50 mL</p>	<p>Parr Instrument</p>	
<p>Reactores Parr 50 mL</p>	<p>Parr Baoshishan</p>	

<p>Reactor Parr 100 mL</p>	<p>Parr Instrument</p>	
<p>Reactor Parr 2 L</p>	<p>Parr Instrument</p>	
<p>Sonicador</p>	<p>Branson</p>	

<p>Filtro de Agua Ultrapura</p>	<p>Simplicity UV</p>	
<p>Filtro de membrana de Nylon para el agua del HPLC</p>	<p>Merck</p>	
<p>Precolumna de carbohidratos para HPLC.</p>	<p>Thermo Scientific</p>	
<p>Columna de carbohidratos para HPLC.</p>	<p>Thermo Scientific</p>	
<p>HPLC</p>	<p>Thermo Scientific</p>	

<p>RI-Detector</p>	<p>SerCoLab</p>	
<p>Filtros de jeringa PES estéril</p>	<p>Menbrane Solutions.</p>	
<p>Viales Estériles para HPLC.</p>	<p>Menbrane Solutions.</p>	
<p>Tapones de rosca de Acrilonitrilo butadieno estireno</p>	<p>Membrane Solutions.</p>	

2.2.5. Software.

- Chromeleon

2.3. Metododos.

2.3.1. Acopio y trituración de las muestras de quinua.

Para el desarrollo de esta investigación se recolectó tres muestras de tallos de quinua, consiguiendo dos variedades de Quinua que fueron clasificadas y registradas por el INIA⁽⁸⁴⁾. Los tallos de todas las variedades se molieron con ayuda de un molino manual hasta lograr un tamaño de partícula promedio de 0.8 mm.



Figura 14: Tallos de quinua “Huancayo” de la zona Salcedo.



Figura 15: Tallos de quinua “Illpa Inia” de la zona Chucuito.



Figura 16: Tallos de quinua “Salcedo Inia” de la zona Vilque.

2.3.2. Caracterización de las variedades de quinua.

Una vez recolectadas las muestras se procedió a hacer una caracterización con respecto al contenido de celulosa, la lignina, la hemicelulosa, las saponinas, extractivos y las cenizas o compuestos inorgánicos (Tabla 2), conforme a los procedimientos establecidos en la metodología publicada por la *National Renewable Energy Laboratory* (NREL) de los EEUU⁽⁸⁵⁾.

El proceso de caracterización comenzó con la trituración de los fragmentos de tallos de cada una de las variantes (Figura 17). Posterior a la molienda, las muestras de cada variedad fueron analizadas en su contenido de Humedad y pesados en cartuchos de papel para la determinación de extractivos en etanol (97 %) seguido por el mismo tratamiento en agua. Para el análisis de extractivos trabajos con agua y etanol al 96 % como solventes para colorantes naturales, extractivos fenólicos y saponinas, por 6 horas en un sistema de extracción Soxhlet. Los extractos obtenidos fueron analizados posteriormente por sus contenidos fenólicos totales, usando el ácido gálico como muestra estándar, conforme a las metodologías reportadas por Singleton et al.⁽⁸⁶⁾ y Hiai et al.⁽⁸⁷⁾, respectivamente.



Figura 17: Muestras de quinua después del proceso de molienda.

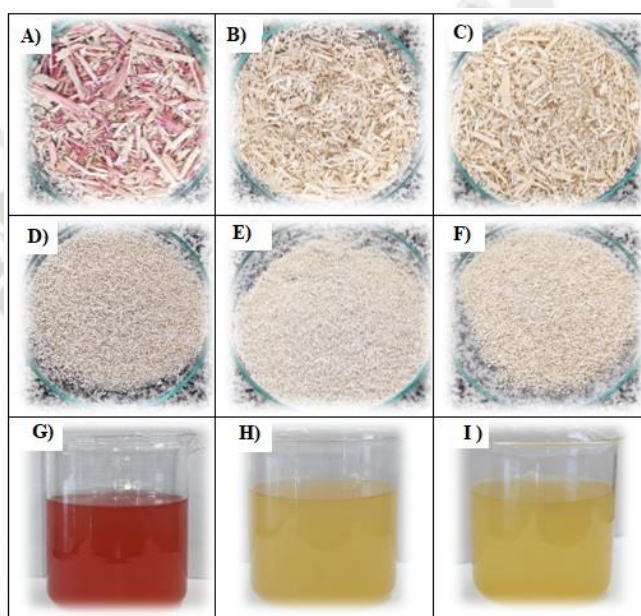


Figura 18: Tallos de quinua de 3 variedades. a), b) y c) corresponden a biomasa natural posterior a la molienda de las variedades Huancayo, Illpa Inia y Salcedo Inia, respectivamente; d), e) y f) corresponden a biomasa sin extractivos; g), h) e i) corresponden a extractos acuosos correspondientes a cada variedad.

2.4. Análisis de lignina soluble e insoluble por hidrólisis acida.

Subsiguiente al proceso de extracción se realizó la determinación de Lignina y Azúcares Reductores Totales. Previamente realizando una hidrólisis ácida a las muestras, con H_2SO_4 al 72 % y determinar 2 tipos de ligninas, la soluble en ácido y la insoluble en ácido reportado por Sluiter et al.⁽⁸⁵⁾.

La determinación de lignina comenzó con la recuperación de 0.3 g de muestra de tallo seco sin extractivos, estos se pesaron en tubos de ensayos y se adicionaron 3 mL de ácido sulfúrico al 72 % y la reacción se mantuvo a 30 °C por 1h Posteriormente, los tubos se lavaron con 84 mL de agua destilada y se

trasvasaron a matraces de 100 mL Estos se llevaron a la autoclave a 121°C por 1 hora. Posteriormente se dejaron enfriar y se filtraron en los crisoles Gooch previamente secados y tarados, el hidrolizado filtrado de se recuperó y se midió en el espectrofotómetro a 240 nm para determinar la lignina soluble en ácido.

Para la medición de lignina insoluble en ácido se usaron los nuevos pesos de los filtros Gooch después de secarlos a 100 °C por día. Finalmente, a este peso se le realizaron las correcciones correspondientes de los materiales inorgánicos que tenemos en las muestras y se unieron las concentraciones del espectrofotómetro con los pesos finales para determinar el porcentaje de lignina por gramo de muestra de quinua.

2.5. Análisis de azúcares reductores totales.

Los azúcares reductores totales se determinaron por reacción con DNS de la muestra hidrolizada recuperada en el proceso de filtración al vacío, para este fin se extrajo el volumen de 1 mL de cada una de las muestras hidrolizadas ácidas y se neutralizaron con carbonato de sodio hasta llegar a un pH entre 7-8. Posterior a esto a las muestras neutralizadas se les agrego 0.5 mL del reactivo DNS y se llevaron a baño María hirviendo por 10 minutos, después se les agregara 3.5 mL de agua destilada y se cuantificaron en el espectrofotómetro a una longitud de 540 nm.

2.6. Remoción de saponina para su posterior uso en la producción de XOS.

Las saponinas presentes en los tallos de quinua de las variedades obtenidas fueron removidas por extracción de dos fases según el procedimiento reportado por Carrasco, et al.⁽⁶⁾. Iniciando con el pesado de 25 g de tallos de quinua y su re suspendieron en 400 mL de agua destilada, la mezcla se agitó a 250 rpm en un shaker con agitación orbital y la temperatura se mantuvo a 35 °C durante 1.5 horas (Figura 19).



Figura 19: Tallos de quinua de 3 variedades, en la primera fase de limpieza de extractivos.

En la segunda etapa de extracción de saponinas, se empleó una mezcla de etanol: agua (50:50) a 100 °C durante 90 minutos. En esta etapa se trabajó con 12 g de material y 500 mL de solvente (Figura 20). El material sólido resultante de ambas extracciones se lavó con agua destilada y se secó para su posterior uso en la producción de XOS por tratamiento hidrotérmico. Para este análisis espectrofotométrico, se utilizó el ácido oleanólico (OA) como estándar, los resultados se expresaron como mg EOA/g de biomasa.



Figura 20: Tallos de quinua de 3 variedades, en la segunda fase de limpieza de extractivos.

2.7. Tratamiento Hidrotermal para la producción de XOS

2.7.1. Tratamiento realizado en Reactor Parr de 2 L.

El tallo de quinua sin saponina se sometió a hidrólisis hidrotérmica en un reactor Parr de 2 L como se observa en la Figura 21. En esta etapa se utilizó 53 g (en base seca) de tallo de quinua en una relación sólido-líquido del 5% manteniendo una agitación de 120 rpm. En esta etapa inicial se evaluó el efecto del tiempo de proceso (0, 5, 10, 15, 20, 30, 45 minutos) a 178 °C sobre la producción de xilooligosacáridos (XOS). En todos los casos fueron necesarios 40 min para alcanzar los 178°C. dentro del reactor. Finalizado el proceso, la fracción sólida se separó por filtración al vacío empleando un papel filtro cualitativo y la fracción líquida se recuperó para el análisis de XOS. El hidrolizado seleccionado con alto contenido en XOS se envió para su posterior proceso de purificación por membrana.



Figura 21: Reactor Parr de 2L donde se realizó el primer diseño experimental de la hidrólisis térmica o auto hidrólisis.

2.7.2 Tratamiento realizado en Reactor Parr de 50 mL.

Para este tratamiento se utilizó quinua de la variedad de “Huancayo” con el mismo pretratamiento que tuvo el material anterior, es decir con el mismo tipo

de limpieza de extractivos y de saponinas, sin embargo, para este tipo de hidrólisis hidrotérmica se trabajó con reactores Parr de 50 mL cómo es observado en la Figura 22, estos reactores no eran tan modernos como los de la fase anterior por lo que se tuvieron que tomar ciertas precauciones en el modelamiento del diseño, la primera de estas modificaciones fueron la cantidad de sólido y líquido que se podía poner por experimento con un máximo de 2.5 g de muestra diluido en 20 mL de agua destilada, otra de las modificaciones fue la temperatura y el tiempo de acción, ya que al no poder contar con un medidor de temperatura interno se consideró el calentamiento de este reactor a $\leq 5^\circ\text{C}/\text{min}$, estimación que se obtuvo por las especificaciones del fabricante.



***Figura 22:** Reactores Parr de 50mL utilizados para la hidrólisis.*

El tratamiento de la muestra por hidrólisis hidro-térmica se optimizó utilizando el diseño Box-Behnken para nuestras variables de temperatura, tiempo y concentración porcentual de Sólido/Líquido (S/L%) considerando como variable de respuesta las concentraciones de xilooligosacaridos de bajo grado de definición (DP)⁽⁸⁸⁾, estas 3 variables fueron las seleccionadas por el impacto que tienen en la recuperación de xilooligosacaridos, sus efectos relativos se estudiaron en el siguiente rango: tiempos de 76-106-136 para temperatura de 170 °C, tiempos de 74-104-134 para temperatura de 180 °C y tiempos de 72-102-132 min para la temperatura de 190 °C. Sin contar el tiempo de

calentamiento del reactor Parr que por especificaciones del fabricante el material de teflón del que esta hecha la celda de hidrolisis tiene una transferencia de calor de ≤ 5 °C/minutos. Por último, se consideró importante el S/L% considerando que mientras más concentrada estuviera la muestra la cantidad de XOS en el líquido recuperado seria mayor, trabajando en un rango de 10,12.5 y 15 %.

El límite superior de temperatura se escogió porque a esa temperatura los xilooligosacaridos en los menores tiempos de tratamiento y en las mayores concentraciones los XOS se degradaban hasta xilosa o derivados ácidos de este. Los tiempos de tratamiento se escogieron porque fueron los que mejores resultados dieron en pruebas anteriores de hidrolisis hidrotérmica. Finalmente, las variables de relación solido/liquido porcentual se establecieron porque fueron las capacidades máximas que nos ofrecía nuestro reactor Parr de 50 mL. La optimización se llevó a cabo utilizando la función de optimización numérica del software Design Expert V12, basándose en la función de deseabilidad, teniendo como objetivo principal el maximizar la concentración de XOS de bajo DP, este mismo modelamiento se confirmó con las lecturas de las muestras recuperadas en el HPLC, muestras que se analizaron en base a la metodología descrita por Iliev et al.⁽⁸⁹⁾, (Tabla 4).

2.8. Purificación de XOS por tecnología de membranas.

El hidrolizado obtenido a los 30 min del proceso hidrotermal se sometió a un proceso de filtración. En primer lugar, se evaluó el efecto del pH (3.6, 4.6, 5.6, 6.6 y 7.6) contra el coeficiente de rechazo, correspondiente al flujo del permeado a través de la membrana y el contenido de xilosa y XOS en el permeado. El pH inicial del hidrolizado fue de 3.6, este valor se ajustó a pH de 4.6, 5.6, 6.6 y 7.6 utilizando hidróxido de sodio (0.25 M), la presión y temperatura se mantuvieron a 30 barr y 20 °C durante el proceso, respectivamente.

Después de escoger el pH con el mejor rendimiento de filtración, el hidrolizado obtenido después de 45 minutos de proceso hidrotermal se sometió a UF

usando Microdyn Nadir, Nadir PM UP010, membrana de polietersulfona (PES), para ultrafiltración (UF) con tamaño del poro (MWCO) nominal de 10 kDa Luego, el permeado se sometió primero a NF-1 utilizando la membrana de lámina plana Microdyn Nadir, NP030, membrana de polietersulfona PES, para nano filtración NF con tamaño del poro MWCO de ~500 Da Finalmente, el permeado obtenido en NF-1 se sometió a un segundo proceso de NF-2 utilizando una membrana de hoja plana (Flat Sheet Membrane), DK, con una capa fina de poliamida (PA-TFC), para una nano filtración (NF) de SUEZ (GE) con tamaño del poro MWCO de ~150-300 Da En todo el proceso, se analizó el contenido de xilosa y XOS en el retenido y permeado para el balance de masa respectivo.

2.9. Identificación y cuantificación de XOS obtenidos por TLC y HPLC.

La identificación cualitativa de los xilooligosacaridos se realizó por medio de una cromatografía en capa fina (TLC) usando placas de sílice gel en donde se insertó la muestra a un centímetro antes de la base y se dejó correr hasta un centímetro antes de llegar al extremo superior, para esta cromatografía la fase móvil fue una mezcla de cloroformo-ácido acético-agua en proporciones de 6:7:1. Finalmente este proceso culminó con el revelado sumergiendo la placa en H_2SO_4 al 5 % diluido en etanol puro y llevándola a estufa por 5 minutos a 100 °C.

Para la identificación de XOS por HPLC se trabajó con el UltiMate™ 3000 Semi-Preparative System de la marca Thermo Scientific™, acoplado además con un detector Knauer RI-Detector RefractoMax 520 de la marca SerCoLab, todo este sistema trabajó con el software Chromeleon™, Chromatography Data System. Para este análisis cada una de las partes del HPLC necesito de una fase acuosa y una fase móvil para transportar la muestra, la fase móvil estuvo constituida por agua ultrapura de grado HPLC que se filtró a través de una membrana de 0.22 μm La fase tampón para los sellos del HPLC estuvo

compuesta por una solución de agua ultrapura – acetonitrilo, en relación de 70:30. Los XOS con DP de 2–6 fueron identificados utilizando el detector las señales de amplitud RID, estas señales marcaron la amplitud del área en base a Unidades de Índice de Reflexión o RIU, con ayuda de una lámpara de Tungsteno.

Para la detección de los XOS por HPLC se usó una pre-columna de 50x7.7 mm para Carbohidratos H⁺ 8µm HypeRez XP y una columna de 300x7.7 mm para Carbohidratos H⁺ 8µm HypeRez XP. A su vez, se emplearon estándares de XOS con DP 2–6 (X2-X6) de Megazyme, Irlanda.

Las condiciones para este tratamiento fueron en aumento desde el Sampler del HPLC, 22 °C y 270 PSI de presión, hasta el horno donde se posicionó la columna previamente acondicionada a 75 °C y 270 PSI para un flujo de muestra final de 0.006 mL. Los estándares usados en la elaboración de la curva de calibración para el análisis de la muestra fueron, xilobiosa (X2), xilotriosa (X3), xilotetraosa (X4), de Megazyme® (Irlanda). Por otro lado, los estándares de xilosa y glucosa que se usaron para la creación de las curvas de calibración se obtuvieron de Sigma Aldrich.

2.10. HPLC de líquidos hidrolizados en el reactor Parr de 50 mL

Las muestras líquidas hidrolizadas en los reactores Parr, se recuperaron y se mantuvieron en refrigeración para evitar la degradación de los azúcares. Para el análisis de muestras se tuvo que centrifugar y filtrar estos hidrolizados recuperados para la eliminación de cualquier fase sólida remanente. Posterior a los líquidos pasaron por filtros de jeringas estériles de polietersulfona (PES), las cuales poseían un diámetro de filtración de 32.99 mm de diámetro, con un tamaño de poro de 0,22 µm, se almacenaron en viales de vidrio (Autosampler Clear Vials) de 2.5 mL de capacidad y se sellaron con tapones azules de Acrilonitrilo butadieno estireno (ABS) para viales de muestra en cromatografía, siguiendo la metodología reportada por Francisco et al.⁽⁹⁰⁾.

2.11. HPLC de líquidos hidrolizados en el reactor Parr de 2 L

Se utilizó una cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) para la cuantificación de xilosa y XOS (X2 a X6) a través de un sistema Dionex DX-500 (Sunnyvale, CA, EE. UU.) con una columna CarboPac PA100 (4× 250 mm) y una precolumna CarboPac PA100 (4×50 mm). El tampón A (NaOH 100 mM) y B (NaOAc 300 mM; NaOH 100 mM<) se usaron como eluyentes con un caudal de 1 mL/min El programa de gradiente fue: 95 % de A y 5 % de B de 0 a 10 min; 0% de A y 100% de B de 10 a 20 minutos; 95% de A y 5% de B de 20 a 25 minutos.

