

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



EVALUACIÓN DE PRETRATAMIENTOS DE RESIDUOS DE MELÓN PARA LA
OBTENCIÓN DE MONOSACÁRIDOS

Tesis

Que presenta DANIELA RODRÍGUEZ LUNA
como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

Saltillo, Coahuila

Julio 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



EVALUACIÓN DE PRETRATAMIENTOS DE RESIDUOS DE MELÓN PARA LA
OBTENCIÓN DE MONOSACÁRIDOS

Tesis

Que presenta DANIELA RODRÍGUEZ LUNA
como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA



Dr. Armando Robledo Olivo
Director UAAAN



Dr. Héctor Arturo Ruíz Leza
Director Externo

Saltillo, Coahuila

Julio 2020

EVALUACIÓN DE PRETRATAMIENTOS DE RESIDUOS DE MELÓN PARA LA
OBTENCIÓN DE MONOSACÁRIDOS

Tesis

Elaborada por DANIELA RODRÍGUEZ LUNA como requisito parcial para obtener el
grado de Maestro en Ciencias en Horticultura con la supervisión y la aprobación del Comité
de Asesoría



Dr. Armando Robledo Olivo
Asesor Principal



Dr. Héctor Arturo Ruíz Leza
Asesor



Dra. Susana González Morales
Asesor



Dr. Alberto Sandoval Rangel
Asesor



Dr. Marcelino Cabrera De la Fuente
Asesor



Dr. Marcelino Cabrera De la Fuente
Subdirector de Postgrado

Saltillo, Coahuila

Julio 2020

AGRADECIMIENTOS

A **DIOS**, por brindarme salud y permitir que culmine este proyecto.

A la **UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO** que me abrió las puertas y me permitió seguir formándome como profesionalista.

Al **CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA (CONACYT)**, por su apoyo brindado en el financiamiento de mis estudios de maestría.

A mi madre **Marta Luna Martínez** por tanto amor, apoyo y por darme sus consejos para ser mejor cada día.

A mi padre **Federico Rodríguez Cardona** por amarme tanto y apoyarme en todos mis proyectos y nunca haberme soltado de su mano, es mi ejemplo a seguir, y a mi hermano **Eduardo Adrián Rodríguez Luna** por haber formado parte de mi vida, siempre estuvo ahí conmigo alentándome a seguir adelante, y aunque ya no estén conmigo, siempre los tendré en mi corazón.

A mis hermanos **Federico Iván y Luis Fabián** por brindarme su apoyo.

A mi hijo **Luis Gael Guajardo Rodríguez** por llenarme de tanta alegría y ser mi motivación todos los días.

A mis abuelos por su apoyo y siempre estar cerca de mí.

Dr. Armando Robledo Olivo muchas gracias por apoyarme a realizar mi trabajo de tesis. Por sus enseñanzas, su paciencia y gracias por ayudarme a crecer profesionalmente.

Gracias Dr. Héctor Arturo Ruíz Leza por tanto apoyo, por prestarme el área de trabajo y compartirme su conocimiento.

Les agradezco la confianza, apoyo y dedicación a los doctores asesores de mi tesis: **Susana González Morales, Marcelino Cabrera De la Fuente, Alberto Sandoval Rangel** por haber compartido conmigo sus conocimientos y sobre todo su amistad.

A mis amigos por el apoyo y compañía haciendo más ameno el tiempo que estuve en Saltillo.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	iv
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
JUSTIFICACIÓN.....	3
HIPÓTESIS.....	4
OBJETIVOS.....	4
Objetivo General:	4
Objetivos específicos:.....	4
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
Residuos de la agroindustria (biomasa)	5
Producción de melón y residuos derivados	6
Material residual lignocelulósico	7
Celulosa.....	8
Hemicelulosa.....	9
Lignina.....	10
Pretratamiento térmico	10
Hidrolisis enzimática	12
Hongos lignocelulolíticos.....	13
Fermentación	13
Fermentación en medio líquido.....	13
Estrategia de sacarificación y fermentación simultánea	14
Bioetanol.....	14
Generaciones del bioetanol.....	14
Utilización de residuos para bioetanol de segunda generación	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
Ubicación.....	17
Melón como materia prima	17
Pretratamiento hidrotérmico LHW y diseño experimental	17
Fermentación líquida para la producción de enzimas.....	18
Caracterización de enzimas	19
Producción de etanol.....	19

Pre-inoculo de la levadura	19
Sacarificación y Fermentación Simultánea (SFS).....	19
Método analítico	20
Análisis estadístico.....	21
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	22
Composición del melón como materia prima.....	22
Producción de extracto enzimático mediante FML.....	23
Análisis experimental del pretratamiento LHW.....	26
Análisis de fibra	31
Sacarificación y fermentación simultánea (SFS) para la producción de bioetanol.....	36
CONCLUSIONES	38
LITERATURA CITADA	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comportamiento cinético de azúcares totales y reductores durante el proceso de fermentación líquida de los residuos de melón deshidratados. Los puntos representan la media de los valores experimentales y las barras la desviación estándar.	24
Figura 2. Comportamiento cinético del perfil de monosacáridos durante el proceso de fermentación líquida de los residuos de melón deshidratados. Los puntos representan la media de los valores experimentales y las barras la desviación estándar.	25
Figura 3. Comportamiento cinético del contenido de proteínas durante el proceso de fermentación líquida de los residuos de melón deshidratados. Los puntos representan la media de los valores experimentales y las barras la desviación estándar.	26
Figura 4. Efectos principales para las medias de azúcares totales liberados en la fracción sólida tratada con LHW.	28
Figura 5. Efectos principales para las medias de azúcares reductores liberados en la fracción sólida tratada con LHW.	28
Figura 6. Efectos principales para las medias de azúcares totales liberados en la fracción líquida tratada con LHW.	30
Figura 7. Efectos principales para las medias de azúcares reductores liberados en la fracción sólida tratada con LHW.	30
Figura 8. Porcentaje del contenido de biomasa lignocelulósica en la fracción sólida de melón pretratado.	32
Figura 9. Efectos principales para las medias de disminución de hemicelulosa en la fracción sólida tratada con LHW.	33
Figura 10. Efectos principales para las medias de disminución de lignina en la fracción sólida tratada con LHW.	34
Figura 11. Comportamiento cinético del perfil de monosacáridos y producción de etanol durante el proceso SFS de los residuos de melón hidrolizados. Los puntos representan la media de los valores experimentales y las barras la desviación estándar.	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición porcentual de componentes lignocelulósicos en varias BLC.....	6
Tabla 2. Tratamientos LHW a diferentes residuos lignocelulósicos.....	12
Tabla 3. Residuos como sustrato y microorganismos utilizados para la producción de bioetanol.....	16
Tabla 4. Arreglo de tratamientos del Diseño Experimental ortogonal.....	18
Tabla 5. Caracterización química del melón seco sin tratamiento LHW:.....	22
Tabla 6. Contenido de biomasa lignocelulósica según el tamaño de partícula de los residuos de melón seco.	23
Tabla 7. ANOVA del diseño Taguchi para los azúcares totales y reductores de la fracción sólida del residuo de melón tratado con LHW.	27
Tabla 8. ANOVA del diseño Taguchi para los azúcares totales y reductores de la fracción líquida del residuo de melón tratado con LHW.	29
Tabla 9. Condiciones obtenidas para favorecer la liberación de azúcares totales y reductores	31
Tabla 10. ANOVA del diseño Taguchi para el contenido de hemicelulosa y lignina de la fracción Sólida del residuo de melón tratado con LHW.	33
Tabla 11. Condiciones obtenidas para favorecer la disminución de hemicelulosa y lignina en la fracción sólida posterior al tratamiento con LHW	35

RESUMEN

EVALUACIÓN DE PRETRATAMIENTOS DE RESIDUOS DE MELÓN PARA LA
OBTENCIÓN DE MONOSACÁRIDOS

POR

DANIELA RODRÍGUEZ LUNA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DR. ARMANDO ROBLEDO OLIVO - ASESOR

Saltillo, Coahuila

Julio 2020

En México se produce habitualmente el melón, fruta rica en azúcares y biomasa lignocelulósica, el cuál en algún punto de su cadena de comercio el melón rechazado es vendido a muy bajo precio, y en ocasiones, es tirado al medio ambiente generando contaminación y proliferación de microorganismos patógenos. Por otra parte, la biomasa lignocelulósica se considera como la materia prima del futuro para la producción de diversos productos de alto valor agregado y biocombustibles de importancia industrial, debido a su bajo costo y su enorme disponibilidad. Para ello debe ser “pretratada” para que la celulosa puede ser más fácilmente des polimerizada a glucosa. Todo esto con el fin lograr incrementar la disponibilidad de azúcares fermentables en los residuos de melón. Se empleó un proceso combinado de presión y temperatura e hidrólisis enzimática. El material fue recolectado de campos experimentales en Paila Coahuila y fue clasificado. Posteriormente se pretrató la fracción solida por procesos hidrotérmicos (90-110°C por tiempos de residencia entre 5 y 20 minutos). Se realizó un diseño de experimentos ortogonal para optimizar los tiempos y temperaturas de operación, y se cuantificaron los azúcares generados. Se produjo un extracto enzimático lignocelulolítico mediante fermentación en medio líquido empleando el jugo del melón como susbtrato (fuente de carbono). Posteriormente se realizó de manera secuencial, el proceso de adición del extracto líquido de fermentación después del tratamiento hidrotérmico, para finalmente producir bioetanol de la biomasa pre-sacarificada. Los residuos de melón sin tratamiento presentan un gran contenido de hemicelulosa, seguido por lignina y celulosa. Posterior al tratamiento establecido, se obtuvieron porcentajes más altos en contenido de celulosa, comparados con las muestras sin tratar. En las primeras 12 horas del proceso se muestra la mayor concentración de etanol y glucosa (2.4 g/l y 19.1 g/l respectivamente), lo que representa un rendimiento del 23.33% de conversión de azúcares a bioetanol. La secuencia del pretratamiento establecido e hidrólisis enzimática incrementó la conversión de residuos de melón en azúcares fermentables, por lo que es un proceso viable para la generación de bioetanol de segunda generación.

ABSTRACT

EVALUATION OF PRE-TREATMENTS OF MELON WASTE TO OBTAIN
MONOSACCHARIDES

BY

DANIELA RODRÍGUEZ LUNA

MASTER OF SCIENCE IN HORTICULTURE
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DR. ARMANDO ROBLEDO OLIVO - ADVISER

Saltillo, Coahuila

July 2020

In Mexico, melon, a fruit rich in sugars and lignocellulosic biomass, is usually produced, which at some point in its chain of trade, the rejected melon is sold at a very low price, and sometimes it is thrown into the environment, generating contamination and proliferation of pathogenic microorganisms. On the other hand, lignocellulosic biomass is considered as the raw material of the future to produce various products of industrial importance, due to its low cost and its enormous availability. For this it must be "pretreated" to expose the cellulose of the vegetable fibers. To increase the availability of fermentable sugars in melon residue samples, a combined pressure and temperature process and enzymatic hydrolysis were used. The material was collected from experimental fields in Paila Coahuila and was classified. Subsequently, the solid fraction was pretreated by hydrothermal processes (90-110°C for residence times between 5 and 20 minutes). An orthogonal design of experiments was carried out to optimize operating times and temperatures, and the sugars produced were quantified. A lignocellulolytic enzyme extract was produced by fermentation in a liquid medium using the melon juice as substrate. Subsequently, the process of adding the fermentation liquid extract after the hydrothermal treatment was carried out sequentially, to finally produce bioethanol from the pre-saccharified biomass. The untreated melon residues have a high content of hemicellulose, followed by lignin and cellulose. After the established treatment, higher percentages in cellulose content were obtained, compared to the untreated samples. In the first 12 hours of the process, the highest concentration of ethanol and glucose is shown (2.4 g/l and 19.1 g/l respectively), which represents a yield of 23.33% of conversion of sugars in bioethanol. The sequence of the established pretreatment and enzymatic hydrolysis increased the conversion of melon residues into fermentable sugars, making it a viable process for the second generation of bioethanol.