Los monómeros de azúcar se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en el Agilent serie 1200 (Agilent Technologies, Inc., EE. UU.) equipado con un detector de índice de refracción RID-6A y una columna HPX-87H (300 × 7.8 mm) (Bio-Rad, EE.UU.). Las condiciones fueron las siguientes: Temperatura de columna de 45 °C, H₂SO₄ al 0.01 N como fase móvil, velocidad de flujo de 0.6 mL/min y volumen de inyección de 20 µL

2.12. Producción de carotenoides usando el hidrolizado celulósico.

2.12.1. Caracterización e hidrólisis enzimática de material celulósico remanente.

La fracción sólida recuperada después del tratamiento hidrotermal se lavó con agua destilada, se secó y se sometió a una caracterización composicional de acuerdo con la metodología reportada por Sluiter et al.⁽⁸⁵⁾. El índice de cristalinidad (CrI) del tallo de quinua sin tratar y pretratado se analizó utilizando un difractómetro XRD-600 (Shimadzu, Tokio, Japón). El difractómetro de rayos X se ajustó a 40 kV. y 30 mA Las muestras se escanearon en el rango de 2θ = 10–60 ° y el CrI se determinó utilizando la Ecuación 1⁽⁹¹⁾.

$$CrI = \left[\frac{I_{cristalino} - I_{amorfo}}{I_{cristalino}} \right] * 100 \text{ Equation 1}$$

Donde:

CrI: representa el índice de cristalinidad.

Icristalino = Intensidad del difractómetro a 22.3°

Iamorfo = Intensidad del difractómetro a 16.1°

La fracción sólida también se sometió a hidrólisis enzimática al 5 % de carga y se clasificaron gracias al sistema de clasificación biofarmacéutica (SCB) se trabajó en solución de citrato de sodio 50 mM usando una mezcla comercial de enzimas Cellic® CTec2 con una carga de 20 FPU/g de biomasa seca. El proceso se realizó a 50°C y 150 rpm durante 24 horas. El rendimiento de hidrólisis enzimática de la celulosa se calculó considerando la liberación de glucosa en el proceso enzimático. con respecto a la glucosa total liberada después de la hidrólisis química de la biomasa.

2.12.2. Preparación del Inoculo.

El proceso de extracción de carotenoides inició con células de levadura *Rhodotorula glutinis* CCT2186 mantenidas en medio YMA con glucosa (10 g/L), peptona (5 g/L), extracto de levadura (3 g/L), extracto de malta (3 g/L) y agar. Después de esto a las células fueron transferidas a matraces Erlenmeyer (125 mL) que contenían 30 mL de medio semisintético (YM) con la siguiente composición en g/L: glucosa (30), peptona (5), extracto de levadura (3) y extracto de malta (3), y se incubaron en un agitador orbital a 30°C y 150 rpm durante aproximadamente 20 horas. Las células se recuperaron por centrifugación a 2320 de fuerza centrífuga (xg) o 3000 rpm, durante 15 minutos, se lavaron y se re suspendieron en agua con peptona (0,1 %, p/v).

2.12.3. Proceso de fermentación en hidrolizado.

Previamente a las pruebas de fermentación, se estandarizó la concentración inicial de la suma de glucosa y xilosa presente en el hidrolizado a aproximadamente 10 g/L, el pH inicial se ajustó a 5.5 y el hidrolizado se complementó con peptona (5 g/L), extracto de levadura (3 g/L) y extracto de malta (3 g/L). Se esterilizo en condiciones de autoclave a 121°C por 15

minutos, un Erlenmeyer (250 mL) que contenía 60 mL del hidrolizado suplementado. Posteriormente los frascos se inocularon con células de levadura para obtener una concentración celular final de 0,3 g/L estas se incubaron a 30 °C, 150 rpm durante 72 horas. Se recogieron muestras cada dos horas hasta completar las 10 h de crecimiento y después de 24, 48 y 72 horas para análisis de concentración de biomasa celular y consumo de azúcar. Las células recolectadas al final de la fermentación se utilizaron para extraer bio pigmentos y cuantificar los carotenoides. Todos los ensayos de fermentación se realizaron por triplicado.

2.12.4. Extracción de bio pigmentos.

Las muestras recolectadas se centrifugaron para separar las células del medio de cultivo. Los sedimentos celulares se lavaron y secaron a 60 °C durante 48 h Posteriormente se usó 0.1 g de células secas para re-suspensión en 10 mL de solución de NaOH (2 mol/L) y se incubaron en un baño de agua a 100 °C durante 10 min Después, las células fueron centrifugadas y congeladas durante 10hr Los sedimentos se re suspendieron en 10 mL de una solución de metanol: solución de acetona (7:3 v/v) y se homogenizó mediante ultra zonificación durante 10 min para romper las células y extraer el bio pigmento. Los restos celulares se separaron por centrifugación y el sobrenadante (extractos ricos en carotenoides) se recolectó y cuantificó utilizando una curva de calibración de β -caroteno en un espectrofotómetro Eppendorf (Eppendorf AG, Alemania). La cuantificación del bio pigmento se realizó a partir de la identificación de picos en la región entre 350 y 700 nm

CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización Química de los Tallos de Quinoa.

Se caracterizaron los tallos de las variedades de quinoa (*C. quinoa*), los resultados se muestran en la Tabla 3 y 4. Como se observa, el contenido de carbohidratos totales fue mayor en la variedad Huancayo Inia (46,08 %) en comparación con Illpa Inia (45,37 %) y Salcedo Inia (41,81 %). La variedad Illpa Inia tiene 8% y 12% más contenido de hemicelulosa que las variedades de Huancayo y Salcedo Inia, respectivamente. Además, el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina en los materiales están de acuerdo con lo informado previamente para el tallo de quinoa de la variedad real blanca por Carrasco et al.⁽⁶⁾ y otra variedad de quinoa no identificada reportada por Xie et al.⁽⁹²⁾. Por otro lado, los extractivos como pigmentos, azúcares, saponina, fenoles y otros compuestos, fueron más solubles en agua que en etanol principalmente en las variedades Huancayo e Illpa Inia. La concentración de compuestos fenólicos en el extractivo acuoso fue de 7.5, 5.54 y 6 mg de EAG/g de biomasa para las variedades Huancayo, Illpa y Salcedo Inia, respectivamente. Por otro lado, en el extracto etanólico los compuestos fenólicos totales fueron de 4.11, 2.21 y 8.34 mg EAG/g de biomasa para las variedades Huancayo, Illpa y Salcedo Inia, respectivamente. Finalmente, el contenido de saponinas fue de 14, 8 y 17 mg EOA/g de biomasa, valores que se encuentran acorde a lo reportado previamente para tallo de quinoa de la variedad Real Blanca⁽⁵⁾.

Tabla 3. Composición química de los tallos de las 3 variedades de quinoa.

Variedades de quinoa	Cantidad (%)		
	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
Huancayo	30.27 ± 1.24 ^a	15.81 ± 0.67 ^a	18.66 ± 0.42 ^a
Illpa Inia	28.21 ± 0.81 ^a	17.16 ± 0.61 ^b	19.68 ± 0.44 ^b
Salcedo Inia	26.68 ± 1.16 ^b	15.13 ± 0.44 ^a	19.05 ± 0.30 ^b

Tabla 4. Composición química de los tallos de las 3 variedades de quinua.

Variedades de quinua	Cantidad (%)			
	Grupos Acetilos	Extractivos		Cenizas
		Etanol	Agua	
Huancayo	0.24 ± 0.02 ^a	4.11 ± 0.84 ^b	7.49 ± 0.34 ^b	4.69 ± 0.16 ^a
Illpa Inia	0.20 ± 0.08 ^a	2.21 ± 0.114 ^a	5.54 ± 0.67 ^a	3.19 ± 0.10 ^b
Salcedo Inia	0.20 ± 0.06 ^a	8.34 ± 0.26 ^c	6.00 ± 0.99 ^a	3.24 ± 0.15 ^b

Los resultados corresponden al promedio por triplicado ± la desviación estándar. La misma desviación en la columna indica que no hay diferencia según la prueba de rango de Tukey (95% del nivel de confianza).

En la Figura 18, se puede observar el extractivo acuoso de 3 variedades, la variedad Huancayo Inia fue más pigmentada (color rojo), observándose los picos de máxima absorción a 310 y 526 nm cuando fueron medidos en el espectrofotómetro UV-VIS. La pigmentación roja puede estar asociada a la presencia de antocianinas, las cuales son solubles en agua y generalmente se detectan a 525 nm⁽⁹³⁾. Luego de la caracterización de las diferentes variedades, en base al contenido de hemicelulosa y saponina, se seleccionó el residuo sólido de Illpa Inia para su posterior tratamiento hidrotermal con el objetivo de obtener xilooligosacáridos (XOS) que se presenta a continuación.

3.2. Optimización del proceso de auto hidrólisis para producción de XOS.

La influencia de las variables (tiempo, temperatura y relación sólido/líquido) sobre la producción de XOS se evaluó a través de un diseño experimental, Box behnken (Tabla 5), con un total de 12 combinaciones diferentes más 3 puntos centrales para encontrar el rango de los valores se tomaron en cuenta las investigaciones de Carrasco C , Ruiz HA et al. y Gil-Ramirez A et al.

Table 5. Condiciones de hidrolisis térmica en reactor Parr de 50 mL.

Estándar	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Solido/Líquido (%)	Xilosa (X1)mg/g biomasa	Xilobiosa (X2) mg/g biomasa	Xilotriosa (X3)mg/g r biomasa	Azúcares Reductores Totales (mg/mL)
15	180	120	12.5	21.5699	5.7394	0.465	173.12
14	180	120	12.5	11	5.875	0.28377	182.19
13	180	120	12.5	19.3996	7.1465	0.3251	174.7
12	180	150	15	13.6313	5.5553	2.4838	168.206
11	180	90	15	13.5426	4.7523	0.4185	171.051
10	180	150	10	22.6694	6.288	1.1988	139.495
9	180	90	10	5.831	2.3132	0	183.653
8	190	120	15	18.1136	6.2224	0	127.862
7	170	120	15	10.7009	3.5191	0	157.3
6	190	120	10	19.3334	3.0064	0	148.91
5	170	120	10	4.5588	3.9308	0	146.516
4	190	150	12.5	12	0	0	67.47
3	170	150	12.5	13.8494	9.9276	0.4496	168.733
2	190	90	12.5	14.2087	7.761	0	179.141
1	170	90	12.5	1.48	0.3487	0	128

La respuesta en la producción de XOS se ajustó por la interacción cuadrática de los valores respuesta de nuestro diseño experimental (Quadratic), modelo (Ecuación 2) con un valor R-cuadrado de 0.9731. el significado de este modelo (95 % de nivel de confianza) también fue confirmado por p-value(0.0323), el f-value(12.07) y prueba de falta de ajuste (valor $p > 0.05$);

$$Y = 6.04 - 0.5993A + 0.9379B + 0.1701C - 4.56AB + 1.69AC - 0.7930BC - 0.5351A^2 - 0.7651B^2 - 0.5442C^2$$

Equation 2: Ecuación de la recta para la producción de XOS.

Donde Y es la variable respuesta “XOS de bajo DP”; A, B Y C correspondería a valores reales de temperatura (°C), tiempo (min) y concentración S/L (%), respectivamente como se observa en la Figura 23.

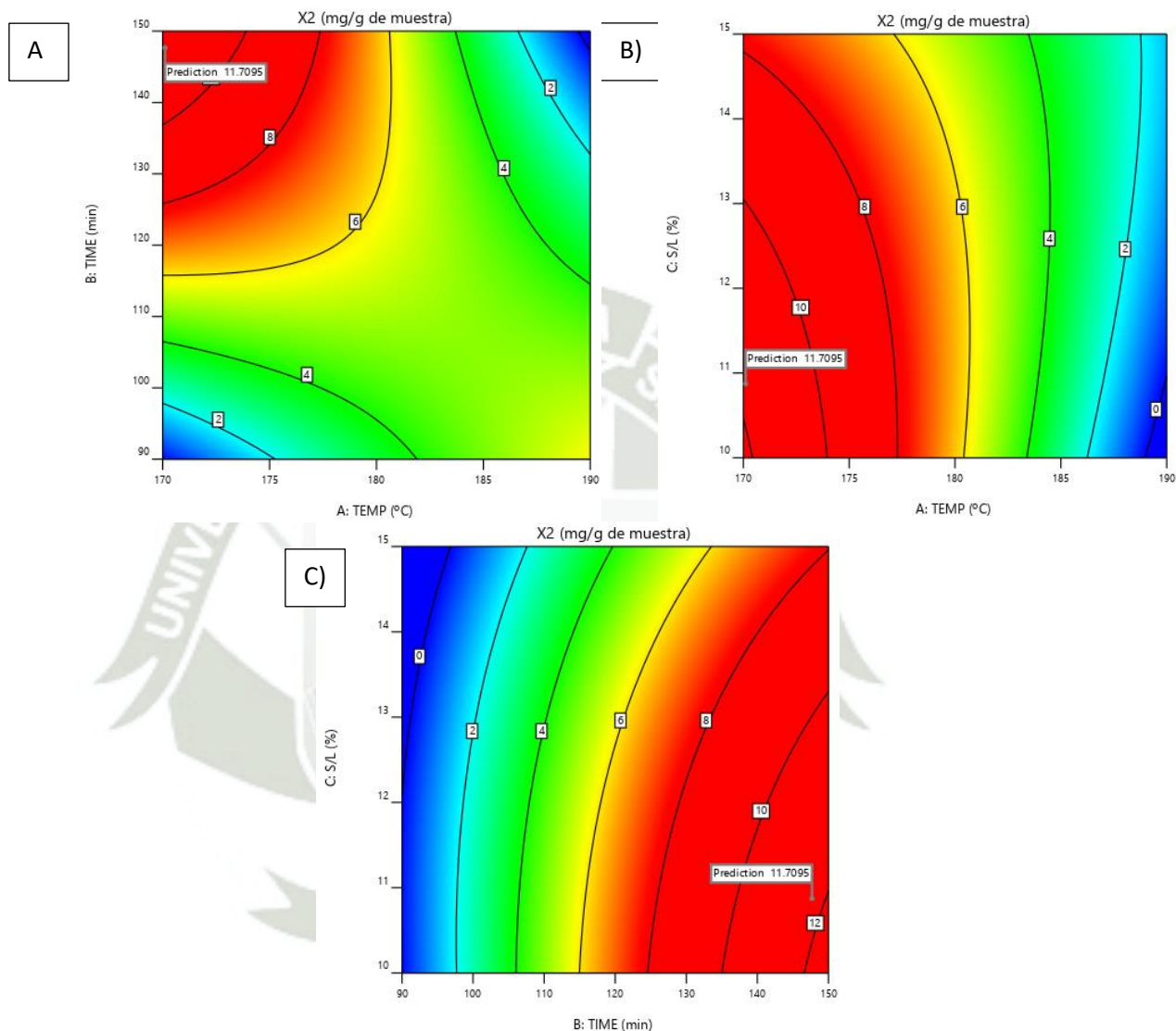


Figura 23: Interacción de las condiciones de hidrolisis en la obtención de XOS; A) Interacción de la Temperatura-Tiempo; B) Interacción de la Temperatura-concentración S/L %; C) Interacción de la concentración S/L %-Tiempo. Nota: En relación a lo observado podemos decir que las mejores condiciones fueron una temperatura de 178 °C, un tiempo de 45 min y una relación sólido líquido del 5% mismas que se usaron para la hidrolisis en el reactor de 2 L.

3.3. Tratamiento hidrotermal para la producción de XOS en reactor Parr de 2L.

Se evaluó la producción de xilooligosacáridos (XOS) a partir de los tallos de quinua mediante el proceso de hidrólisis térmica a 178 °C en diferentes tiempos de tratamiento y los resultados se muestran en la Figura 24. Como se esperaba, la producción de xilosa aumentó con el tiempo de hidrólisis alcanzando 14 mg/g de material seco en 45 min. Con respecto a los xilooligosacáridos de bajo peso molecular (X2 y X3), la mayor producción se logró a los 30 min, pero no fue muy diferente a los 10 min. Además, el tiempo adecuado para una mayor producción de X4 fue de 20 min.

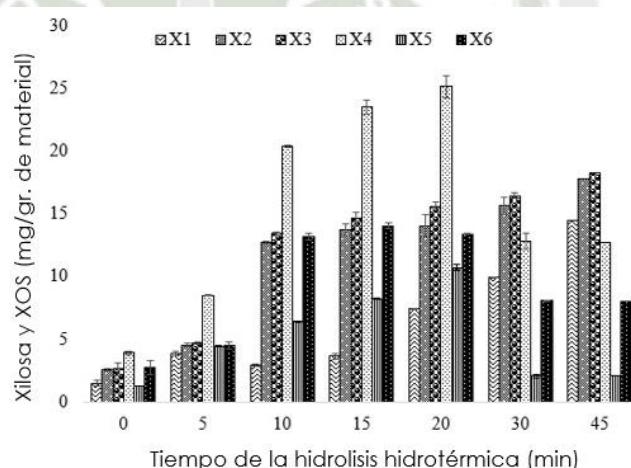


Figura 24: Producción de xilosa y xilooligosacáridos a 178 °C y 10 bar en reactor Parr a diferentes tiempos de retención. Nota: Esta grafica muestra la relación porcentual de los mg de los XOS obtenidos los datos cuantitativos fueron dados por HPLC y relacionados con la materia prima tratada.

En el proceso de auto hidrolisis, los iones de hidrogeno generados y el ácido acético liberado como producto de la hidrólisis de la hemicelulosa contribuyen a la reducción en el grado de polimerización de las cadenas de hemicelulosa en fracciones con menor grado de polimerización, por ejemplo, en la muestra tratada durante 45 min se logró una producción de 1.6 g/L de ácido acético y el pH del hidrolizado fue alrededor de 3.6.

La producción por procesos de auto hidrólisis a partir de residuos de quinua no fue previamente reportada, siendo este el primer trabajo. Sin embargo, el resultado obtenido puede ser comparado con lo informado anteriormente para la producción de XOS a partir de bagazo de caña de azúcar mediante el proceso

de auto hidrólisis por Zang et al.⁽⁹⁴⁾, donde el rendimiento máximo 14.68 g/L de XOS se logró a 175 °C durante 30 min, pero a altas temperaturas como 185 °C fue requerido apenas 10 minutos de iniciado el proceso. En otro trabajo se determinó como condición optimizada (170 °C por 50 min) para la producción de XOS a partir de aserrín de álamo⁽¹²⁾, obteniéndose 8.0 g de XOS de bajo DP por cada 100 de biomasa seca tratada. Los XOS también se obtuvo a partir de cáscara de semilla de mango mediante tratamiento de hidrólisis en condiciones optimizadas (180 °C, 2,5 MPa. y 15 min) logrando 393,44 mg XOS/g de xilano⁽⁹⁵⁾.