INTRODUCCIÓN

El melón Cantaloupe (*Cucumis melo* L.) en México incrementó 27.3% (593,717 ton) su producción, siendo Sonora, Coahuila y Guerrero los principales productores (SIAP, 2017). Cabe mencionar que la Comarca Lagunera, no obstante, su cercanía de los Estados Unidos, no es una región exportadora de melón; casi el 100% de su producción se envía a mercado nacional. Esta situación se debe a que muy pocas empresas de la Comarca Lagunera cuentan con un certificado en materia de inocuidad (Espinoza *et al.*, 2011), requisito para ser exportador. Lo anterior porque, en octubre del año 2002, se observó un brote de *Salmonella* en Estados Unidos y fue atribuido a los melones mexicanos, por lo cual este país restringió el acceso del fruto al mercado estadounidense de acuerdo a la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés: Food and Drug Administration). Semanas después, Canadá aplicó también un cierre de fronteras al melón mexicano, según la Agencia Canadiense de Inspección de Alimentos (CFIA, por sus siglas en inglés: Canadian Food Inspection Agency). En el 2005, a través de negociaciones entre las entidades sanitarias de México (SENASICA) y Estados Unidos (FDA) la frontera se vuelve a abrir a productores mexicanos que logren obtener una certificación de inocuidad en sus procesos de producción y empaque, como lo indica el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Al cierre de abril de 2018, en el estado de Coahuila, solamente dos empresas contaban con una certificación en Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) y Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), una de ellas una empackadora y otra una unidad con nueve campos de producción (SENASICA, 2018). De acuerdo a esto el melón se sigue vendiendo a los intermediarios a muy bajo precio y una gran parte no cumple las características deseables para el mercado y es rechazado o tirado al medio ambiente generando contaminación y proliferación de microorganismos patógenos (Espinoza-Arellano *et al.*, 2019). Se ha estimado que cerca del 20% de la producción anual de melón es desechada. En este sentido, también existe una clara falta de desarrollo de procesos que representen una alternativa al desecho del fruto (Cofecyt, 2011).

La NOM-081-FITO-2001 menciona que se debe realizar el manejo y eliminación de focos de infestación y eliminación de residuos. Se deben buscar alternativas para generar un valor agregado, el melón posee una composición que varía de acuerdo a la variedad de este fruto, en promedio contiene 85-90% de agua, 7-8% de azúcar y alrededor del 10% de celulosa y hemicelulosa (National Agricultural Library, 2013), y puede ser utilizado para generar bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica, sin embargo la materia prima debe someterse a un pretratamiento, que es un paso esencial en el proceso para superar la recalcitración de la biomasa lignocelulósica. El pretratamiento consiste en el fraccionamiento de la biomasa en sus componentes principales: celulosa, hemicelulosa y lignina para facilitar el posterior ataque enzimático y microbiano (Aditiya *et al.*, 2016).

En la actualidad, es necesario considerar otras fuentes de energía para reemplazar la gasolina. El bioetanol ha surgido como una alternativa para ser utilizado como biocombustible debido a sus bajas tasas de contaminación y, a que se obtiene de una fuente renovable, en los últimos años se ha incrementado el uso de etanol obtenido a partir de la caña de azúcar; sin embargo, este biocombustible, considerado de primera generación choca con diversas situaciones sociales como la seguridad alimentaria, principalmente en nuestro país. El bioetanol se puede producir a partir de diferentes fuentes y se clasifica por generaciones. La segunda generación (2G) de bioetanol se obtiene de materiales lignocelulósicos, como maderas duras y blandas, residuos agroindustriales y agrícolas (Aguilar *et al.*, 2018).

JUSTIFICACIÓN

El cambio climático es un tema de mucha importancia a nivel mundial, debido a que, por las diferentes acciones del hombre, se han venido incrementando las emisiones de gases contaminantes y la generación de residuos orgánicos e inorgánicos. Igualmente, la agricultura genera contaminación por los residuos que se generan al no poder ser comercializados y por su corta vida de anaquel, por lo cual se busca realizar investigaciones que ayuden a minimizar este problema. El uso de residuos agrícolas ricos en materiales lignocelulósicos como materia prima para producir energías renovables y biocombustibles, es un proyecto viable que se propone para utilizar residuos de melón como materia prima en la producción de monosacáridos fermentables y así mismo dar valor agregado a los residuos generados.

HIPÓTESIS

La secuencia del pretratamiento con agua caliente líquida e hidrólisis enzimática incrementará la conversión de residuos de melón en monosacáridos fermentables.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Incrementar la disponibilidad de azúcares monoméricos en muestras de residuos de melón, empleando un proceso combinado de agua caliente líquida e hidrólisis enzimática.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Producir un extracto enzimático mediante fermentación en medio líquido empleando los desechos de melón como sustrato para la cepa *Aspergillus niger*.
- Pretratar los desechos de melón aplicando el método de agua caliente líquida.
- Realizar en secuencia el pretratamiento físico y el enzimático evaluando la acumulación de monosacáridos.