La hidrólisis es una tecnología verde y rentable para el tratamiento de biomasa lignocelulósica con el objetivo de producir XOS, una vez que el proceso tiende a actuar selectivamente sobre la hemicelulosa y una parte de la lignina⁽¹²⁾. Sin embargo, condiciones drásticas podrían producir compuestos indeseables como furfural y sus derivados, productos de deshidratación y transformación a xilosa durante la exposición continua al calor y ambientes de bajo pH. De esta forma, el hidrolizado obtenido a los 30 y 45 min mostró presencia de furfural en concentraciones de 0.19 y 0.44 g/L, respectivamente. Por lo tanto, este estudio es el primer informe para la producción de XOS a partir de tallos de quinua por hidrólisis en un reactor Parr y más estudios necesarios con el objetivo de establecer las mejores condiciones para producir una alta concentración de XOS evitando la formación de degradados y xilosa que podría dificultar el proceso posterior.

3.4. Analisis de XOS analizados por técnicas de HPLC.

El análisis de las muestras hidrolizadas de los reactores Parr, se cuantificaron en HPLC, las cantidades se midieron según la amplitud y la intensidad de las curvas bajo la recta, se siguieron los mismos parámetros, métodos de purificación y fases móviles que se usaron con los patrones, que se prepararon y analizaron a diferentes concentraciones de patrones para tener un mayor rango en el análisis de nuestras muestras.

En líquido hidrolizado resultado de las condiciones óptimas se lograron cuantificar un total de 9.325 mg/g de muestra tratada de xilotriosa y 10.248 mg/g de muestra tratada de xilobiosa, esta fue una primera evaluación de la

muestra previo a la fase de purificación por membranas, por lo que se logró identificar además una masa más grande que las 2 anteriormente mencionada que estaría compuesta por partículas de xilobiosa, xilotriosa, xilotetraosa, xilopentanososa y xilohexosa (Figura 25), esta fase inicial se tomó como patrón y evidencia de la obtención de nuestros xilooligosacaridos a partir de tallos de quinua.

En el análisis inicial por HPLC se tuvieron resultados muy por debajo de lo que se estimaron, de xilobiosa se obtuvo un rendimiento del 0.1% y de xilotriosa 0.9% sin embargo y después del proceso de purificación por membranas se llegó a obtener un rendimiento mejor que el reportado Su Y.⁽¹²⁾, donde reportaron un rendimiento del 4% de X2 y 2.5% de X3 en donde además se trabajó con una hidrólisis enzimática además se obtuvo un mejor resultado que lo reportado por Samala A.⁽⁹⁶⁾ en donde el rendimiento de X2 fue del 4.4% y de 2.55% de X3, este resultado fue de una autohidrólisis en muestras residuales de maíz. Al final y luego de la purificación y separación por membranas se llegó a obtener un resultado de 7.9% de X2 y de 7.6% de X3 como se puede ver en la Figura 27.

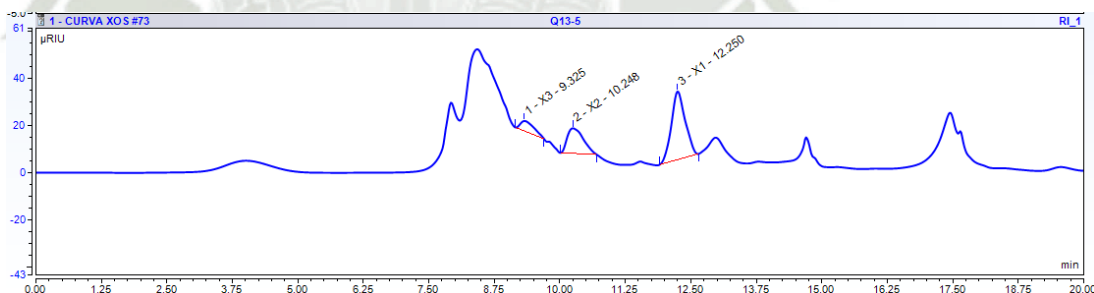


Figura 25: Primer análisis de la hidrólisis optimizada por HPLC. Nota: Esta gráfica fue obtenida gracias al software Chromeleon que estaba enlazado con el HPLC donde se leyeron las muestras, las curvas de la gráfica representan las concentraciones de xilosa, xilobiosa y xilotriosa.

3.5. Purificación XOS usando membrana.

El hidrolizado obtenido a los 30 min del proceso se sometió a ultrafiltración a diferentes pH y los resultados se muestran en la Figura 26. Como se observa en la Figura 26A, la mayor concentración de xilosa, X2, X3 y X4 en el permeado a través de la membrana MF a Se obtuvo 35 bar de presión y 20 °C a pH alto. Además, el flujo de permeado a través de la membrana en los primeros 10 min fue en promedio de 2.1, 1.9 y 1.8 mL/min para pH 6.6, 7.6 y

5.6, respectivamente. Por otro lado, a pH 3.6 y 4.6 se logró un bajo flujo de permeado que fue en promedio de 0.9 y 1.3 mL/min, respectivamente. Un aumento en el pH de las soluciones para las membranas poliméricas las cargó más negativamente saturándolas y volviéndolas hidrofílicas, lo que permitió un alto flujo de permeado, un fuerte rendimiento antiincrustante y una disminución de la retención de moléculas sin carga, por ejemplo, xilosa y XOS. Adicionalmente, valores altos de pH modifican la matriz de la membrana que estaría en un estado más expandido atribuido a una mayor repulsión electrostática intra membranal⁽⁹⁷⁾. Si bien, el efecto del pH en UF para la purificación de XOS aún no se ha informado previamente, pero está de acuerdo con trabajos previos informados para la decoloración de melaza de caña de azúcar⁽⁹⁸⁾, clarificación de jugo de piña (*Ananas comosus*, L. Merrill)⁽⁹⁹⁾ y ultrafiltración de jugo de caña de azúcar⁽¹⁰⁰⁾.

En el retenido obtenido después de la UF también se analizó el contenido de xilosa y XOS y los resultados se muestran en la Figura 26B. Como era de esperarse, a pH bajo se observó alta retención de azúcares y XOS, por otro lado, a pH de 6.6 y 7.6, la retención de producto fue baja. Otra observación relevante en el retenido fue la intensidad del color que era más oscuro, véase la Figura 27, este comportamiento podría atribuirse a la repulsión electrostática entre la membrana y los pigmentos, principalmente cargados negativamente a un pH alto, lo que da como resultado una polarización de concentración más débil y, en consecuencia, una adsorción menos hidrofóbica de los pigmentos en la membrana^(97,98). Se observó un comportamiento similar durante la filtración de melaza diluida con una membrana UF de poliamida de 2 kDa prístina⁽⁹⁸⁾.

El hidrolizado obtenido después de 45 min (que contenía más xilosa y XOS) fue seleccionado y sometido a UF (10 kDa) y NF (500 Da y luego 150~300 Da) a pH previamente definido como óptimo (6.6) y el resultado se muestra en la Figura 27. Como se observa, el 44% del total de productos (X1-X6) se obtuvo en el líquido permeado a través de membrana Microdyn Nadir UP010 con MWCO nominal de 10 kDa a pH 6.6, 35 bar de presión y 20 °C; sin embargo, el 56% de los productos se encuentran en el retenido, lo que requiere

un proceso de diafiltración adicional agregando agua destilada con el objetivo de recuperar el XOS en el lado del permeado.

Además, será necesario un proceso de optimización de variables como presión, temperatura y pH. En el segundo paso del proceso sería basado en membranas, el permeado obtenido de UF se sometió a NF (~500 Da), logrando en el permeado solo el 25% del producto total (X1-X6) alimentado en el proceso de NF; sin embargo, con 50% de pureza (X2-X6). Con respecto a la segunda NF (hasta 150~300 Da), en el retenido se obtuvo el 70% del total de productos (X1-X6) y la pureza de XOS fue del 56%. La concentración de XOS (X2 a X6) lograda después de NF-2 fue de 1.26 g/L, que fue inferior a lo informado por el proceso de Oliveira et al.⁽¹⁰¹⁾. En ese trabajo, se obtuvieron 3.7 g/L de LMW XOS, 20.9 % de pureza y 46 % de rendimiento después de un sistema basado en membrana en serie, usando NP030 seguido de TS40 y un proceso adicional de diafiltración de 1 vez.

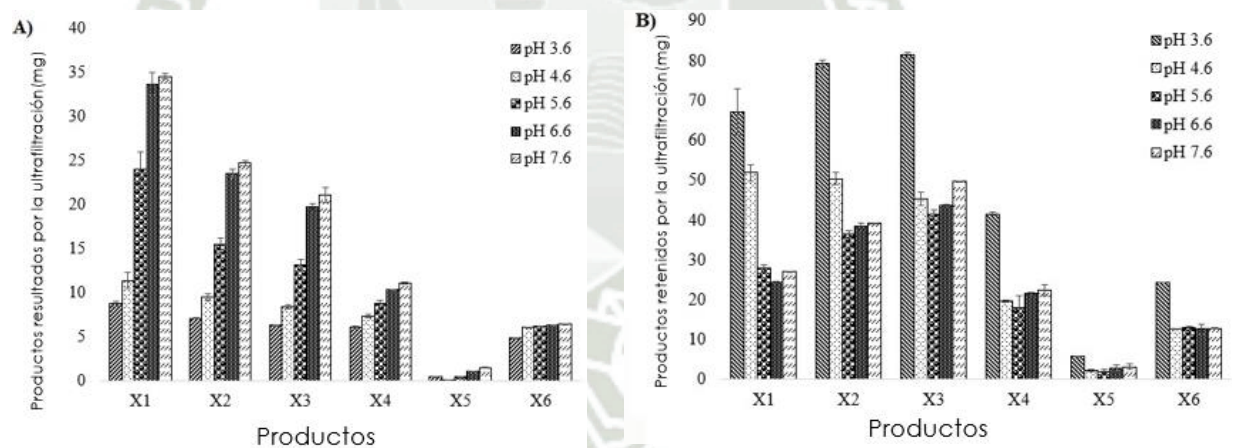


Figura 26: Proceso de Ultra y nanofiltración con membranas para la purificación de xilooligosacáridos (XOS) a partir de hidrolizado de tallos de quinua. A) contenido de XOS en el permeado y B) contenido de XOS en el retenido. Nota: se probaron diferentes niveles de pH para evaluar la permeabilidad de nuestros XOS, las concentraciones en mg también se evaluaron por cuantificación con HPLC.

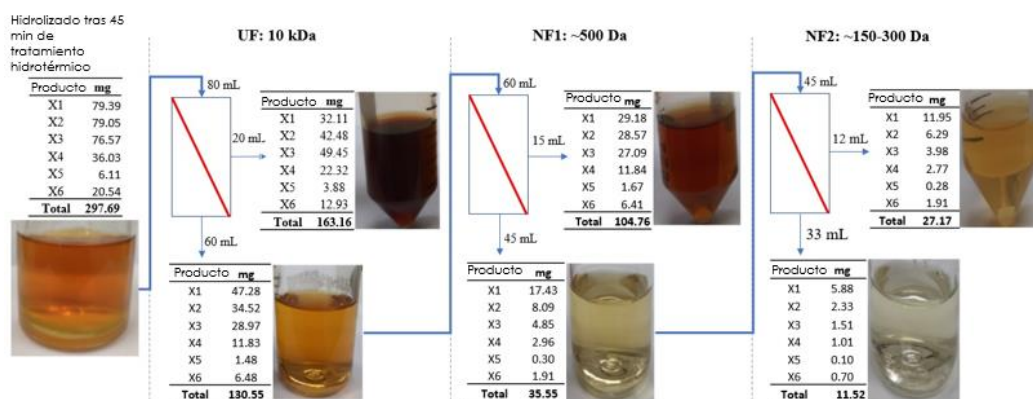


Figura 27: Filtración secuencial por membranas de UF y NF para la purificación de xilooligosacáridos (XOS) a líquidos hidrolizados por 45 min de tallos de quinua.

UF:10kDa: Donde la primera fase del retentado tubo un 80.31% de pureza de XOS.

NF1:500Da: Nanofiltración 1 donde el retentado tubo un 72.15% de pureza de XOS.

NF2:150-300Da: Nanofiltración 2 donde el retentado tubo un 56.02% de pureza de XOS entre xilobiosa-xilohexosa. Nota: Se presenta así la filtración secuencial de los líquidos, se conservaron los retentados para purificación secuencial y los permeados para continuar con la filtración la cuantificación se hizo por HPLC y el software chromeleon.

3.6. Composición de sólidos residuales e hidrólisis enzimática.

El residuo sólido obtenido después del proceso de hidrólisis fue analizado en su composición con el objetivo de producir azúcares fermentables para la producción de carotenoides y los resultados se muestran en la Tabla 7. Como se observa, el contenido de celulosa en el material sometido solo a rampa de calentamiento hasta 178 °C aumentó en un 28% con respecto al contenido inicial de celulosa en el tallo de quinua sin extractivo, además, el alto contenido de celulosa (promedio 52%) se logró después de 20 min de tratamiento a 178 °C Sin embargo, como era de esperar, en 45 min de tratamiento a 178 °C alrededor del 54 % de la hemicelulosa se hidrolizó en xilosa y XOS. La remoción de hemicelulosa en el material por efecto del tratamiento térmico volvió el material más cristalino lo cual fue confirmado por el análisis del índice de cristalinidad (%IC) (Tabla 6). El índice de cristalinidad del material tratado durante 45 min en el reactor Parr (178 °C) aumentó en un 60 % con

respecto al tallo de quinua sin extractivos⁽¹⁰²⁾. Los resultados están de acuerdo con los informados anteriormente para el pretratamiento hidrotérmico por (Nitsos et al., 2012), aunque con otros tipos de materiales, por ejemplo, madera de haya, tableros de fibra, aglomerados y bloques (Zhao et al., 2020)⁽¹⁰³⁾.

Además, la eliminación de la hemicelulosa, el tratamiento hidrotérmico también elimina parcialmente la lignina, provocando una reubicación parcial de la lignina, esta aumenta el área superficial y la porosidad del material, lo que se refleja en la alta susceptibilidad del material (celu lignina) a la acción de las enzimas (Tabla 8). Como se observa, los azúcares totales que se liberaron (glucosa y xilosa) aumentaron con el tiempo del proceso, lográndose en el material tratado (45 min a 178 °C), en promedio 589 g/Kg de celu lignina que corresponden al 99% del rendimiento de hidrólisis de celulosa por la mezcla de enzimas de celulasa. Además de la celulosa, la hemicelulosa residual también fue hidrolizada por la enzima, esto se debe a la presencia de hemicelulasas en la mezcla de enzimas como se informa en la ficha técnica comercial. Sin embargo, la concentración de xilosa disminuyó con el tiempo de proceso lo cual está de acuerdo con el bajo contenido de hemicelulosa en el material. En general, el material residual después del proceso de hidrólisis se puede utilizar para la producción de azúcares fermentables y la posterior producción de carotenoides.

Tabla 6. Caracterización de residuos sólidos tras hidrólisis hidrotermal.

Muestras / Tiempo de tratamiento en PARR	Composición (%)			Índice de Cristalinidad (%)
	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina	
0 min	45.32 ± 3.60 ^a	18.26 ± 1.60 ^a	25.70 ± 0.30 ^a	35.90
5 min	50.17 ± 1.45 ^a	14.51 ± 0.31 ^b	27.60 ± 0.50 ^{ab}	43.26
10 min	51.21 ± 1.01 ^a	13.30 ± 0.28 ^{bc}	29.20 ± 1.60 ^{bc}	41.98
20 min	52.85 ± 2.54 ^a	12.00 ± 0.34 ^{bcd}	32.00 ± 0.51 ^{cd}	46.89
30 min	51.34 ± 1.46 ^a	11.07 ± 0.65 ^{cd}	35.57 ± 0.71 ^{de}	46.92
45 min	51.04 ± 3.68 ^a	9.08 ± 0.19 ^d	34.97 ± 0.87 ^e	46.12
Control sin extractivos y sin tratamientos térmicos	35.548 ± 1.37	19.88 ± 0.75	21.11 ± 0.48	28.75

Tabla 7. Azúcares totales liberados obtenidos después del tratamiento hidrotérmico de tallos de quinua.

Tiempo de retención (min) at 178 °C	Contenido de azúcares en el hidrolizado (g/Kg de biomasa tratada)	
	Glucosa	Xilosa
Al natural (sin ningún tratamiento)	46.04 ± 1.38 ^a	22.02 ± 5.04 ^a
0	296.96 ± 33.87 ^b	119.05 ± 13.46 ^c
5	344.23 ± 41.63 ^{bc}	98.29 ± 11.33 ^{bc}
10	365.75 ± 43.62 ^{bcd}	90.29 ± 12.54 ^{bc}
15	394.37 ± 43.22 ^{bcd}	82.94 ± 11.48 ^{bc}
20	450.61 ± 37.44 ^{cde}	87.07 ± 9.00 ^{bc}
30	506.63 ± 32.53 ^{de}	81.50 ± 4.60 ^{bc}
45	514.76 ± 46.73 ^e	74.31 ± 6.16 ^b

Los resultados corresponden al promedio de triplicados ± desviación estándar. La misma desviación en la columna indica que no hay diferencia según la prueba de rango de Tukey (95 % del nivel de confianza).

Tabla 8. Rendimiento de hidrólisis de celulosa en los sólidos residuales obtenidos después del tratamiento hidrotérmico de tallos de quinua.

Tiempo de retención (min) at 178 °C	Azúcares fermentables totales (g/Kg de biomasa tratada)	Rendimiento de hidrólisis de celulosa (%)
Al natural (sin ningún tratamiento)	68.06 ± 6.42 ^a	13.62 ± 0.54 ^a
0	416.01 ± 47.33 ^b	65.52 ± 7.47 ^b
5	442.52 ± 52.95 ^c	69.74 ± 6.70 ^{bc}
10	456.04 ± 56.16 ^d	73.22 ± 5.97 ^{bc}
15	477.31 ± 54.69 ^e	80.16 ± 4.47 ^{cd}
20	537.69 ± 46.44 ^f	87.64 ± 3.73 ^{cd}
30	588.12 ± 37.13 ^e	97.10 ± 4.10 ^d
45	589.07 ± 52.90 ^e	99.00 ± 1.41 ^d

Los resultados corresponden al promedio de triplicados ± desviación estándar. La misma desviación en la columna indica que no hay diferencia según la prueba de rango de Tukey (95% del nivel de confianza).