REVISIÓN DE LITERATURA

RESIDUOS DE LA AGROINDUSTRIA (BIOMASA)

La preocupación de la población mundial por la creciente generación de residuos ha marcado una tendencia general hacia la investigación de nuevas alternativas que permitan su revalorización. Para afrontar esta problemática se plantea la producción de biocombustibles a partir de residuos agrícolas (Rojas y Florez 2019).

Aproximadamente un tercio de los alimentos destinados al consumo humano se pierde o desperdicia. Concretamente, en el caso de frutas y hortalizas se pierde entre el 40 y 50%. Esta alta y creciente cantidad de residuos hace necesaria una búsqueda de alternativas que revalorizaren los mismos. En esa línea, una opción, es la generación de bioetanol de segunda generación, que permite reducir el volumen de residuos y plantea una alternativa al uso los combustibles fósiles (Hernández *et al.*, 2017).

Las fuentes de biomasa lignocelulósica (BLC) se pueden dividir en varios grupos, que incluyen cultivos energéticos (pastos perennes, etc.), plantas acuáticas, biomasa forestal y desechos (madera blanda y dura, aserrín, poda y residuos de adelgazamiento de la corteza), residuos agrícolas y fracción orgánica de desechos sólidos municipales (RSU) (Limayem y Ricke *et al.*, 2012). Estos recursos de biomasa parecen ser los más grandes, prometedores, abundantes y están disponibles en todo el mundo. La BLC se puede usar como materia prima de etanol sin prácticamente ningún requisito adicional de tierra o interferencia en la producción de cultivos de fibra y alimentos (Zabed *et al.* 2016). La tasa de producción de biomasa vegetal global es de aproximadamente 109 a 200 toneladas al año, donde casi 8 a 20 toneladas de la biomasa primaria siguen siendo potencialmente accesibles para producir biocombustibles (Saini *et al.*, 2015). Se ha anticipado que se pueden producir casi 442 mil millones de litros de bioetanol cada año utilizando BLC, si se consideran los residuos totales del cultivo y los cultivos desperdiciados (Sarkar *et al.*, 2012). Solo Estados Unidos genera un total de 1,368 millones de toneladas (mt) de biomasa utilizable para la producción de bioetanol, de las

cuales 428 mt provienen de desechos agrícolas, mientras que los desechos forestales (370 mt), cultivos energéticos (377 mt), granos (87 mt) y maíz (58), desechos municipales e industriales y otros desechos (48 mt) (Saini *et al.*, 2015). En la tabla 1 se muestran la composición de diversos materiales lignocelulósicos.

Tabla 1. Composición porcentual en base seca de componentes lignocelulósicos en varias BLC.

Material Lignocelulósico	Lignina (%)	Hemicelulosa (%)	Celulosa (%)
Bagazo de caña de azúcar	20	25	42
Sorgo dulce	21	27	45
Madera dura	18-25	24-40	40-55
Madera blanda	25-35	25-35	45-50
Mazorcas de maíz	15	35	45
Rastrojo de maíz	19	26	38
Paja de arroz	18	24	32.1
Cáscaras de nuez	30-40	25-30	25-30
Pasto	10-30	25-50	25-40
Paja de trigo	16-21	26-32	29-35
Residuos de plátano	14	14.8	13.2
Fibras de calabaza	15.46	17.44	66.59
Bagazo de agave	15	19	43

Fuente: Anwar *et al.*, 2014

PRODUCCIÓN DE MELÓN Y RESIDUOS DERIVADOS

El melón es un cultivo de gran importancia económica y social en México, debido a la magnitud de la superficie sembrada, altos volúmenes de producción, fuente de empleo e ingreso para los productores, así como por la generación de divisas para el país. La superficie cultivada con melón en México asciende a 19,076 ha anuales, con una producción de 543,651 toneladas (SIAP, 2017).

La Comarca Lagunera se caracteriza por ser la principal región melonera del país en algunos meses del año, y las áreas sembradas que posee representan cerca de 20% de la superficie nacional. Entre los municipios productores de melón se encuentra Matamoros, San Pedro, Torreón, Viesca, Gómez Palacio,

Lerdo, Mapimí y Tlahualilo. Matamoros y Mapimí concentran 56% de la producción total de melón obtenida en la Comarca Lagunera (SIAP-SAGARPA, 2016).

En el caso de la Comarca Lagunera las condiciones climáticas relacionadas con el agua no serían una limitante, pues la totalidad de la producción de hortalizas se obtiene bajo condiciones de riego, aunque las heladas y la presencia de plagas y enfermedades podrían ser un obstáculo para lograr que la producción sea más uniforme en el tiempo (Ramírez et al., 2014). Además, las temperaturas ambientales ideales para producir frutos sólidos y de buen sabor son entre los 18°C y 25°C. Existe una gran cantidad de variedades disponibles para la producción comercial.

En México se utilizan las de tipo cantaloupe (chino, rugoso o reticulado) y en menor proporción las de tipo liso, donde destaca la variedad Honeydew (Agenda Nacional de Investigación, Innovación y Transferencia de Tecnología 2016).

El melón es altamente perecedero por causas endógenas (reacciones enzimáticas) o bien por causas exógenas (agentes fisicoquímicos), por lo que se dispone de ellos durante períodos cortos de tiempo, los melones almacenados a 28°C a los dos días se puede observar la presencia de hongos, deformaciones, y cuarteaduras. Las cuarteaduras principalmente se presentan por desequilibrios hídricos (humedad ambiental o riego) durante la formación del fruto (Isidro-Requejo *et al.*, 2019).

El melón en ocasiones es vendido a muy bajo costo; el costo de 2 pesos por kilo de melón, no cubre los gastos de la pizca (cosecha) de este producto, y a este precio tienen pérdidas económicas de hasta 20 mil pesos por hectárea (Rodríguez, 2019).

MATERIAL RESIDUAL LIGNOCELULÓSICO

Los desechos lignocelulósicos son la fuente más abundante de biomasa no utilizada. Se componen principalmente de celulosa (30–50%), hemicelulosa (15–35%) y lignina (10–20%) (Gírio *et al.*, 2010). Las celulosas y hemicelulosas

corresponden aproximadamente al 70% de la biomasa completa y están estrechamente unidas a la lignina a través de enlaces covalentes e hidrogénicos que hacen que la estructura sea muy robusta y resistente a cualquier tipo de hidrólisis (Limayem y Ricke 2012). Esta naturaleza altamente recalcitrante está relacionada con la presencia de lignina, el grado de cristalinidad de la celulosa, el grado de polimerización de los polisacáridos, el área de superficie disponible y el contenido de humedad (Van Dyk y Pletschke 2012). Además, se pueden encontrar otros componentes en menor medida, como la espectina, proteínas, extractos y cenizas (Gírio *et al.*, 2010). Estos compuestos están presentes en la pared celular y en la lámina media de las paredes celulares de las plantas. En general, la pared celular de la planta está compuesta de distintas capas y puede ser subdividida como paredes primarias (PW) y secundarias (SW). La distribución de celulosa, hemicelulosa y lignina varía considerablemente entre estas capas. La PW es generalmente muy delgada y está compuesta por fibras de celulosa en una matriz de pectina y hemicelulosa. La SW se compone de tres capas, SW1, SW2 y SW3, donde SW2 (que comprende la mayor parte de la pared celular) suele ser más gruesa que las demás y contiene la mayor parte de la celulosa (aproximadamente el 70%). La lámina media, que une las células adyacentes, está casi completamente compuesta de lignina (Gibson *et al.*, 2012). A continuación, se describirá la estructura de los principales componentes de los desechos lignocelulósicos.

Celulosa

El componente más predominante que se encuentra en todas las paredes celulares de las plantas es la celulosa. Es un homopolímero lineal de monómeros de D-glucosa unidos por enlaces 1,4-glucosídicos que pueden contener más de 10,000 unidades de glucosa (Cheng y Timilsina, 2011). Las cadenas de celulosa están reticuladas por fuertes enlaces de hidrógeno para formar microfibras de celulosa (3-4 nm de diámetro). Estas microfibras se unen entre sí, junto con hemicelulosa y pectina, para formar macrofibras (10-25 nm

de diámetro) las cuales exhiben regiones cristalinas, que son muy recalcitrantes a la degradación y pequeñas partes amorfas, que son más fáciles de degradar (Gibson *et al.*, 2012). La orientación de las microfibras de celulosa en la pared celular secundaria tiene un fuerte efecto sobre las propiedades estructurales de varios tipos de plantas, las microfibrillas de celulosa están presentes en la pared celular secundaria, generalmente incrustadas en una matriz amorfa de hemicelulosas y lignina (Huber *et al.*, 2012). Estas microfibrillas en la matriz se asocian a menudo en la forma de paquetes de fibrillas de fósforo (Menon y Rao, 2012), y la lignina y la hemicelulosa llenan los espacios entre microfibras de celulosa en las paredes celulares primarias y secundarias, así como las láminas medias (Eriksson y Bermek, 2009). El alto peso molecular y la estructura terciaria ordenada hacen que la celulosa natural sea insoluble en agua. Aunque los materiales con almidón requieren temperaturas de solo 60–70°C para convertirse de forma cristalina a amorfa (Limayem y Ricke, 2012).

Hemicelulosa

La hemicelulosa es otro polisacárido que se encuentra en abundancia en las paredes celulares de las plantas. Es un heteropolímero ramificado complejo, de azúcares y derivados de azúcar que forman una red altamente ramificada. Consiste en aproximadamente 100–200 unidades de azúcar típicamente compuestas de diferentes monosacáridos que incluyen hexosas (D-glucosa, D-galactosa y D-manosa), pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y/o azúcares ácidos, como, ácidos D-glucurónico, D-galacturónico y 4-O-metil-D-glucurónico (Limayem y Ricke, 2012). Otros azúcares como α -L-ramnosa y α -L-fucosa también pueden estar presentes en la matriz, y los grupos hidroxilo de azúcares pueden estar parcialmente sustituidos con grupos acetilo (Gírio *et al.*, 2010). Los xilanos son los principales componentes de la hemicelulosa de las paredes celulares secundarias, su cadena principal está compuesta de residuos D-xilosa (casi 90%) unidos por enlaces β -1,4-glucosídicos (Limayem y Ricke, 2012).

Lignina

La lignina es otra molécula altamente polimerizada (Aitken *et al.*, 2012). Es un biopolímero aromático reticulado hidrofóbico complejo, con un peso molecular de 10,000 Da (Limayem y Ricke, 2012), compuesto por tres componentes fenólicos principales: p-cumaril, coniferil y alcohol sinapil (Menon y Rao *et al.*, 2012). Las cortezas de madera blanda tienen el nivel más alto de lignina (30–60%) seguidas de las cortezas de madera dura (30–55%), mientras que los pastos y los residuos agrícolas contienen el nivel más bajo de lignina (10–30% y 3–15%, respectivamente) (Demirbas *et al.*, 2005).

Por otro lado, es importante mencionar que esta materia prima es promisoría en la producción de bioetanol de 2da generación. El proceso de producción de bioetanol de 2da generación consiste en: 1) Molienda de la biomasa, 2) Pretratamiento, 3) Hidrolisis enzimática, 4) Fermentación, 5) Destilación (Bardales *et al.*, 2015).