3.7. Producción de carotenoides usando hidrolizado celulósico.

El hidrolizado enzimático obtenido fue utilizado para la producción de carotenoides por *Rhodotorula glutinis* CCT2186 y los resultados se muestran en la Figura 28. Como se observa, la glucosa y la xilosa fueron consumidas simultáneamente durante la fermentación por *R. glutinis*, en la condición de

fermentación, logrando así 4.1 mg de carotenoides /g (peso de células secas) de carotenoides y 6.27 mg de carotenoides/g de azúcar total consumido, además de esto se alcanzó una tasa máxima de crecimiento (μ_{max}) de 0.32 min⁻¹

¹ El resultado obtenido es ligeramente superior a 1.3 mg de β -caroteno/g de células obtenidas utilizando hidrolizado de biomasa lignocelulósica como fuente de carbono en un biorreactor de circulación de aire de circuito interno, como lo hizo (Hong-Wei Y., 2014), donde llego a obtener 20 g de biomasa después de las 72 horas de crecimiento con los mismos azúcares reductores como fuente de carbono⁽¹⁰⁴⁾. Considerando este estudio como un primer reporte sobre el uso de tallos de quinua para la producción de carotenoides, se requerirá optimizar el proceso. Además, los inhibidores presentes en hidrolizados ácidos como furfural, ácido acético y 5-HMF también podrían ser metabolizados por *R. glutinis* y podrían tener un mejor resultado, ya que (Brandenburg, J. et al., 2021) llego a obtener 18 g de biomasa por L de medio suministrado con lípidos y xilosa después de 24 horas y (Liu, Y. et al., 2015) produjo 16 g de biomasa en 60 horas de cultivo^(105,106). Los resultados obtenidos en la investigación y presentados en la Figura 28 presento que podemos obtener 16 g de biomasa pasadas las 48 horas de crecimiento con el líquido hidrolizado como fuente de carbono en el medio, esto se puede comparar a los resultados anteriormente reportados sin embargo sus inhibidores presentaron cierta complicación en el desarrollo de las levaduras. Por lo tanto, los trabajos futuros podrían centrarse en el uso de hidrolizado no detoxificado de tallo de quinua directamente principalmente para la producción de carotenoides y lípidos.

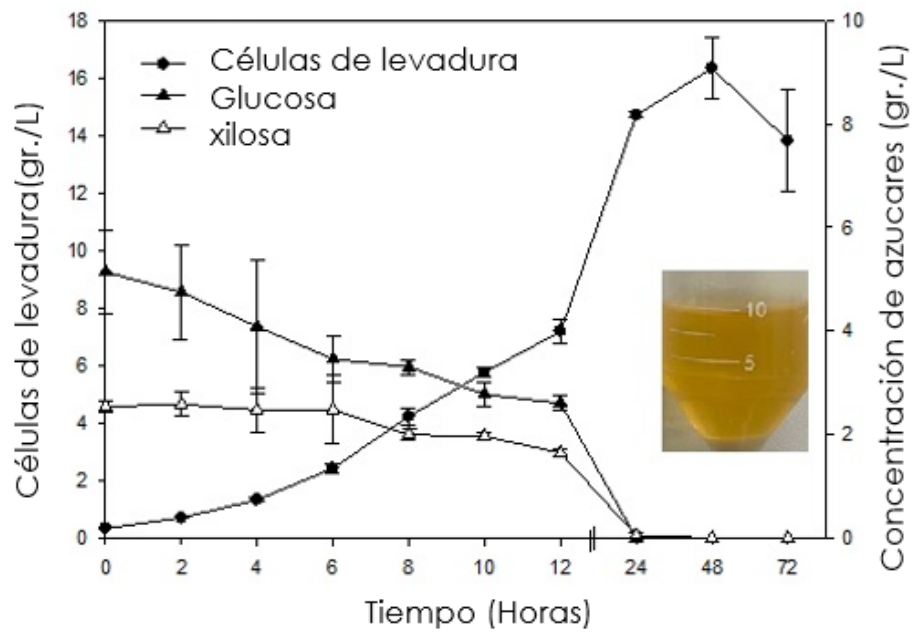


Figura 28: Producción de pigmentos carotenoides por *R. Glutinis* utilizando hidrolizado enzimático de celulosa del tallo de quinua pretratado en proceso hidrotermal. Nota: En esta imagen se ven las concentraciones en gr/L que se producen de *R. Glutinis* y gracias a las curvas de calibración con carotenos entendimos que se produjeron 20.8mg de carotenoides como máximo resultado.

CONCLUSIONES

➤ Conclusión General:

Se logro valorizar los desechos agroindustriales de la quinua por procesos biotecnológicos haciendo la recuperación de carbohidratos de alto valor comercial en forma de xilooligosacaridos.

➤ Primera:

Se logro caracterizar con éxito la composición química de las 3 variedades de quinua con las que se trabajaron, por consiguiente, la variedad Illpa Inia sería la escogida para la fase de hidrolisis por presentar un 28.21% de celulosa, 17.16% de hemicelulosa, 5.54% de extractivos totales y 3.19% de cenizas, presentando más hemicelulosa y menos extractivos y cenizas que las demás.

➤ Segunda:

Se evaluaron los rangos óptimos con ayuda del sistema estadístico Box Bekhen y las influencia que tienen las variables de temperatura, tiempo y relación solido/liquido, escogiendo al final la hidrolisis hidrotérmica del reactor de 2 litros por su mejor eficiencia para la obtenicon de xilooligosacaridos presentando 7.9% del total en xilobiosa y 7.6% de xilotriosa.

➤ Tercera:

Gracias a la ultrafiltración y nanofiltración secuencial por membrana se purifico el hidrolizado, consiguiendo en el retenido de la segunda nanofiltración un 56% de pureza de XOS de alto valor comercial.

➤ Cuarta:

El sólido residual mostró una alta susceptibilidad a la acción enzimática liberando una alta concentración de azúcares fermentables, lo que fue utilizado con éxito para la producción de carotenoides usando *R. Glutinis* logrando obtener hasta 20 mg/L de carotenos.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda principalmente a las entidades nacionales de agricultura como el Minagri, INIA, PETT, entre otras a presentar estas nuevas tecnologías como alternativas para el tratamiento de residuos agroindustriales, buscando frenar la contaminación ambiental que estos provocan.
- Se recomienda analizar de manera productiva la actividad de los XOS como prebióticos en diferentes alimentos de consumo general como yogures o cereales.
- Se recomienda a las industrias textiles promulgar las investigaciones sobre la obtención de carotenos por levaduras.
- Se recomienda de forma general seguir estudiando a la quinua y sus concentraciones de hemicelulosa y su composición química.
- Se recomienda además, tratar con los residuos de caña de azúcar, arroz, maíz y cebolla que son los que presentan más porcentaje de hemicelulosa, para difundir este tipo de tratamientos y valorizaciones comerciales con la finalidad de disminuir el impacto ambiental que estos generan.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Pathan S, Siddiqui RA. Nutritional Composition and Bioactive Components in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Greens: A Review. 2022.
2. Herrera Tarifa LD, Rojas Arcani CF [coaut], Gemio Siñani R [tutor]. Modificación de la molecula de celulosa obtenida a partir de tallos de quinua y su propuesta de aplicación industrial. 2017.
3. Salas-Veizaga DM, Bhattacharya A, Adlercreutz P, Stålbrand H, Karlsson EN. Glucuronosylated and linear xylooligosaccharides from Quinoa stalks xylan as potential prebiotic source for growth of *Bifidobacterium adolescentis* and *Weissella cibaria*. LWT. 2021 Dec 1;152.
4. Salas-Veizaga DM, Villagomez R, Linares-Pastén JA, Carrasco C, Álvarez MT, Adlercreutz P, et al. Extraction of glucuronoarabinoxylan from quinoa stalks (*chenopodium quinoa* willd.) and evaluation of xylooligosaccharides produced by GH10 and GH11 xylanases. J Agric Food Chem. 2017 Oct 4;65(39):8663–73.
5. Gil-Ramirez A, Salas-Veizaga DM, Grey C, Karlsson EN, Rodriguez-Meizoso I, Linares-Pastén JA. Integrated process for sequential extraction of saponins, xylan and cellulose from quinoa stalks (*Chenopodium quinoa* Willd.). Ind Crops Prod. 2018 Oct 1;121:54–65.
6. Carrasco C, Jönsson LJ, Martín C, Hydrothermal C, Editors A, Scoma A, et al. Hydrothermal Pretreatment of Water-Extracted and Aqueous Ethanol-Extracted Quinoa Stalks for Enzymatic Saccharification of Cellulose. 2021.
7. Palaniappan A, Antony U, Emmambux MN. Current status of xylooligosaccharides: Production, characterization, health benefits and food application. Trends Food Sci Technol. 2021 May 1;111:506–19.
8. Santibáñez L, Henríquez C, Corro-Tejeda R, Bernal S, Armijo B, Salazar O. Xylooligosaccharides from lignocellulosic biomass: A comprehensive review. Carbohydr Polym. 2021 Jan 1;251.
9. Gullón B, Eibes G, Dávila I, Moreira MT, Labidi J, Gullón P. Hydrothermal treatment of chestnut shells (*Castanea sativa*) to produce oligosaccharides and antioxidant compounds. Carbohydr Polym. 2018 Jul 15;192:75–83.
10. Neto FSPP, Roldán IUM, Galán JPM, Monti R, de Oliveira SC, Masarin F. Model-based optimization of xylooligosaccharides production by hydrothermal pretreatment of Eucalyptus by-product. Ind Crops Prod. 2020 Oct 15;154.

11. Ruiz HA, Conrad M, Sun SN, Sanchez A, Rocha GJM, Romaní A, et al. Engineering aspects of hydrothermal pretreatment: From batch to continuous operation, scale-up and pilot reactor under biorefinery concept. *Bioresour Technol.* 2020 Mar 1;299.
12. Su Y, Fang L, Wang P, Lai C, Huang C, Ling Z, et al. Efficient production of xylooligosaccharides rich in xylobiose and xylotriose from poplar by hydrothermal pretreatment coupled with post-enzymatic hydrolysis. *Bioresour Technol.* 2021 Dec 1;342.
13. Farias Kovac C, Gratta F, Ocasio Vega C, Feijoo D, Tejeiro C, Nicodemus Martín N, et al. Efecto de la suplementación con xilo-oligosacáridos en el agua de bebida y del nivel de fibra soluble del pienso sobre los parámetros productivos y digestivos en conejos en crecimiento. 44 Symposium de Cunicultura Libro de actas. Aranda de Duero, España. 2019.
14. Liu Z, Natalizio F, Dragone G, Mussatto SI. Maximizing the simultaneous production of lipids and carotenoids by *Rhodospiridium toruloides* from wheat straw hydrolysate and perspectives for large-scale implementation. *Bioresour Technol.* 2021 Nov 1;340.
15. Liu Z, Feist AM, Dragone G, Mussatto SI. Lipid and carotenoid production from wheat straw hydrolysates by different oleaginous yeasts. *J Clean Prod.* 2020 Mar 10;249.
16. Marca Vilca S, Espinoza E, Poblete Vidal A. Multiplicación de semilla de variedades y ecotipos de quinua en valle de majes-Arequipa. *Revista Investigaciones Altoandinas*, ISSN 2306-8582, ISSN-e 2313-2957, Vol 17, N° 3, 2015.
17. Becerra Sanchez JJ, Moreyra Muñoz JC, Pari Capa E, Acosta Reátegui Jenny Miriam, Sánchez Noel K, Galarreta Laurel LR. Observatorio de las Siembras y Perspectivas de la Producción Quinua; Dirección general de políticas agrarias . 2022.
18. Mónica MR, Øllgaard B, Kvist LP, Borchsenius F, Balslev H. *Botánica económica de los andes centrales* editado por. 2006;
19. Villacrés E, Peralta E, Egas L, Mazón N. *Potencial agroindustrial de la quinua.* 2011.
20. Zegarra Molina E. Cusco expandió sus niveles de producción y se posicionó como la tercera región productora de quinua en el 2021.
21. Gómez L, Enrique P, Castellanos A. *Guía de cultivo de la quinua.* 2016.
22. Pinedo-Taco R, Gómez-Pando L, Julca-Otiniano A. Sustainability of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) production Systems. *Ecosistemas y recursos agropecuarios.* 2018.

23. Luis Alberto Peña Serrano IM, Milton Celiano Ortiz Terán IM, Edgar Alonso Merino Peñafiel IM. Evaluación de Diferentes Niveles de Desecho de Quinua en la Etapa de Crecimiento y Engorde de Cuyes. 2011 Jun 28.
24. Javier F, Félix A. Development of optimization strategies. Case: Product Quinua. Revista Perspectivas. 2013.
25. Calcina Cuchuirumi GF. Digestibilidad y Valor energético de Residuos de Quinua “JIPI” en Cuyes. Universidad Nacional del Altiplano. 2016.
26. Carlos Nieto IC, Carlos Vimos I. INIAP-Estación Experimental Santa Catalina. La quinua, cosecha y poscosecha algunas experiencias en Ecuador. 1992;
27. Marca Vilca S, Chaucha W, Juan J, Quispe C, Vladimir Q, Centón M. Desarrollo de Capacidades de la Cadena Productiva de Quinua en la Región Puno; Perú. 2011.
28. Passera CB, Cavagnaro JB, Sartor C elena. Plantas C3; C4 y CAM nativas del Monte árido argentino, adaptaciones y potencial biológico. C4 y CAM Características generales y uso en programas de desarrollo de tierras áridas y semiáridas Homenaje al Dr Julio López Gorgé. 2020.
29. Ragauskas AJ, Williams CK, Davison BH, Britovsek G, Cairney J, Eckert CA, et al. The Path Forward for Biofuels and Biomaterials. Science (1979). 2006 Jan 27.
30. Velasco Cristancho APatricia. Una revisión general de los procesos para la producción de bioetanol de segunda generación a partir de biomasa lignocelulosa. 2020;
31. Canché-Escamilla G, de Los Santos-Hernández JM, Andrade-Canto S, Gómez-Cruz R. Obtención de Celulosa a Partir de los Desechos Agrícolas del Banano. Informacion Tecnologica. 2005;16(1):83–8.
32. Cuervo L, Folch-Mallol JL, Estela R, Castañeda Q. Lignocelulosa Como Fuente de Azúcares Para la Producción de Etanol. 2009.
33. de Los Ángeles Martínez M, Arana A, Román A, Tovar X, Tellez A, Mercado Y. Producción enzimática de azúcares reductores a partir de la hemicelulosa de paja de cebada. 2015;
34. Pasini F. Aporte de compuestos Químicos por las Barricas. 2022.
35. Grilli D, Egea V, Paez Lama S, Carcaño D, Allegretti L, Escudero MS, et al. Degradation and utilization of hemicellulose from species forage by Pseudobutyrvibrio ruminis and Pseudobutyrvibrio xylanivorans. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo. 2015;47(2):231–43.

36. Elyzabeth R, Astete J. Validación de la metodología para la determinación de Lignina celulosa y Hemicelulosa por espectroscopia infrarroja en árboles. 2021.
37. Farhat W, Venditti R, Quick A, Taha M, Mignard N, Becquart F, et al. Hemicellulose extraction and characterization for applications in paper coatings and adhesives. *Ind Crops Prod.* 2017 Nov 15;107:370–7.
38. Encinas Soto K. Determinación del mecanismo de hidrólisis ácida de hemicelulosa de *Cenchrus ciliaris*. 2016.
39. Cheng H, Zhan H, Fu S, Lucia L. Alkali extraction of hemicellulose from depithed corn stover and effects on soda-aq pulping. *Bioresources.* 2011.
40. Peng F, Peng P, Xu F, Sun RC. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. *Biotechnol Adv.* 2012 Jul 1;30(4):879–903.
41. Canché-Escamilla G, de Los Santos-Hernández JM, Andrade-Canto S, Gómez-Cruz R. Obtención de Celulosa a Partir de los Desechos Agrícolas del Banano. *Información tecnológica.* 2005.
42. Sanz Tejedor A. *Química Orgánica Industrial.* 2019.
43. Gutarra J, Johana Garcia Gonzalez L. Tratamiento de residuos líquidos de la industria de celulosa y textil. 2001;
44. Martínez Yepes PN, Guarnizo Franco A, Valencia Sánchez HA. Biomass and cellulose pretreatments for saccharification. 2009.
45. Grabber JH. How Do Lignin Composition, Structure, and Cross-Linking Affect Degradability. A Review of Cell Wall Model Studies. *Crop Sci.* 2005 May 1.
46. Mateus Fontecha, Lady. Evaluación de los pretratamientos con ácido sulfúrico diluido y AFEX en la biomasa lignocelulósica del tipo pasto gigante “*Pennisetum Sp.*” 2011.
47. Ralph J. Hydroxycinnamates in lignification. *Phytochemistry Reviews* 2009 9:1. 2009 Aug 11.
48. Ralph J, Lundquist K, Brunow G, Lu F, Kim H, Schatz PF, et al. Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl- propanoids. *Phytochemistry Reviews* 2004 3:1. 2004 Jan.
49. Maceda A, Soto-Hernández M, Peña-Valdivia CB, Trejo C, Terrazas T. Lignin: composition, synthesis and evolution. *Madera y Bosques.* 2021 Jun 1;27(2).
50. Chávez-Sifontes M, Domine M.; Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial lignin, structure and applications: depolymerization methods for

- obtaining aromatic derivatives of industrial interest. Vol. 4, Av. cien. ing. Chávez-Sifontes & Domine; 2013.
51. Belko AA. [Polifeban in complex therapy of calves at gastroenteric diseases]. (Belarus) Scientific Papers of the Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine 2007.
 52. Cruz R, Dopico D, Figueredo J, Rodríguez M, Martínez G. Uso de la Lignina de Bagazo con fines medicinales. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 1997.
 53. García L., Abajo C., del Campo J., Mitjans M., Marrero E., Vinardell M. Antioxidant effect of ligmed-a on humane erithrocytes in vitro. 2006;
 54. Carpio Paucar GN, Palo Cardenas AI. Evaluación de la actividad citotóxica de saponinas y sapogeninas provenientes de residuos de *Chenopodium quinoa* willd. sobre Líneas celulares SH-Sy5H, HeLa A549 y HepG2. Universidad Católica de Santa María. 2020 Dec 1.
 55. Peñafiel CE. Evaluación de ácido oleanólico en tres flujos extractivos de quinua (*Chenopodium quinoa* willd.) por cromatografía gaseosa. 2022.
 56. Bonilla H, Carbajal Y, Gonzales M, Vásquez V, López A. Determinación de la actividad insecticida de la saponina de la quinua (*Chenopodium quinoa*) en larvas de *Drosophila melanogaster*. Scientia Agropecuaria. 2019.
 57. Ahumada A, Ortega A, Chito D, Benítez R. Saponinas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.): un subproducto con alto potencial biológico. Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéutica. 2016.
 58. Zuñiga Y, Rebolledo C. SAPONINAS: Saponinas. 2015.
 59. Guzmán AM, Fernández AM, Franco Y, Bautista JH, Rodríguez Páez JE. Estudio de las reacciones de hidrólisis y condensación del titanio en presencia de acetilacetona. 2007;
 60. Nino Lopez L, Acosta Cardenas A, Gelves Zambrano R. Evaluation of chemical pretreatments for enzymatic hydrolysis of lignocellulosic residues cassava (*Manihot esculenta* Crantz). scielo.org.co. 2013.
 61. Camarero S, Ruiz-Dueñas FJ, Prieto A, Martínez MJ, Martínez ÁT. Biodegradación de la lignocelulosa: una fuente de biocatalizadores para una industria sostenible. 2018.
 62. Valladares Diestra KK, Porto de Souza Vandenberghe L, Soccol CR. A biorefinery approach for enzymatic complex production for the synthesis of xylooligosaccharides from sugarcane bagasse. Bioresour Technol. 2021 Aug 1.
 63. Valls C, Javier Pastor FI, Vidal T, Roncero MB, Díaz P, Martínez J, et al. Antioxidant activity of xylooligosaccharides produced from glucuronoxylan