PRETRATAMIENTO TÉRMICO

El pretratamiento consiste en el fraccionamiento de la biomasa en sus componentes principales (celulosa, hemicelulosa y lignina) para facilitar el posterior ataque enzimático y microbiano. El pretratamiento facilita el acceso a la biomasa al reducir el ordenamiento de la celulosa (cristalinidad), aumentar el tamaño de poro y el área de superficie de la celulosa, modificar la estructura de la lignina y solubilizar total o parcialmente la hemicelulosa. Se ha desarrollado una diversidad de métodos de pretratamiento, que incluyen procesos físicos, fisicoquímicos, químicos y biológicos (Aditiya *et al.*, 2016). El pretratamiento físico consiste en la conminución de la biomasa lignocelulósica con el objetivo de reducir el tamaño de partícula y la cristalinidad de la biomasa mediante métodos mecánicos como la molienda o astillado (Talebnia *et al.*, 2010). Las estrategias fisicoquímicas más utilizadas son el agua caliente líquida (LHW, por sus siglas en inglés), la explosión de vapor, el pretratamiento con microondas (Alvira *et al.*, 2010). El pretratamiento LHW se lleva a cabo solo con agua y sin catalizadores ni productos químicos adicionales. El agua se calienta a

temperaturas elevadas mientras se aplica una presión lo suficientemente alta como para mantener el agua en estado líquido (Tabla 2). Este proceso provoca alteraciones en la estructura de la lignocelulosa, principalmente a través de la eliminación de la hemicelulosa. Después del pretratamiento, la suspensión formada puede filtrarse en una fracción enriquecida con celulosa sólida y una fracción líquida rica en hemicelulosa. Este proceso es un método de pretratamiento hidrotérmico que se ha utilizado durante varias décadas como parte de la industria (Taherzadeh y Karimi, 2008).

La fracción líquida consiste principalmente en oligosacáridos derivados de hemicelulosa (35-60% de la materia prima), con una pequeña cantidad de celulosa (4-15% del material de partida) (Brodeur *et al.*, 2011). Para evitar que los compuestos inhibidores afecten la hidrólisis enzimática y la fermentación, se desea que la mayor cantidad de lignina posible se solubilice y elimine también con esta fracción líquida. La principal ventaja del sistema de LHW es el potencial ahorro de costos involucrado. Debido a que no se requiere catalizador, así como a las bajas cantidades de corrosión que ocurren durante el proceso, puede tener costos iniciales y de mantenimiento más bajos en comparación con algunos otros métodos de pretratamiento que involucran productos químicos agresivos (Aditya *et al.*, 2016). La conversión biológica de biomasa lignocelulósica a azúcares simples está constituida de dos pasos básicos, que constan de un pretratamiento físico o químico de los residuos, y de la hidrólisis enzimática de los mismos (Aditya *et al.*, 2016).

Tabla 2. Tratamientos LHW a diferentes residuos lignocelulósicos

Tipo de residuo	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Referencia
Mazorca de maíz	170	3	Wan y Li, 2011
Paja de trigo	170	3	Wan y Li, 2011
Paja de soja	170	3	Wan y Li, 2011
Bagazo de caña	200	5-20	Imman <i>et al.</i> , 2013
Paja de arroz	200	5-20	Imman <i>et al.</i> , 2013
Mazorca de maíz	200	5-20	Imman <i>et al.</i> , 2013
Fruta de palma	200	5-20	Imman <i>et al.</i> , 2013
Eucalipto	180	20	Weiqi <i>et al.</i> , 2013

HIDROLISIS ENZIMÁTICA

La hidrólisis enzimática de la celulosa es un sistema de reacción heterogéneo en el que las celulasas en un entorno acuoso reaccionan con los sólidos pretratados insolubles, particularmente la celulosa estructurada (Gutierrez-Rojas *et al.*, 2015). La hidrólisis enzimática se lleva a cabo en condiciones suaves de temperatura (40-50°C) y pH (4.5-5.0). La hidrólisis enzimática es un proceso respetuoso con el medio ambiente, ya que evita la producción de grandes cantidades de aguas residuales asociadas con el uso de hidrólisis ácida o alcalina y no es necesario utilizar equipos resistentes a la corrosión (Brummer *et al.* 2014).

Los organismos capaces de degradar celulosa secretan un complejo de celulasas con diferentes especificidades y modos de acción. Este complejo incluye endoglucanasas (endo-1,4- β -glucanasas), celobiohidrolasas o exoglucanasas y β -glucosidasas (Castrillo *et al.*, 2015).

La lignina es degradada por la interacción de diversas enzimas extracelulares, principalmente fenoloxidasas (lacasas) y peroxidasas (manganeso-peroxidasa y ligninaperoxidasa) (Barreto *et al.*, 2011) produciendo compuestos fenólicos tales como ácido ferúlico, ácido vanílico, entre otros, y alcoholes como guaiacol y catecol (Ibraheem y Ndimba, 2013).

El xilano es la cadena principal de la hemicelulosa, la β -1,4-endoxilanasas y la β -xilosidasa son las enzimas responsables de la hidrólisis de la cadena principal y representan los componentes primordiales del sistema xilanolítico (Dashtban *et al.*, 2009).

HONGOS LIGNOCELULOLÍTICOS

Existe un gran interés por el uso de enzimas lignocelulolíticas en varias industrias, y en la biodegradación de biomasa para la producción de biocombustibles y otras aplicaciones. Entre las fuentes microbianas de enzimas, *Aspergillus niger* es uno de los microorganismos más utilizados en la producción de enzimas industriales, debido a sus niveles altos de secreción de proteína y a su condición GRAS (generally regarded as safe) (Izarra *et al.*, 2010).

FERMENTACIÓN

Desde el punto de vista biotecnológico, el término fermentación se define como un proceso en el que los microorganismos producen biomasa y metabolitos a partir de sustancias orgánicas (Suarez y Nieto, 2013).

La fermentación alcohólica es un proceso biológico generado por una oxidación incompleta bajo condiciones anaerobias, es un proceso de transformación o descomposición química de hidratos de carbonos (por lo general azúcares: como la glucosa, la fructosa, la sacarosa, el almidón, etc.), en presencia de un microorganismo, bacteria o levadura para obtener como producto final alcohol en forma de etanol, dióxido de carbono (CO₂). Además, se da la formación de otros compuestos orgánicos (El-Mansi *et al.*, 2012).

Fermentación en medio líquido

El uso de la fermentación en medio líquido simplifica la generación de productos, los sustratos son solubles en el medio, los parámetros como la temperatura, aireación, temperatura y pH son fácilmente controlables en

comparación con la fermentación en estado sólido (Castañeda-Casasola *et al.*, 2018).

ESTRATEGIA DE SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA

El proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SFS) combina la hidrólisis de la BLC con la fermentación en un único reactor. Posee ventajas en comparación con el proceso de hidrólisis y fermentación sucesivas, dado que los azúcares producidos durante la hidrólisis son consumidos de inmediato por las levaduras, evitando los problemas de acumulación de azúcares y contaminación bacteriana (Area y Vallejos, 2012). Otras ventajas de la SFS son la disminución de costos, producida al utilizar un solo fermentador en el proceso y la disminución de tiempo de procesamiento y volumen del reactor (Balat, 2011). Esta metodología es ampliamente utilizada en la producción de bioetanol de segunda generación.

BIOETANOL

Los problemas actuales del agotamiento de la reserva de combustibles fósiles y los cambios ambientales han aumentado la preocupación por la búsqueda de energías renovables sostenibles para las generaciones futuras. Los biocombustibles surgieron como una alternativa viable prometedora para reemplazar los combustibles fósiles existentes. Entre estos, el bioetanol se destaca debido a su capacidad para sustituir la gasolina. Sin embargo, el principal desafío en la industria del bioetanol es la necesidad de descubrir una materia prima adecuada junto con un enfoque respetuoso con el medio ambiente y un proceso de producción económicamente factible (Jambo *et al.*, 2016).

GENERACIONES DEL BIOETANOL

Actualmente, hay tres generaciones de bioetanol que han prosperado en base a diferentes materias primas. El bioetanol de primera generación se deriva de la fermentación de glucosa contenida en almidón y cultivos de azúcar (Ribeiro,

2013). Estados Unidos y Brasil son los principales productores de bioetanol en todo el mundo que utilizan maíz y caña de azúcar, mientras que la patata, el trigo y la remolacha azucarera son la materia prima común para el bioetanol en Europa (Havlik *et al.*, 2011). Sin embargo, el principal inconveniente del bioetanol de primera generación es la amenaza de limitación en el suministro de alimentos que puede afectar a la población mundial humana, ya que la materia prima se deriva de las fuentes de alimentos (Arifin *et al.*, 2014). Millones de personas en todo el mundo padecen hambre, desnutrición y, además, la utilización de los recursos alimentarios como combustible puede conducir a un aumento de los precios de los alimentos (Gomez *et al.*, 2011). Ritslaid *et al.* (2010) especificó que el bioetanol de primera generación no es económicamente razonable, ya que el contenido de carbono de las plantas se pierde principalmente durante el proceso de conversión. Teniendo en cuenta esta limitación, los investigadores han presentado una idea que era más eficiente tecnológicamente y versátil, que es el bioetanol de segunda generación (Gabriel y El-Halwagi, 2013).

El término "bioetanol de segunda generación" surgió para superar la disputa de "alimentos versus combustible" que enfrenta el bioetanol de primera generación (Subhadra, 2010). El bioetanol de segunda generación, también conocido como "biocombustibles avanzados", se produce mediante procesos innovadores que utilizan principalmente materia prima lignocelulósica, residuos forestales y agrícolas (Mohr y Raman, 2013). Las ventajas de estas materias primas son la facilidad de disponibilidad, que no compite con los alimentos y, por lo tanto, tiene un impacto mucho menor en el medio ambiente (Jambo *et al.*, 2016).

El bioetanol de tercera generación se centra en el uso de organismos marinos como las algas (Jambo *et al.*, 2016).

UTILIZACIÓN DE RESIDUOS PARA BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN

Las plantas utilizan la energía solar capturada durante la fotosíntesis para producir moléculas de carbono que funcionan como soportes estructurales (hemicelulosa y celulosa). Las moléculas más complejas como la celulosa y la

hemicelulosa se pueden procesar química y enzimáticamente para producir sus monómeros, que son glucosa (seis carbonos) y xilosa (cinco carbonos), respectivamente (Zamora-Hernández *et al.*, 2014). La glucosa se puede utilizar por la levadura del pan (*Saccharomyces cerevisiae*) durante la glicólisis y la fermentación para sintetizar etanol de manera anaerobia. La xilosa no puede ser utilizada por cepas silvestres de *S. cerevisiae*, pero sí por otras levaduras como las del género *Pichia*, o por cepas transgénicas de *S. cerevisiae*. Para la producción de bioetanol, la cepa fermentativa más común es la *Saccharomyces cerevisiae* (Arismendy *et al.*, 2015) Tabla 3.

Tabla 3. Residuos como sustrato y microorganismos utilizados para la producción de bioetanol.