- by Xyn10A and Xyn30D xylanases and eucalyptus autohydrolysates. *Carbohydr Polym.* 2018 Aug 15.
64. Martins Oliveira S. Inmovilización y estabilización de endoxilanasas de *trichoderma reesei*. Producción de xilo-oligosacaridos por hidrólisis enzimática de xilano. 2017.
 65. Samala A, Srinivasan R, Yadav MP, Kim TJ, Prewitt L. Xylo-oligosaccharides production by autohydrolysis of corn fiber separated from ddgs. *Bioresources.* 2012 May 29.
 66. Benítez Casanova L. Caracterización de las principales enzimas celulolíticas de *myceliophthora thermophila* implicadas en la degradación de biomasa lignocelulósica y mejora de la hidrólisis de hemicelulosa para la producción de bioetanol de segunda generación. 2017 Nov 24.
 67. Carvalho AFA, Neto P de O, da Silva DF, Pastore GM. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. *Food Research International.* 2013 Apr 1;51(1):75–85.
 68. Henríquez Ramírez CV, Salazar Aguirre MO. Caracterización de la hidrólisis enzimática de xilano mediante herramientas experimentales y modelación en el marco de la producción de xilo-oligosacáridos. 2021.
 69. Alvarez Castillo A, Salgado Delgado R, García Hernández E, Domínguez Domínguez MM, Granandos Baez JM, Aguirre Cruz A, et al. Aprovechamiento integral de los materiales lignocelulósicos Composites from Metallic nanoparticles (Ag or Cu) / PLLA View project Specialized elastomer for advanced and sustainable polymer modified asphalt applications View project. 2012.
 70. Acevedo Ramos AR, Eisner Sagiús F, Ossa Izquierdo C, Zanocco Loyola A. Identificación de barnices en pintura de caballete por cromatografía en placa fina (TLC) y espectroscopía infrarroja (FTIR). 2003.
 71. Kharbade B v., Joshi GP. Thin-layer chromatographic and hydrolysis methods for the identification of plant gums in art objects. 2013 May 1.
 72. Camus P RM. Evaluation of a thin layer chromatography technique of high resolution [HPTLC] to measure sorbitol levels in white and red wines. 1993.
 73. Valls C, Pastor FIJ, Vidal T, Roncero MB, Díaz P, Martínez J, et al. Antioxidant activity of xylooligosaccharides produced from glucuronoxylan by Xyn10A and Xyn30D xylanases and eucalyptus autohydrolysates. *Carbohydr Polym.* 2018 Aug 15;194:43–50.
 74. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC–MS/MS. *Anal Chem.* 2003 Jul 1.

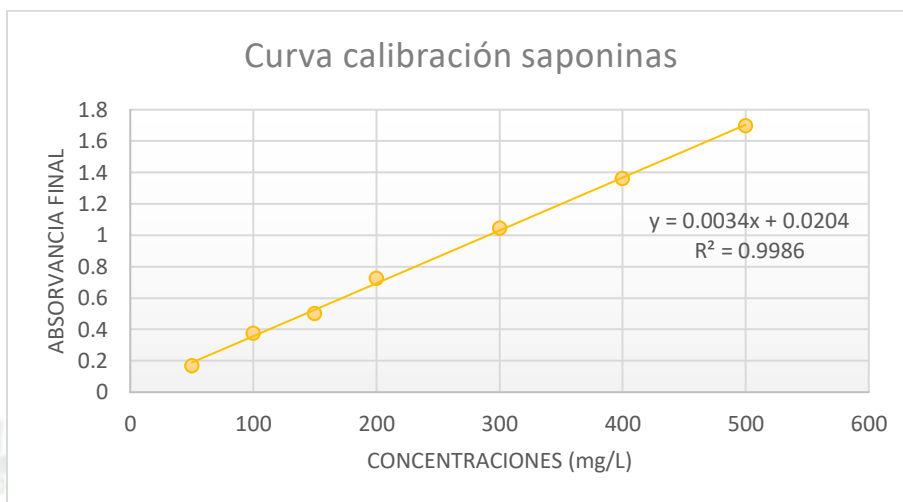
75. Samala A, Srinivasan R, Yadav MP, Kim TJ, Prewitt L. Xylo-oligosaccharides production by autohydrolysis of corn fiber separated from ddgs. *Bioresources*. 2012 May 29.
76. Brotons V, Romero G, Luisa M, Gómez Marisa C, Esteve Édgar P, Puigdollers Cristina B, et al. Separación por membranas. 2017.
77. Luisa MCM. Filtración por membrana. 20 de julio 2020.
78. Soto Diaz A. Aplicación de la tecnología de membranas de nanofiltración y ósmosis inversa para el tratamiento de disoluciones acuosas de compuestos fenólicos y ácidos carboxílicos.
79. Vaquerizo CÁ, Vaquerizo CÁ. Producción de xilooligosacáridos y bioetanol a partir de paja de cebada mediante procesos enzimáticos. Evaluación de su actividad prebiótica. 2020.
80. Ben-Shaul Y, Klein S. Development and Structure of Carotene Bodies in Carrot Roots.
81. C. SVV, S AFV, G CAM, B LDC, C EO, Ramírez-Castrillón M. Producción de carotenoides en levaduras nativas aisladas de sistemas acuáticos en Cali, Colombia. *Revista de la asociación colombiana de ciencias biológicas*. 2020 Oct 30.
82. Miguel Bouzas T de. Nuevas fuentes microbianas de carotenoides. 2000.
83. Frengova G, Simova E, Beshkova D. Caroteno-protein and exopolysaccharide production by cocultures of *Rhodotorula glutinis* and *Lactobacillus helveticus*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 1997.
84. Apaza Mamani V, Cáceres Sanizo G, Estrada Zúniga R, Pinedo Taco RE. Catálogo de variedades comerciales de quinua en el Perú. Instituto Nacional de Innovación Agraria. 2013.
85. Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, et al. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass Laboratory Analytical Procedure (LAP) Issue Date: 7/17/2008.
86. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic*. 1965;16(3).
87. Hiai S, Oura H, Hamanaka H, Odaka Y. A color reaction of panaxadiol with vanillin and sulfuric acid. *Planta Med*. 1975.
88. Box GEP, Behnken DW. Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables. *Technometrics*. 1960;2(4):455–75.
89. Iliiev I, Vasileva T, Bivolarski V, Momchilova A, Ivanova I. Metabolic Profiling of Xylooligosaccharides by *Lactobacilli*. 2020.

90. Javier Preciado Gutiérrez F, Ernesto Ramírez Orozco R. Caracterización de suero fetal bovino obtenido de la industria cárnica para cultivo celular. Ciencias De La Salud Departamento De Medicina. 2022 May 23.
91. Segal L, Creely JJ, Martin AE, Conrad CM. An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. 2016 Jul 2.
92. Xie W, Ren Y, Jiang F, Liang J, Du S kui. Pretreatment of quinoa straw with 1-butyl-3-methylimidazolium chloride and physiochemical characterization of biomass. Renew Energy. 2020 Feb 1;146:1364–71.
93. Aguilera Ortíz M, del Carmen M, Vargas R, Chew Madinaveitia RG, Meza Velázquez JA. Propiedades funcionales de las antocianinas. Biotecnia. 2011 Aug 30.
94. Zhang X, Zhang W, Lei F, Yang S, Jiang J. Coproduction of xylooligosaccharides and fermentable sugars from sugarcane bagasse by seawater hydrothermal pretreatment. Bioresour Technol. 2020 Aug 1;309.
95. Monteiro CRM, Ávila PF, Pereira MAF, Pereira GN, Bordignon SE, Zanella E, et al. Hydrothermal treatment on depolymerization of hemicellulose of mango seed shell for the production of xylooligosaccharides. Carbohydr Polym. 2021 Feb 1;253.
96. Samala A, Srinivasan R, Yadav M. Comparison of xylo-oligosaccharides production by autohydrolysis of fibers separated from ground corn flour and DDGS. Food and Bioproducts Processing. 2015 Apr 1;94:354–64.
97. Mänttari M, Pihlajamäki A, Nyström M. Effect of pH on hydrophilicity and charge and their effect on the filtration efficiency of NF membranes at different pH. J Memb Sci. 2006 Sep 1;280(1–2):311–20.
98. Guo S, Luo J, Wu Y, Qi B, Chen X, Wan Y. Decoloration of sugarcane molasses by tight ultrafiltration: Filtration behavior and fouling control. Sep Purif Technol. 2018 Oct 2;204:66–74.
99. de Carvalho LMJ, de Castro IM, da Silva CAB. A study of retention of sugars in the process of clarification of pineapple juice (*Ananas comosus*, L. Merrill) by micro- and ultra-filtration. J Food Eng. 2008 Aug;87(4):447–54.
100. Balakrishnan M, Dua M, Bhagat JJ. Effect of operating parameters on sugarcane juice ultrafiltration: Results of a field experience. Sep Purif Technol. 2000 Jul 1;19(3):209–20.
101. Oliveira MG de, Forte MBS, Franco TT. A serial membrane-based process for fractionation of xylooligosaccharides from sugarcane straw hydrolysate. Sep Purif Technol. 2022 Jan 1;278.

102. Nitsos CK, Matis KA, Triantafyllidis KS. Optimization of Hydrothermal Pretreatment of Lignocellulosic Biomass in the Bioethanol Production Process. *ChemSusChem*. 2013 Jan 1.
103. Zhao P, Wang N, Yao M, Ren H, Hu W. Hydrothermal electrodeposition incorporated with CVD-polymerisation to tune PPy@MnO₂ interlinked core-shell nanowires on carbon fabric for flexible solid-state asymmetric supercapacitors. *Chemical Engineering Journal*. 2020 Jan 15;380.
104. Yen HW, Chang JT. Growth of oleaginous *Rhodotorula glutinis* in an internal-loop airlift bioreactor by using lignocellulosic biomass hydrolysate as the carbon source. *J Biosci Bioeng*. 2015 May 1;119(5):580–4.
105. Brandenburg J, Blomqvist J, Shapaval V, Kohler A, Sampels S, Sandgren M, et al. Oleaginous yeasts respond differently to carbon sources present in lignocellulose hydrolysate. *Biotechnol Biofuels*. 2021;14:124.
106. Liu Y, Wang Y, Liu H, Zhang J. Enhanced lipid production with undetoxified corn cob hydrolysate by *Rhodotorula glutinis* using a high cell density culture strategy. *Bioresour Technol*. 2015 Mar 1;180:32–9.

ANEXOS.

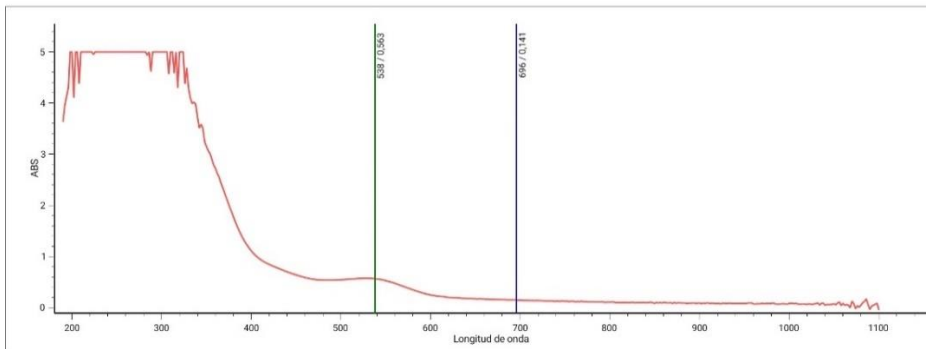
- **ANEXO : CURVA DE CALIBRACION DE ACIDO OLEANOLICO(Usada para la medición de saponinas).**



- **ANEXO : ESPECTRO DEL LOS COROLORANTES EXTRAIDOS DE LAS VARIETADES DE QUINUA.**

Barrido_27_06_2022_19:01:37 1 / 1
 27-jun.-2022 07:32 p. m. N.º serie del instrumento: 9A5X354048
 Nombre del método: Barrido 27-jun.-2022 Modelo instrumento: GENESYS 150
 Método creado: 27-jun.-2022 07:00 p. m. Versión de paquete de software: 2.3 Firma:
 Método actualizado: 27-jun.-2022 07:00 p. m.

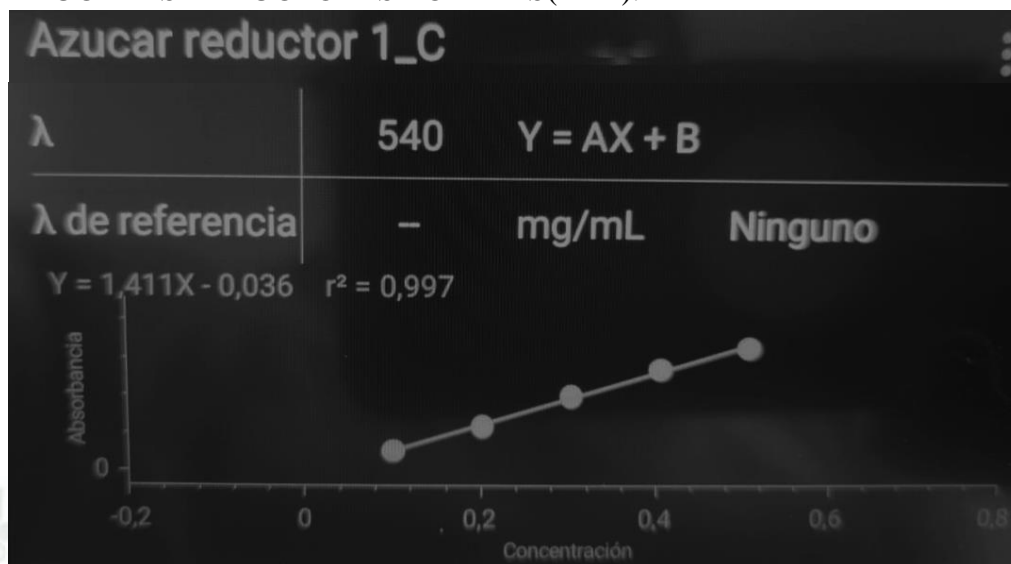
Barrido:parámetros de método	
Intervalo de longitud de onda	190 - 1100 nm
Intervalo	2,0 nm
Velocidad	Rápida



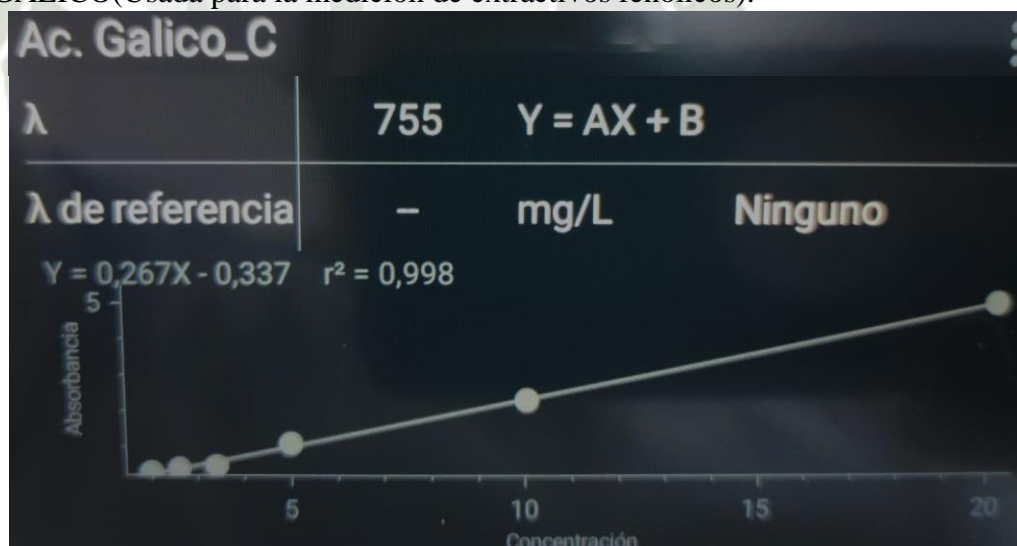
Ejemplo	ABS(696)	ABS(538)
Ejemplo 2	0,141	0,563

Espectro de absorción en la región visible de los pigmentos extraídos de los desechos de quinua, variedad Huancayo(quinua roja).

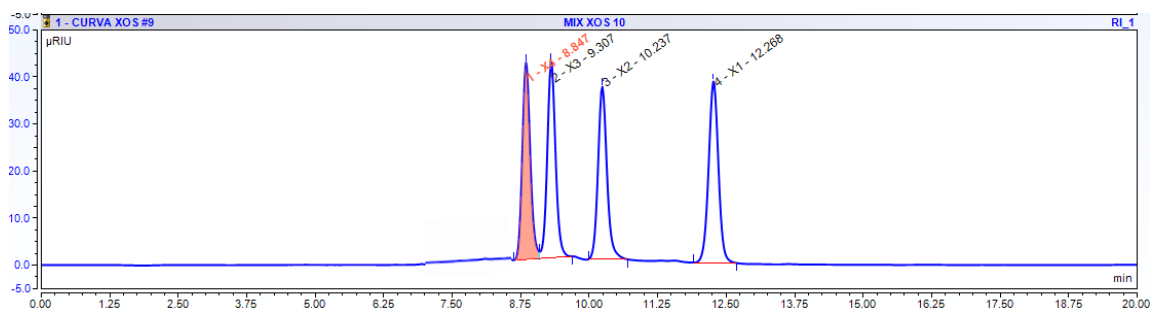
- **ANEXO** : CURVA DE CALIBRACION PARA LA MEDICION DE AZUCARES REDUCTORES TOTALES(ART).



- **ANEXO** :CURVA DE CALIBRACION PARA LA MEDICION DE ACIDO GALICO(Usada para la medición de extractivos fenólicos).



- **ANEXO** : CURVA DE CALIBRACION PARA LA MEDICION DE XOS(Usado para la cuantificación de xilooligosacaridos cuantificando por amplitud bajo la curva).



- **ANEXO** : Artículo científico “*Carbohydrates valorization of Quinoa (Chenopodium quinoa) stalk in xylooligosaccharides and carotenoids as emergent biomolecules*” publicado en la revista “*Industrial Crops and Products*”



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Industrial Crops & Products

journal homepage: www.elsevier.com/locate/indcrop



Carbohydrates valorization of Quinoa (*Chenopodium quinoa*) stalk in xylooligosaccharides and carotenoids as emergent biomolecules

Fernando E. Rosas Vega^a, Salvador Sanchez Muñoz^b, Igor Severo Gonçalves^c, Félix Terán Hilares^d, Thércia Rocha Balbino^b, Marcus B. Soares Forte^c, Silvio Silvério da Silva^b, Júlio C. dos Santos^b, Ruly Terán Hilares^{a,*}

^a Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, Universidad Católica de Santa María—UCSM, Urb. San José s/n—Umachillo, Arequipa 04000, Peru

^b Department of Biotechnology, Engineering School of Lorena, University of São Paulo (EEL-USP), 12.602.810, Lorena, SP, Brazil

^c Department of Food Engineering and Technology, Faculty of Food Engineering, University of Campinas (UNICAMP), Monteiro Lobato Street, 80-Zeferino Vaz, Campinas, São Paulo 13083-862, Brazil

^d Laboratorio de Investigación Agroindustrial, Universidad Nacional José María Arguedas, Av. 28 de Julio N° 1103, Talavera—Santa Rosa, Andahuaylas 03701, Peru

ARTICLE INFO

Keywords:

Quinoa stalk
Xylooligosaccharides
Carotenoid
Prebiotic
Circular bioeconomy

ABSTRACT

Quinoa (*Chenopodium quinoa*) stalk (QS) is an unvalued and renewable lignocellulosic waste. Aiming to its valorization, autohydrolysis process (178 °C and 10 bar) for xylooligosaccharides (XOS) production and enzymatic hydrolysate of residual solid for carotenoids production by *Rhodotorula glutinis* were evaluated. The highest yield of XOS (79 mg/g of biomass) containing mainly xylotetraose (X4) to xylohexaose (X6) was achieved in 20 min of process, while high xylobiose (X2, 18 mg/g of QS) and xylotriose (X3, 18 mg/g of QS) contents were observed in 45 min. In ultrafiltration-UF using membrane with nominal MWCO of 10 kDa, higher permeate flux was observed at pH 6.6 than at lower pH values (3.6, 4.6, and 5.6). In the retentate after nanofiltration-NF (150–300 Da), 56 % of total XOS (X2–X6) was recovered. Finally, 4.1 mg of carotenoids/g of dry cells weight, corresponding to 6.27 mg of carotenoids/g of total sugar consumed, were produced by the yeast using residual solids hydrolysate. Therefore, quinoa stalk was shown as an interesting source for high value biomolecules production.

1. Introduction

Quinoa (*Chenopodium quinoa*) is one of the gluten-free grains extensively cultivated in Andean countries of South America, and it is considered as a “superfood” due to its nutritional properties (high quantities of protein, essential amino acids, essential minerals and vitamins) and health benefits (Pathan and Siddiqui, 2022). Currently, about 57 % of world production of quinoa is from Peru, achieving 106,643 ton in 2021, value 6.4 % higher than 2020 (MIDAGRI, 2022). An increase in the quinoa production leads to an increase in the amount of quinoa waste in the form of stems and branches, since the only part used is the grain, which correspond to 20 % of the total weight of the crop. Therefore, it is estimated that about 470,000 tons of quinoa crop residue, mainly stalk, are produced every year. Currently, the quinoa stalk is used as firewood, but in small amounts, and the rest degrades naturally in agricultural fields.

Quinoa stalk is composed mainly by carbohydrate fraction (cellulose and hemicellulose), lignin and saponin; however, the composition is variable according to variety. Although valorization of quinoa stalk was recently reported, it was limited only to enzymatic route for xylooligosaccharides (XOS) production using glucuronarabinoxylan extracted from quinoa stalk by alkaline method (Salas-Veizaga et al., 2021, 2017). Moreover, quinoa stalk was used for sugar production by enzymatic hydrolysis of cellulose fraction after sulfuric-acid-catalyzed hydrothermal pretreatment (SA-HTP) (Carrasco et al., 2021). Therefore, there is a knowledge gap regarding processing of this important waste aiming to its valorization, requiring studies to evaluate possibilities of its use as raw material for suitable and high value products production, as XOS and carotenoids.

XOS are xylose-based oligomers comprising 2–10 D-xylose residues linked via β -1,4-glycosidic bonds (Huang et al., 2022a, 2022b), and those ones with less than 4 monomers (X2-xylobiose, X3-xylotriose,

* Corresponding author.

E-mail address: rteran@ucsm.edu.pe (R. Terán Hilares).

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116274>

Received 20 November 2022; Received in revised form 5 January 2023; Accepted 10 January 2023

Available online 18 January 2023

0926-6690/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

X4-xyloetraose) are considered important and emergent prebiotics due to their selective stimulation of probiotic species, such as *Bifidobacteria* sp. (Palaniappan et al., 2021). In addition to its status as prebiotic, these carbohydrates also have other characteristics that increase their industrial appeal, e.g., resistance to heat, acidic tolerance, low-calorie value and sweetening power, which turn XOS more suitable for ideal ingredients for functional foods (Santibáñez et al., 2021). XOS can be produced from hemicellulosic fraction from different lignocellulosic materials, including agro-industrial wastes, using chemical, enzymatic processes or a combination of both strategies. Autohydrolysis or hydrothermal process has been used for XOS production from different lignocellulosic biomass (Gullón et al., 2018; Neto et al., 2020), but not yet from quinoa stalk. In the autohydrolysis, the ionization of water produces hydronium ions which lead to the depolymerization of polysaccharides through selective hydrolysis of heterocyclic ether bonds and cleavage of acetyl groups (Lu et al., 2016; Yang et al., 2018); moreover, the cleavage of acetyl groups releases organic acids which catalyze the hydrolysis of hemicellulose fraction allowing significant amounts of XOS with a low polymerization degree (DP) (Ruiz et al., 2020; Su et al., 2021). This method is considered environmentally friendly and cost-efficient due to its simple utilization of pressurized hot water as the extraction solvent, and some advantages correspond to simple operation, relatively short treatment time, low cost, and low corrosion to equipment (Huang et al., 2022a, 2022b).

The purity of XOS have powerful impact on the biological function (Huang et al., 2019); therefore, purity higher than 75 % is required for food application. In this way, the most promising downstream strategy for the industrial manufacture of high-purity XOS correspond to membrane separation (Santibáñez et al., 2021), as previously reported for XOS purification obtained by autohydrolysis of almond shells (Nabarlatz et al., 2007), and obtained from sugarcane straw hydrolyzed liquor (SSHL) after pre-treatment by deacetylation followed by hydrothermal process (Oliveira et al., 2021). Although ultrafiltration (UF) and nanofiltration (NF) have been previously reported for XOS production, considering the variability in the composition of hydrolysate obtained in different conditions and from different materials, filtration condition cannot be generalized, requiring to evaluate specific conditions for each case. Factors such as the pore size dispersion of the selected membranes, and the operational conditions of filtration such as tangential flow, temperature and pressure, influence the filtration performance.

Cellulose fraction is the main carbohydrate remaining in the material after XOS production by autohydrolysis process. This material is susceptible to enzyme action, releasing fermentable sugars mainly glucose and xylose in low concentration, which can be used for biomolecules production like carotenoids. Furthermore, the use of low-cost substrate can lower the production costs and at the same time mitigating the disposal problem of agricultural activities. Several works have been reported for carotenoids production, e.g., carotenoids were produced by *Rhodospiridium toruloides* in medium containing enzymatic *Camelina sativa* meal hydrolysate (Bertacchi et al., 2021). Besides, lipid and carotenoid production by *L. starkeyi* and *R. toruloides* from wheat straw hydrolysates (Liu et al., 2020), and lipids and carotenoids by *Rhodospiridium toruloides* from wheat straw hydrolysate (Liu et al., 2021), were reported.

The objective of this work was the valorization of carbohydrate fractions of quinoa stalk. Initially, the autohydrolysis process for XOS production from quinoa stalk was evaluated; then, some parameters in membrane filtration were assessed aiming to obtain XOS with high concentration; finally, the residual solid after autohydrolysis process was enzymatically hydrolyzed and used for carotenoids production.

2. Material and methods

2.1. Chemicals and quinoa stalk

Quinoa stalk of 3 varieties (Huancayo Inia, Illpa Inia and Salcedo

Inia) were collected from agricultural fields in the Puno region in 2022 crop (April-May/2022), the coordinates of the crops were: Huancayo Inia (15.880091 S – 70.001161 W), Illpa Inia (15.8904980 S – 69.8921100 W), and Salcedo Inia (15.764678 S – 70.261029 W). The stalk was sun dried and ground using a manual mill to an average particle size of 0.8 mm, and then were used for the experiments. Standards of xylobiose (X2), xylotriose (X3), xyloetraose (X4), xylopentaose (X5) and xylohexaose (X6), were purchased from Megazyme® (Ireland). Standards of xylose and glucose were obtained from Merck & Co., Inc. Cellulase blend Cellic® CTec2 with 102 FPU/mL of enzyme activity was purchased from Merck & Co., Inc. All other chemicals were from analytical or microbiological grade (for microorganism cultivation), and were purchased from Merck & Co., Inc.

2.2. Characterization of quinoa stalk

The quinoa stalk of 3 varieties were characterized in relation to their main components as extractives, cellulose, hemicellulose, lignin and ash. For extractives, the material was sequentially treated firstly with distilled water, and then with ethanol (97 %), in both case for 6 h. In the extract (aqueous and ethanolic) the total phenolic content and saponin content were measured according to methods previously reported by Singleton and Rossi (1965) and Hiai et al. (1975), respectively. In case of saponin analysis, the oleanolic acid (OA) was used as standard, and results were reported as mg EOA/ g of biomass. The main composition (cellulose, hemicellulose, and lignin) of untreated and treated quinoa stalk was determined using the standard procedures for biomass analysis of the U.S. National Renewable Energy Laboratory (NREL) (Sluiter et al., 2012).

2.3. Desaponification of quinoa stalk

The saponins from quinoa stalk of variety "Illpa Inia" were removed by extraction with water and aqueous ethanol according to procedure reported by Carrasco et al. (2021), with slightly modification. For the water extraction, 25 g of quinoa stalk were suspended in 400 mL of distilled water at 35 °C, and the suspension was mixed by stirring at 250 rpm for 1.5 h. After that, the solid fraction was recovered and submitted to aqueous ethanol extraction at 100 °C for 90 min, with about 12 g of quinoa stalk mixed with 500 mL of a 50:50 (v/v) ethanol–water mixture. The solid material resulting from both extractions was washed with distilled water and dried for subsequent use for XOS production by hydrothermal treatment.

2.4. Hydrothermal treatment for XOS production

The saponin-free quinoa stalk was submitted to hydrothermal hydrolysis in a 2 L stirred tank pressurized reactor (Model 4536, PARR Instrument Company, Moline, Illinois, USA). 53 g (on a dry basis) of quinoa stalk were used at a solid-liquid ratio of 5 %, and agitated at 120 rpm. The effects of process time (0, 5, 10, 15, 20, 30, 45 min) at 178 °C were evaluated aiming to obtain xylooligosaccharides (XOS). In all the cases, 40 min was necessary to reach 178 °C inside the reactor, and 5 min to cool the reactor until internal pressure be reduced to 1 atm. After the process, the solid fraction was separated under vacuum filtration and the liquid fraction was recovered for XOS analysis. The selected hydrolysate with high XOS content was sent for subsequent membrane purification process.

2.5. XOS purification using membranes

The hydrolysate obtained at 30 min of hydrothermal process was submitted to filtration process. In the first step, the effect of pH (3.6, 4.6, 5.6, 6.6 and 7.6) on the permeate flux through membrane, and contents of xylose and XOS in the permeate were evaluated. The initial pH value of hydrolysate, of 3.6, was adjusted to pH of 4.6, 5.6, 6.6 and 7.6 using

sodium hydroxide (0.25 M); the pressure and temperature were maintained at 35 bar and 20 °C during the process, respectively.

After choosing the pH with high filtration performance, the hydrolysate obtained after 45 min of hydrothermal process was submitted to UF using Microdyn Nadir Membrane, Nadir PM UP010, PES, UF with nominal MWCO of 10 kDa. Then, the permeate was submitted to first NF-1 using Microdyn Nadir Flat Sheet Membrane, NP030, PES, NF with MWCO of ~500 Da. Finally, the permeate obtained in NF-1 was submitted to second NF-2 process using SUEZ (GE) Flat Sheet Membrane, DK, PA-TFC, NF with MWCO of ~150–300 Da as described by Oliveira et al. (2021). All filtration process was carried out using High Pressure Stirred Cell. The xylose and XOS content were analyzed in retentate and permeate fraction for respective mass balance.

2.6. Characterization and enzymatic hydrolysis of residual solids

The solid fraction recovered after hydrothermal treatment was washed with distilled water, and the excess of water was removed by evaporation at room temperature (around 24 °C) for 24 h. Then, the material was characterized, as following described.

The chemical characterization of solid was carried out according methodology reported by Sluiter et al. (2012). The crystallinity index (CrI) of the untreated and pretreated quinoa stalk was analyzed using XRD-600 diffractometer (Shimadzu, Tokyo, Japan). The X-ray diffractometer was set at 40 kV and 30 mA. Samples were scanned over the range of $2\theta = 10\text{--}60^\circ$ and the CrI was determinate using Eq. (1) (Segal et al., 1959).

$$CrI = \left[\frac{I_{crystalline} - I_{amorphous}}{I_{crystalline}} \right] * 100 \quad (1)$$

Where: $I_{crystalline}$ = Intensity at 22.3° and $I_{amorphous}$ = Intensity at 16.1° .

The solid fraction was also submitted to enzymatic hydrolysis at 5 % solids loading of the treated SCB in 50 mM sodium citrate solution at 4.8 of pH. A commercial enzyme blend Cellic® CTec2 was used with a loading of 20 FPU/g of dry biomass. The process was performed at 50 °C and 150 rpm for 24 h. The enzymatic hydrolysis yield of cellulose was calculate considering the glucose released in enzymatic process respect to total glucose released after complete chemical hydrolysis according methodology reported by Sluiter et al. (2012).

2.7. Carotenoid's production using cellulosic hydrolysate

2.7.1. Inoculum preparation

First, cells of yeast *Rhodotorula glutinis* CCT2186 maintained in YMA medium (glucose - 10 g/L, peptone - 5 g/L, yeast extract - 3 g/L, malt extract - 3 g/L, and agar) were transferred to Erlenmeyer flasks (125 mL) containing 30 mL of commercial glucose-based medium (YM) with the following composition (g/L): glucose (30), peptone (5), extract of yeast (3), and malt extract (3), and incubated in an orbital shaker at 30 °C and 150 rpm for about 20 h. Cells were recovered by centrifugation at 2320 x g for 15 min, washed, and resuspended in peptone water (0.1 %, w/v).

2.7.2. Fermentation process in hydrolysate

Before the fermentation tests, the initial concentration of the sum of glucose and xylose present in the hydrolysate was standardized to about 10 g/L, the initial pH was adjusted to 5.5, and the hydrolysate was supplemented with peptone (5 g/L), yeast extract (3 g/L) and malt extract (3 g/L). Erlenmeyer flasks (250 mL) containing 60 mL of supplemented hydrolysate were sterilized at 121 °C for 15 min in an autoclave. Then, the flasks were inoculated with yeast cells to obtain an initial cell concentration in fermentation of 0.3 g/L, and incubated at 30 °C, 150 rpm for 72 h. Samples were collected every two hours until 10 h of growth, subsequently collecting 24, 48, and 72 h samples for

analysis of cell biomass concentration and sugar consumption. Maximum growth rate (μ_{max}) was considered as the maximum value of relative (specific) growth rate (μ) which was determined as a slope of the $\ln(N)$ vs time (t) curve in exponential growth phase (Eq. 2). Cells harvested at the end of fermentation were used to extract biopigments and to quantify carotenoids. All fermentation assays were performed in triplicate.

$$\ln(N) = \ln(N_0) + \mu.t \quad (2)$$

2.7.3. Biopigment extraction

The collected samples were centrifuged to separate the cells from the culture medium. The cell pellets were washed and dried at 60 °C for 48 h. Then, 0.1 g of dry cells were resuspended in 10 mL of NaOH solution (2.0 mol/L), and incubated in a water bath at 100 °C for 10 min. After that, the cells were centrifuged and frozen overnight. The pellets were resuspended in 10 mL of methanol: acetone solution (7:3, v/v) and homogenized by ultrasonication for 10 min to cell disruption and biopigment extraction. The cell debris were separated by centrifugation and the supernatant (carotenoid-rich extracts) were collected and quantified using a calibration curve of β -carotene at 450 nm, in an Eppendorf Spectrophotometer (Eppendorf AG, Germany).

2.8. Analytical methods

A high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) was used for xylose and XOS (X2 to X6) quantification in a Dionex DX-500 system (Sunnyvale, CA, USA) with a CarboPac PA100 column (4 x 250 mm) and a CarboPac PA100 guard column (4 x 50 mm). Buffer A (NaOH 100 mM) and B (NaOAc 300 mM; NaOH 100 mM) were used as eluents with 1.0 mL/min flow rate. The gradient program was: 95 % of A and 5 % of B from 0 to 10 min; 0 % of A and 100 % of B from 10 to 20 min; 95 % of A and 5 % of B from 20 to 25 min

Sugar monomers were analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) in an equipment Agilent 1200 series (Agilent Technologies, Inc., USA) equipped with a Refractive index detector RID-6A, and a HPLC-87 H (300 x 7.8 mm) column (Bio-Rad, USA). Used conditions were the following: 45 °C column temperature, 0.01 N H₂SO₄ as the mobile phase, 0.6 mL/min flow rate, and 20 μ L injection volume.

3. Results and discussions

3.1. Chemical characterization of quinoa stalk

The varieties of quinoa stalk were characterized, and results are shown in Table 1. As observed, the total carbohydrate content was higher in the variety Huancayo Inia (46.08 %), compared to Illpa Inia (45.37 %) and Salcedo Inia (41.81 %) varieties. The Illpa Inia variety has 8 % and 12 % more hemicellulose content respect to Huancayo and Salcedo Inia varieties, respectively. Moreover, the cellulose, hemicellulose and lignin content in the materials are in agreement with previously reported for white royal quinoa stalk by Carrasco et al. (2021) and other variety not identified by Xie et al. (2020). On the other hand, extractives like pigments, sugars, saponin, phenolics and others compounds, were more soluble in water than ethanol, mainly in the Huancayo and Illpa Inia varieties. The phenolic compound in the aqueous extractive was 50, 46 and 39 mg EAG/g of biomass for Huancayo, Illpa and Salcedo Inia varieties, respectively. On the other hand, in the ethanolic extract, the total phenolic compounds were 64, 67 and 74 mg EAG/g of biomass for Huancayo, Illpa and Salcedo Inia varieties, respectively. Finally, the saponin contents were, respectively, 14, 8 and 17 mg EOA/g of biomass, which is according previously reported for quinoa stalk of Real Blanca variety (Gil-Ramirez et al., 2018). In Fig. 1, photography of aqueous extractive of 3 varieties can be observed; the

Table 1
Composition of stalk of 3 varieties of quinoa.

Quinoa variety	Content (%)						
	Cellulose	Hemicellulose	Lignin	Acetyl group	Extractives		Ash
					Ethanol	Water	
Huancayo	30.27 ± 1.24 ^a	15.81 ± 0.67 ^a	18.66 ± 0.42 ^a	0.24 ± 0.02 ^a	4.11 ± 0.84 ^b	7.49 ± 0.34 ^b	4.69 ± 0.16 ^a
Illpa Inia	28.21 ± 0.81 ^a	17.16 ± 0.61 ^b	19.68 ± 0.44 ^b	0.20 ± 0.08 ^a	2.21 ± 0.114 ^a	5.54 ± 0.67 ^a	3.19 ± 0.10 ^b
Salcedo Inia	26.68 ± 1.16 ^b	15.13 ± 0.44 ^a	19.05 ± 0.30 ^b	0.20 ± 0.06 ^a	8.34 ± 0.26 ^c	6.00 ± 0.99 ^a	3.24 ± 0.15 ^b

Results correspond to average of triplicates ± standard deviation. Same letter in column indicates no difference according to Tukey's range test (95 % of confidence level).

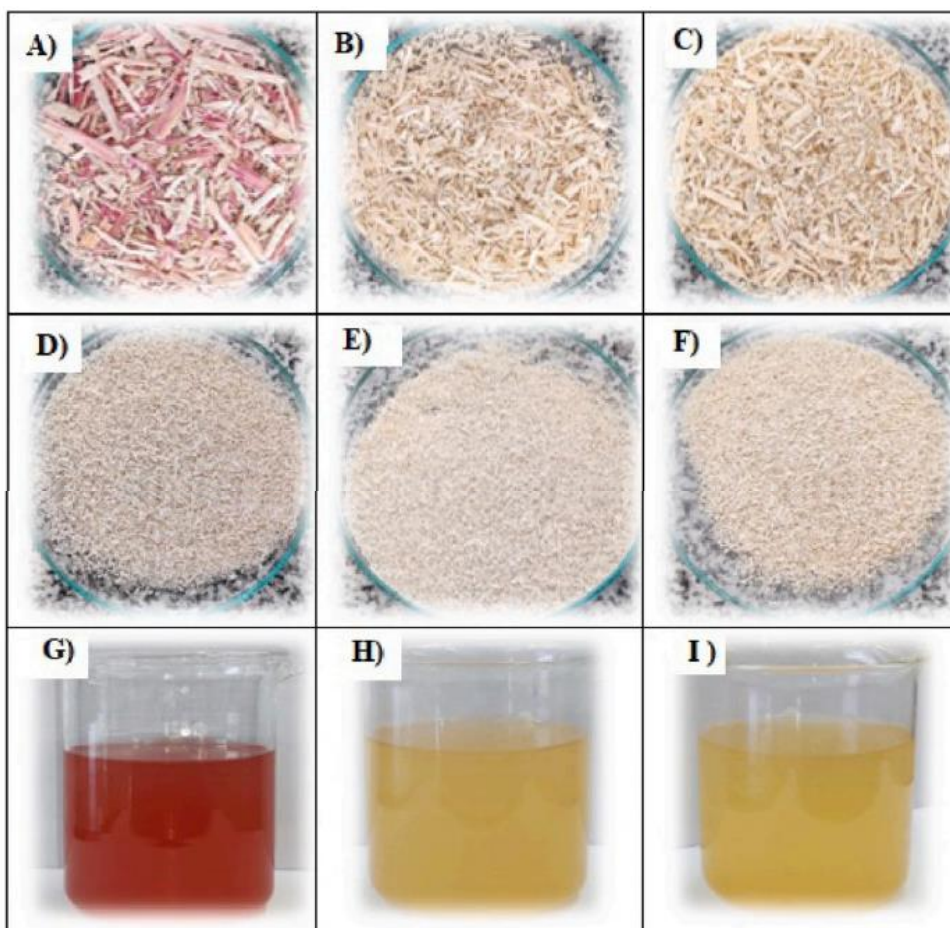


Fig. 1. Photography of Quinoa stalk and extractives of 3 varieties. a), b) and c) correspond to *In nature* biomass of Huancayo, Illpa Inia and Salcedo Inia varieties, respectively; d), e) and f) correspond to respective biomasses without extractives; g), h) and i) correspond to respective aqueous extractives.

Huancayo Inia variety was more pigmented, with high absorption at 310 and 526 nm in UV-VIS spectrophotometer. The red pigmentation can be associated to the presence of anthocyanins, which are soluble in water and usually detected at 525 nm (Aguilera Ortíz et al., 2011); moreover, absorption at 310 nm could be associated to presence of phenolic compounds (Aruwa et al., 2019; Ziani et al., 2019). After characterization of different varieties, based in the hemicellulose and saponin content the solid residue, Illpa Inia was selected for subsequent hydrothermal treatment aiming to obtain xylooligosaccharides (XOS), which is presented in the follow section.

3.2. Hydrothermal treatment of quinoa stalk for XOS production

Xylooligosaccharides (XOS) production from quinoa stalk by auto-hydrolysis process at different times was evaluated and results are shown in Fig. 2. As expected, the xylose production increased with hydrolysis time, achieving 14 mg/g of DWB (dry weight biomass) in 45 min. Respect to X2 and X3, the highest production was achieved at 30 min, but not strongly different compared to 10 min. Moreover, the time for high X4 production was 20 min. In the evaluated condition, hydronium ions and acetic acid released from hemicelluloses acted to

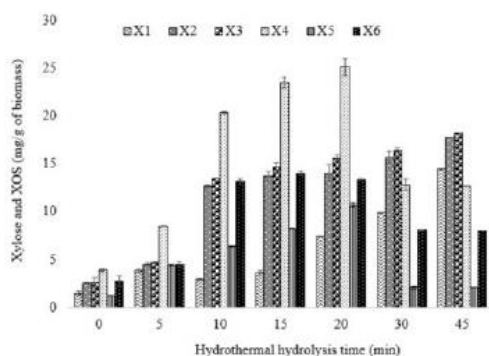


Fig. 2. Xylose (X1) and xylooligosaccharides (X2 = xylobiose, X3 = xylotriose, X4 = xylohexaose, X5 = xylopentaose, and X6 = xylobhexaose) production at 178 °C and 10 bar in a stirred tank reactor at different retention times.

cut down the polymer into small fragments; e.g., in sample treated for 45 min, 1.6 g/L of acetic acid was achieved and the pH was around 3.6, condition that favored the respective hydrolysis.

This is a first report using autohydrolysis process for XOS production from quinoa stalk. However, the obtained result is in agreement to previously reported for XOS production from sugarcane bagasse by autohydrolysis process by Zhang et al. (2020). In that work, the maximum yield of XOS was achieved at 175 °C for 30 min, but increasing the time the xylose (X1) and furfural production were promoted, and X6, X5, X4, X3 and X2 decreased. In another work, 170 °C for 50 min was the optimal condition for XOS production from poplar sawdust (Su et al., 2021). XOS also was obtained from mango seed shell by autohydrolysis treatment under optimized condition (180 °C, 2.5 MPa and 15 min), achieving 393.44 mg XOS/g of xylan (Monteiro et al., 2021).

Autohydrolysis is a cost-efficient and green technology for lignocellulosic biomass treatment biomass aiming to produce XOS, once the process tends to act selectively upon hemicellulose and a portion of lignin (Su et al., 2021). However, drastic condition could produce undesirable compound like furfural and its derivatives, products of xylose dehydration and transformation during continued exposure to heat and low pH environment. In the present work, the hydrolysate obtained after 30 and 45 min showed presence of furfural at 0.19 and 0.44 g/L, respectively. Future studies will be necessary aiming to optimize the better condition to produce high XOS concentration, avoiding xylose and undesirable products formation, which could hinder the downstream process.

3.3. XOS purification using membrane

The hydrolysate obtained after 30 min of process was submitted to ultrafiltration at different pH values, and the results are shown in Fig. 3. As observed in Fig. 3A, the highest concentration of xylose, X2, X3 and X4 in the permeate though MF membrane at 35 bar of pressure and 20 °C was obtained at high pH. Moreover, the permeate flux through membrane in the first 10 min was in average 2.1, 1.9 and 1.8 mL/min for pH 6.6, 7.6 and 5.6, respectively. On the other hand, at pH 3.6 and 4.6, low permeate flux was achieved, which was in average 0.9 and 1.3 mL/min, respectively. An increase in the pH of polymeric membranes turned them more negatively charged and hydrophilic, allowing high permeate flux and strong antifouling performance, decreasing the retention of uncharged molecules, e.g., xylose and XOS. Additionally, high values of pH modify the membrane matrix to a more expanded state, attributed to greater intramembrane electrostatic repulsion (Mänttari et al., 2006).

The effect of pH in UF for XOS purification has not yet previously

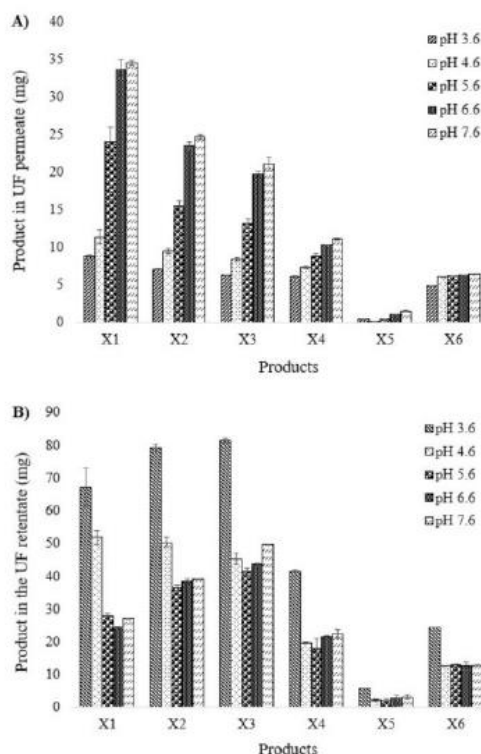


Fig. 3. Results of membrane filtration using UF membrane for xylooligosaccharides (XOS) purification from hydrolysate of quinoa stalk. A) XOS content in permeate and B) XOS content in retentate.

reported, but it is in agreement with previous works reported for decoloration of sugarcane molasses (Guo et al., 2018), clarification of pineapple juice (Ananas comosus, L. Merril) (de Carvalho et al., 2008), and sugarcane juice ultrafiltration (Balakrishnan et al., 2000).

The retentate obtained after UF was also analyzed regarding to its xylose and XOS content, and results are shown in Fig. 3B. As expected, at low pH, high retention of sugars and XOS was observed; on the other hand, at pH of 6.6 and 7.6, the product retention was low. Other relevant observation in the retentate was the color intensity, which was darker (Fig. 4). This color can be attributed to electrostatic repulsion between the membrane and pigments, mainly negative charged at high pH, resulting in a reduction of the concentration polarization and consequently leading to less hydrophobic adsorption of pigments on the membrane (Guo et al., 2018; Mänttari et al., 2006). Similar behavior was observed during filtration of diluted molasses by pristine 2 kDa-Polyamide UF membrane (Guo et al., 2018).

The hydrolysate obtained after 45 min (containing more xylose and XOS) was selected and submitted to UF (10 kDa) and NF (500 Da and then 150–300 Da) at previously defined pH (6.6), and results are shown in Fig. 4. As observed, 44 % of total products (X1–X6) were obtained in the permeate liquid though Microdyn Nadir UP010 membrane with nominal MWCO of 10 kDa at pH 6.6, 35 bar of pressure and 20 °C; however, 56 % of the products were in the retentate, requiring additional diafiltration process adding distilled water aiming to XOS recovery from permeate side. In the second step of the serial membrane-based process, the permeate obtained from UF was submitted to NF (~500 Da), achieving in the permeate only 25 % of total product (X1–X6) feed in the NF process, although with 50 % of purity (X2–X6). Regarding to second NF (through 150–300 Da), 70 % of the total

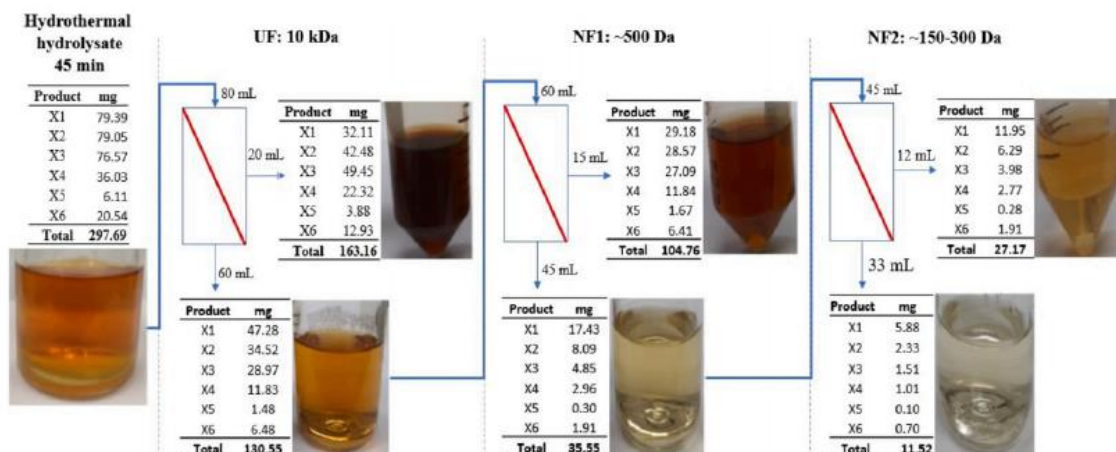


Fig. 4. Results of mass balance and photography of membrane filtration steps using UF and NF membrane for xylooligosaccharides (XOS) purification from hydrolysate of quinoa stalk obtained in 45 min of autohydrolysis process.

products (X1-X6) were obtained in the retentate, and the purity of XOS was 56 %. The achieved XOS (X2 to X6) concentration after NF-2 was 1.26 g/L, which was lower than reported by Oliveira et al. (2021) for optimized condition combined with diafiltration process. In that work, 3.7 g/L of LMW XOS, 20.9 % purity and 46 % of yield were obtained after serial membrane-based system, using NP030 followed by TS40, and additional 1-time diafiltration process. Finally, after nanofiltration the undesirable xylose (44 %) in the extract needs to be removed, and some variables (pressure, membrane pore size and pH) could be optimized aiming to reduce the xylose concentration in the product.

3.4. Composition of residual solids and enzymatic hydrolysis

The solid residue obtained after autohydrolysis process was analyzed in relation to their composition aiming to produce fermentable sugars for carotenoids production, and results are shown in Table 2. As observed, the cellulose content in the material submitted only to heating ramp until 178 °C increased in 28 % in relation to initial cellulose content in the quinoa stalk without extractive; moreover, high cellulose content (average 52 %) was achieved after 20 min of treated at 178 °C. In 45 min of treatment at 178 °C, around 54 % of hemicellulose was

Table 2
Characterization of solid residues after hydrothermal hydrolysis.

Sample / treatment time in PARR	Composition (%)			Crystallinity index (%)
	Cellulose	Hemicellulose	Lignin	
0 min	45.32 ± 3.60 ^a	18.26 ± 1.60 ^a	25.70 ± 0.30 ^a	35.90
5 min	50.17 ± 1.45 ^a	14.51 ± 0.31 ^b	27.60 ± 0.50 ^{ab}	43.26
10 min	51.21 ± 1.01 ^a	13.30 ± 0.28 ^{bc}	29.20 ± 1.60 ^{bc}	41.98
20 min	52.85 ± 2.54 ^a	12.00 ± 0.34 ^{bcd}	32.00 ± 0.51 ^{cd}	46.89
30 min	51.34 ± 1.46 ^a	11.07 ± 0.65 ^{cd}	35.57 ± 0.71 ^{de}	46.92
45 min	51.04 ± 3.68 ^a	9.08 ± 0.19 ^d	34.97 ± 0.87 ^e	46.12
Extractives-free raw biomass	35.548 ± 1.37	19.88 ± 0.75	21.11 ± 0.48	28.75

Results correspond to average of triplicates ± standard deviation. Same letter in column indicates no difference according to Tukey's range test (95 % of confidence level).

hydrolyzed into xylose and XOS. The removal of hemicellulose in the material by effect of thermal treatment turn it more crystalline, which was confirmed by crystallinity index (%CI) (Table 2). As observed in Table 2, the crystallinity index of material treated for 45 min in the reactor (178 °C) increased in 60 % in relation to quinoa stalk without extractives. The results are in agreement with previously reported for hydrothermal pretreatment, although using other kind of materials, e.g., beech wood (Nitsos et al., 2013), fiberboard, chipboard, and blockboard (Zhao et al., 2020).

In addition to hemicellulose removal, hydrothermal treatment also partially removes the lignin, causing a partial relocation of lignin or changes in the structure (Huang et al., 2022a, 2022b), and increasing the surface area and the porosity of the material, which is reflected in higher susceptibility of the material (cellulose) to enzyme action (Table 3). As observed, the total sugar (glucose and xylose) released in

Table 3
Total sugars released and cellulose hydrolysis yield of the residual solids obtained after hydrothermal treatment of quinoa stalk.

Retention time (min) at 178 °C	Sugars content in hydrolysate (g/Kg of treated biomass)		Total fermentable sugars (g/Kg of treated biomass)	Cellulose Hydrolysis yield (%)
	Glucose	Xylose		
In natura (without any treatment)	46.04 ± 1.38 ^a	22.02 ± 5.04 ^a	68.06 ± 6.42 ^a	13.62 ± 0.54 ^a
0	296.96 ± 33.87 ^b	119.05 ± 13.46 ^c	416.01 ± 47.33 ^b	65.52 ± 7.47 ^b
5	344.23 ± 41.63 ^{bc}	98.29 ± 11.33 ^{bc}	442.52 ± 52.95 ^b	69.74 ± 6.70 ^{bc}
10	365.75 ± 43.62 ^{bcd}	90.29 ± 12.54 ^{bc}	456.04 ± 56.16 ^b	73.22 ± 5.97 ^{bc}
15	394.37 ± 43.22 ^{bcd}	82.94 ± 11.48 ^{bc}	477.31 ± 54.69 ^b	80.16 ± 4.47 ^{bcd}
20	450.61 ± 37.44 ^{de}	87.07 ± 9.00 ^{bc}	537.69 ± 46.44 ^b	87.64 ± 3.73 ^{cd}
30	506.63 ± 32.53 ^{de}	81.50 ± 4.60 ^{bc}	588.12 ± 37.13 ^b	97.10 ± 4.10 ^d
45	514.76 ± 46.73 ^e	74.31 ± 6.16 ^b	589.07 ± 52.90 ^b	99.00 ± 1.41 ^d

Results correspond to average of triplicates ± standard deviation. Same letter in column indicates no difference according to Tukey's range test (95 % of confidence level).

hydrolysis increased with the pretreatment time, achieving in the treated material (45 min at 178 °C), in average, 589 g/Kg of material, which correspond to 99 % of cellulose hydrolysis yield by the cellulase enzyme blend. Besides cellulose, the residual hemicellulose was also hydrolyzed by the enzyme, considering the presence of hemicellulases in the enzyme blend, as reported in the commercial datasheet. However, the concentration of xylose decreased with the pretreatment time, which is according with the low content of hemicellulose in the material. In overall, the residual material after autohydrolysis process can be enzymatically hydrolyzed releasing fermentable sugars (glucose and xylose), which can be used for carotenoids production.

3.5. Carotenoid's production using cellulosic hydrolysate

The enzymatic hydrolysate obtained was used for carotenoids production by *Rhodotorula glutinis* CCT2186, and results are shown in Fig. 5. As observed, the glucose and xylose were consumed simultaneously during the fermentation by *R. glutinis*, in the fermentation condition, achieving 4.1 mg of carotenoids/g (dry cells weight) of carotenoids, and 6.27 mg of carotenoids/g of total sugar consumed. Moreover, maximum growth rate (μ_{max}) of 0.32 min⁻¹ was reached. The obtained result is slightly higher than 1.3 mg of β -carotene/g of cells obtained using lignocellulosic biomass hydrolysate as the carbon source in an internal-loop airlift bioreactor (Yen and Chang, 2015). Considering this study as a first report about the use of quinoa stalk for carotenoids production, optimization process will be required. Moreover, inhibitors present in acid hydrolysates as furfural, acetic acid and 5-HMF could be also metabolized by *R. glutinis* (Brandenburg et al., 2021; Liu et al., 2015). Therefore, futures works could be focused in the use of undetoxified hydrolysate of quinoa stalk directly mainly for carotenoids and lipid production.

4. Conclusion

The autohydrolysis process was an efficient method for direct XOS production. XOS were purified through sequential membrane filtration, achieving 56 % of purity in the retentate of second nanofiltration. Moreover, the residual solid showed high susceptibility to enzyme action, releasing high concentration of fermentable sugars, which was successfully used for carotenoids production. This study is a first report about the valorization of quinoa stalk in high valuable products like XOS and carotenoids, showing the high potential of this biomass to be used as raw material for value added products.

CRedit authorship contribution statement

Fernando E. Rosas Vega: Investigation, Methodology, Visualization. **Salvador Sanchez Muñoz:** Methodology, Validation, Investigation, Data curation. **Igor Severo Gonçalves:** Methodology, Investigation, Data curation. **Felix Terán Hilares:** Data curation, Formal analysis, Writing – original draft. **Thércia Rocha Albino:** Methodology, Investigation, Data curation. **Marcus B. Soares Forte:** Formal analysis, Data curation. **Silvio Silvério da Silva:** Formal analysis, Data curation. **Júlio C. dos Santos:** Methodology, Investigation, Data curation, Writing – review & editing. **Ruly Terán Hilares:** Conceptualization, Methodology, Data curation, Resources, Writing-original draft, Writing – review & editing, Supervision.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

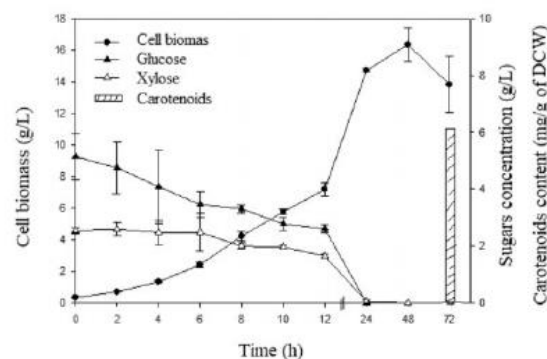


Fig. 5. Profile of sugars consumption, cells and carotenoids production by *R. glutinis* using cellulosic enzymatic hydrolysate of quinoa stalk pretreated by hydrothermal process.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

This research was funded by the Universidad Católica de Santa María (UCSM) - Peru (Grant number 7797-CU-2021). Authors also acknowledge to Prof. Adriane Ferreira Milagres from Engineering School of Lorena (EEL) of the University of Sao Paulo of Brazil (USP); Danielle Garcia Ribeiro MSc. from the Food Engineering Faculty of the State University of Campinas of Brazil (UNICAMP), and Ahmed Muhammad Ajaz PhD from Govt College Women University of Madina Town Faisalabad – Pakistan.

References

- Aguilera Ortiz, M., del Carmen, M., Vargas, R., Chew Madinaveira, R.G., Meza Velázquez, J.A., 2011. Propiedades funcionales de las antocianinas. *Biotecnología* 13, 16–22. <https://doi.org/10.18633/BT.V13I2.81>.
- Aruwa, C.E., Amoo, S., Kudanga, T., 2019. Phenolic compound profile and biological activities of Southern African *Opuntia ficus-indica* fruit pulp and peels. *LWT* 111, 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.028>.
- Balakrishnan, M., Dua, M., Bhagat, J.J., 2000. Effect of operating parameters on sugarcane juice ultrafiltration: results of a field experience. *Sep. Purif. Technol.* 19, 209–220. [https://doi.org/10.1016/S1383-5866\(00\)00054-X](https://doi.org/10.1016/S1383-5866(00)00054-X).
- Bertacchi, S., Cantù, C., Porro, D., Branduardi, P., 2021. Optimization of Carotenoids Production from *Camelina sativa* Meal Hydrolysate by *Rhodospiridium toruloides*. *Fermentation* 2021, Vol. 7, Page 208 7, 208. <https://doi.org/10.3390/fermentation7040208>.
- Brandenburg, J., Blomqvist, J., Shapaval, V., Kohler, A., Sampels, S., Sandgren, M., Passoth, V., 2021. Oleaginous yeasts respond differently to carbon sources present in lignocellulosic hydrolysate. *Biotecnol. Biofuels* 14, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01974-2/TABLES/2>.
- Carrasco, C., Jönsson, L.J., Martín, C., 2021. Hydrothermal Pretreatment of Water-Extracted and Aqueous Ethanol-Extracted Quinoa Stalks for Enzymatic Saccharification of Cellulose. *Energies* 2021, Vol. 14, 4102. <https://doi.org/10.3390/EN14144102>.
- de Carvalho, L.M.J., de Castro, I.M., da Silva, C.A.B., 2008. A study of retention of sugars in the process of clarification of pineapple juice (*Ananas comosus*, L. Merril) by micro- and ultra-filtration. *J. Food Eng.* 87, 447–454. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.12.015>.
- Gil-Ramírez, A., Salas-Veizaga, D.M., Grey, C., Karlsson, E.N., Rodríguez-Meizoso, I., Linares-Pastén, J.A., 2018. Integrated process for sequential extraction of saponins, xylan and cellulose from quinoa stalks (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Ind. Crops Prod.* 121, 54–65. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.074>.
- Gullón, B., Eibes, G., Dávila, I., Moreira, M.T., Labidi, J., Gullón, P., 2018. Hydrothermal treatment of chestnut shells (*Castanea sativa*) to produce oligosaccharides and antioxidant compounds. *Carbohydr. Polym.* 192, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.03.051>.
- Guo, S., Luo, J., Wu, Y., Qi, B., Chen, X., Wan, Y., 2018. Decoloration of sugarcane molasses by tight ultrafiltration: Filtration behavior and fouling control. *Sep. Purif. Technol.* 204, 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.04.067>.

- Hiai, S., Oura, H., Hamanaka, H., Odaka, Y., 1975. A color reaction of panaxadiol with vanillin and sulfuric acid. *Planta Med* 28, 131–138. <https://doi.org/10.1055/S-0028-1097841>.
- Huang, C., Yu, Y., Li, Z., Yan, B., Pei, W., Wu, H., 2022b. The preparation technology and application of xylo-oligosaccharide as prebiotics in different fields: a review. *Front Nutr*. 9. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2022.996811>.
- Huang, C., Wang, X., Liang, C., Jiang, X., Yang, G., Xu, J., Yong, Q., 2019. A sustainable process for procuring biologically active fractions of high-purity xylooligosaccharides and water-soluble lignin from Moso bamboo prehydrolyzate. *Biotechnol. Biofuels* 12, 1–13. <https://doi.org/10.1186/S13068-019-1527-3/FIGURES/5>.
- Huang, C., Jiang, X., Shen, X., Hu, J., Tang, W., Wu, X., Ragauskas, A., Jameel, H., Meng, X., Yong, Q., 2022a. Lignin-enzyme interaction: a roadblock for efficient enzymatic hydrolysis of lignocellulosics. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 154, 111822. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2021.111822>.
- Liu, Y., Wang, Y., Liu, H., Zhang, J., 2015. Enhanced lipid production with undetoxified corn cob hydrolysate by *Rhodotorula glutinis* using a high cell density culture strategy. *Biotechnol. Biofuels* 180, 32–39. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.12.093>.
- Liu, Z., Feist, A.M., Dragone, G., Mussatto, S.I., 2020. Lipid and carotenoid production from wheat straw hydrolysates by different oleaginous yeasts. *J. Clean. Prod.* 249, 119308. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2019.119308>.
- Liu, Z., Natalizio, F., Dragone, G., Mussatto, S.I., 2021. Maximizing the simultaneous production of lipids and carotenoids by *Rhodospiridium toruloides* from wheat straw hydrolysate and perspectives for large-scale implementation. *Biotechnol. Biofuels* 14, 125598. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.125598>.
- Lu, H., Liu, S., Zhang, M., Meng, F., Shi, X., Yan, L., 2016. Investigation of the strengthening process for liquid hot water pretreatments. *Energy Fuels* 30, 1103–1108. <https://doi.org/10.1021/ACS.ENERGYFUELS.5B02658>.
- Mänttärä, M., Pihlajamäki, A., Nyström, M., 2006. Effect of pH on hydrophilicity and charge and their effect on the filtration efficiency of NF membranes at different pH. *J. Memb. Sci.* 280, 311–320. <https://doi.org/10.1016/J.MEMSCI.2006.01.034>.
- MIDAGRI, 2022. Observatory of Plantings and Perspectives of Quinoa Production - Peru.
- Monteiro, C.R.M., Ávila, P.F., Pereira, M.A.F., Pereira, G.N., Bordignon, S.E., Zanella, E., Stambuk, B.U., de Oliveira, D., Goldbeck, R., Poletto, P., 2021. Hydrothermal treatment on depolymerization of hemicellulose of mango seed shell for the production of xylooligosaccharides. *Carbohydr. Polym.* 253, 117274. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2020.117274>.
- Nabarlatz, D., Torras, C., Garcia-Valls, R., Montañé, D., 2007. Purification of xylooligosaccharides from almond shells by ultrafiltration. *Sep. Purif. Technol.* 53, 235–243. <https://doi.org/10.1016/J.JSEPPUR.2006.07.006>.
- Neto, F.S.F.P., Roldán, I.U.M., Galán, J.P.M., Monti, R., de Oliveira, S.C., Masarin, F., 2020. Model-based optimization of xylooligosaccharides production by hydrothermal pretreatment of Eucalyptus by-product. *Ind. Crops Prod.* 154, 112707. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2020.112707>.
- Nitsos, C.K., Matis, K.A., Triantafyllidis, K.S., 2013. Optimization of hydrothermal pretreatment of lignocellulosic biomass in the bioethanol production process. *ChemSusChem* 6, 110–122. <https://doi.org/10.1002/CSCC.201200546>.
- Oliveira, M.G., de Forte, M.B.S., Franco, T.T., 2021. A serial membrane-based process for fractionation of xylooligosaccharides from sugarcane straw hydrolysate. *Sep. Purif. Technol.* 278, 119285. <https://doi.org/10.1016/J.JSEPPUR.2021.119285>.
- Palaniappan, A., Antony, U., Emmambux, M.N., 2021. Current status of xylooligosaccharides: Production, characterization, health benefits and food application. *Trends Food Sci. Technol.* 111, 506–519. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.02.047>.
- Pathan, S., Siddiqui, R.A., 2022. Nutritional composition and bioactive components in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) greens: a review. *Nutrients* 2022, Vol. 14, 558. <https://doi.org/10.3390/NU14030558>.
- Ruiz, H.A., Conrad, M., Sun, S.N., Sanchez, A., Rocha, G.J.M., Romani, A., Castro, E., Torres, A., Rodriguez-Jasso, R.M., Andrade, L.P., Smirnova, I., Sun, R.C., Meyer, A. S., 2020. Engineering aspects of hydrothermal pretreatment: from batch to continuous operation, scale-up and pilot reactor under biorefinery concept. *Biotechnol. Biofuels* 299, 122685. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2019.122685>.
- Salas-Velazaga, D.M., Bhattacharya, A., Adlercreutz, P., Ståhlbrand, H., Karlsson, E.N., 2021. Glucuronosylated and linear xylooligosaccharides from Quinoa stalks xylan as potential prebiotic source for growth of *Bifidobacterium adolescentis* and *Weissella cibaria*. *LWT* 152, 112348. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.112348>.
- Salas-Velazaga, D.M., Villagomez, R., Linares-Pastén, J.A., Carrasco, C., Álvarez, M.T., Adlercreutz, P., Karlsson, E.N., 2017. Extraction of glucuronooarabinosylan from quinoa stalks (*Chenopodium quinoa* Willd.) and evaluation of xylooligosaccharides produced by GH10 and GH11 xylanases. *J. Agric. Food Chem.* 65, 8663–8673. https://doi.org/10.1021/ACS.JAF.7B01737/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JF-2017-01737R_0007.GIF.
- Santibáñez, L., Henríquez, C., Corro-Tejada, R., Bernal, S., Armijo, B., Salazar, O., 2021. Xylooligosaccharides from lignocellulosic biomass: a comprehensive review. *Carbohydr. Polym.* 251, 117118. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2020.117118>.
- Segal, L., Creely, J.J., Martin, A.E., Conrad, C.M., 1959. An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. *Text. Res. J.* 29, 786–794.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16.
- Sluiter, A., Hames B., Ruiz R., Scarlata C., Sluiter J., Templeton D., Crocker D., 2012. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. National Renewable Energy Laboratory. Web site <http://www.nrel.gov/docs/gen/ty13/42618.pdf>. (Accessed 10 August 2022).
- Su, Y., Fang, L., Wang, P., Lai, C., Huang, C., Ling, Z., Sun, S., Yong, Q., 2021. Efficient production of xylooligosaccharides rich in xylobiose and xylotriase from poplar by hydrothermal pretreatment coupled with post-enzymatic hydrolysis. *Biotechnol. Biofuels* 14, 125955. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.125955>.
- Xie, W., Ren, Y., Jiang, F., Liang, J., Du, S., kui, 2020. Pretreatment of quinoa straw with 1-butyl-3-methylimidazolium chloride and physicochemical characterization of biomass. *Renew. Energy* 146, 1364–1371. <https://doi.org/10.1016/J.RENENE.2019.07.072>.
- Yang, B., Tao, L., Wyman, C.E., 2018. Strengths, challenges, and opportunities for hydrothermal pretreatment in lignocellulosic biorefineries. *Biofuels Bioprod. Biorefin.* 12, 125–138. <https://doi.org/10.1002/BBB.1825>.
- Yen, H.W., Chang, J.T., 2015. Growth of oleaginous *Rhodotorula glutinis* in an internal-loop airlift bioreactor by using lignocellulosic biomass hydrolysate as the carbon source. *J. Biosci. Bioeng.* 119, 580–584. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOSC.2014.10.001>.
- Zhang, X., Zhang, W., Lei, F., Yang, S., Jiang, J., 2020. Coproduction of xylooligosaccharides and fermentable sugars from sugarcane bagasse by seawater hydrothermal pretreatment. *Biotechnol. Biofuels* 13, 123385. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2020.123385>.
- Zhao, J., Tian, D., Hu, J., Shen, F., Zeng, Y., Yang, G., Huang, C., Long, L., Deng, S., 2020. Evaluation of hydrothermal pretreatment on lignocellulose-based waste furniture boards for enzymatic hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 192, 415–431. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03315-9/FIGURES/5>.
- Ziani, B.E.C., Heleno, S.A., Bachari, K., Dias, M.I., Alves, M.J., Barros, L., Ferreira, I.C.F. R., 2019. Phenolic compounds characterization by LC-DAD-ESI/MSn and bioactive properties of *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. and *Ephedra alata* Decne. *Food Res. Int.* 116, 312–319. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.08.041>.