Residuo tratado	Microorganismo	Referencia
Cascara cítricos	<i>S. cerevisiae</i>	Choi <i>et al.</i> , 2015
Cáscara de naranja	<i>Escherichia coli</i> KO11	Grohmann <i>et al.</i> , 1994
Cáscara de naranja	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Widmer <i>et al.</i> , 2009
Cascara de plátano	<i>S. cerevisiae</i>	Choi <i>et al.</i> , 2015
Cascara de Pera	<i>S. cerevisiae</i>	Choi <i>et al.</i> , 2015
Pulpa de Manzana	<i>S. cerevisiae</i>	Choi <i>et al.</i> , 2015
Piña	<i>Saccharomyces bayanus</i>	Seguí y Fito, 2017
Seudo tallo de platano	<i>S. cerevisiae</i>	Ingale <i>et al.</i> , 2014
Pulpa de manzana	<i>Aspergillus sojae</i> , <i>T. harzianum</i>	Evcan y Tari, 2015
Hojas de caña	<i>S. cerevisiae</i>	Zamora-Hernández <i>et al.</i> , 2014
Papel reciclado	<i>S. cerevisiae</i>	Zamora-Hernández <i>et al.</i> , 2014

MATERIALES Y MÉTODOS

UBICACIÓN

El desarrollo de la investigación se realizó en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en el grupo de Biorrefinería del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Químicas en la Universidad Autónoma de Coahuila.

Esta investigación constó de cinco etapas: en la primera se realizó la caracterización de materia prima; la segunda etapa consta en la producción del extracto enzimático; en la tercera se realizó el pretratamiento hidrotérmico LHW; en la cuarta se realizó la hidrólisis enzimática; y en la quinta etapa se hizo la producción de bioetanol.

MELÓN COMO MATERIA PRIMA

El Melón fue proporcionado por productores de Paila, Coahuila, México. El residuo se secó a 65°C durante 62 h, se molió y tamizó en mallas #8 (2.38 mm), #12 (1.68 mm) y #20 (0.841 mm). El material se almacenó herméticamente en bolsas de plástico a temperatura ambiente para su posterior análisis y experimentación. Se le midieron azúcares totales (Dubois *et al.*, 1956), azúcares reductores (Miller, 1959), y se realizó el perfil de monosacáridos por HPLC y análisis de fibra detergente.

PRETRATAMIENTO HIDROTÉRMICO LHW Y DISEÑO EXPERIMENTAL

El pretratamiento consistió en probar temperaturas cercanas a la evaporación del agua (90, 100 y 110°C) considerando un menor gasto de energía y en un futuro, permitir un proceso simultáneo con enzimas lignocelulolíticas.

Se realizó un diseño experimental ortogonal mediante la metodología de Taguchi, obteniendo 9 tratamientos. Se analizaron 3 factores, en tres niveles cada uno (tiempo: 5, 10 y 20 min; temperatura: 90, 100 y 110°C; y No. de malla de tamizado: #8 (2.38-3.35 mm), #12 (2.00-2.38 mm) y #20 (1.68-2.00 mm). Los factores se corrieron en el programa Qualitek-4 (Tabla 4). Se sometió a tratamiento de LHW. En el biorreactor, se añadieron 5 g de muestra de melón

seco. A la fracción sólida (cascara y semilla) se le midieron azúcares totales y reductores, así como la fibra cruda, fibra detergente neutra y fibra detergente ácida. La fracción líquida recuperada de la hidrólisis se le realizó la medición de azúcares totales y reductores.

Tabla 4. Arreglo de tratamientos del Diseño Experimental ortogonal.

Tratamientos	Temperatura (°C)	No. Malla	Tiempo (min)
T1	90	8	5
T2	90	12	10
T3	90	20	20
T4	100	8	10
T5	100	12	20
T6	100	20	5
T7	110	8	20
T8	110	12	5
T9	110	20	10

FERMENTACIÓN LÍQUIDA PARA LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS

La cepa *A. niger* M4 fue cultivada en medio Czapek-Dox modificado, integrado por (g/l): extracto de levadura (Bioxon, Becton Dickinson de Mexico) (7.65), KH_2PO_4 (Jalmex Científica SA de CV) (3.04), KCl (Jalmex Científica SA de CV) (1.52), MgSO_4 (Jalmex Científica SA de CV) (1.52) y se añadieron 5 g de melón seco. Se añadieron 50 ml de medio a matraces de 250 ml y se inoculó con 1×10^6 esp/ml de *A. niger* M4. La cepa fue proporcionada por el Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Los matraces se incubaron a 30°C (Incubadora orbital INO 650V-7) durante 240 horas y se evaluó cada 24 horas. Se realizaron muestras destructivas de cada matraz a los tiempos evaluados y se les determinó proteína soluble (Bradford, 1976), azúcares totales y reductores. Los resultados fueron expresados como la media de tres repeticiones, mostrando la desviación estándar pertinente.

CARACTERIZACIÓN DE ENZIMAS

El extracto enzimático obtenido de la fermentación líquida se utilizó en los experimentos como complejo enzimático. Con una concentración de proteínas de 2.07 mg/ml.

PRODUCCIÓN DE ETANOL

Pre-inoculo de la levadura

Se utilizó el medio de cultivo YDP al cual se le agregó a un matraz Erlenmeyer de 250 ml extracto de levadura (Bioxon, Becton Dickinson de Mexico) 10 g/l, Peptona de caseína (Bioxon, Becton Dickinson de Mexico) 10 g/l, Dextrosa (MCD-LAB) 50 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (SIGMA-ALDRICH) 0.5 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Eisen-Golden Laboratories) 0.5 g/l y Levadura *Saccharomyces cerevisiae* Lallemand^{MR} Austria. Posteriormente se incubó (Incubadora orbital INO 650V-7) por 16 horas a 150 rpm a un pH de 4.8 a 35°C. Una vez terminado el periodo de incubación, se le agregaron 5 ml de solución salina 8.5 g/l (Cloruro de sodio Faga Lab ®) y de la mezcla se tomó 3 ml de células suspendidas de levadura para la siguiente fase experimental (González *et al.*, 2019).

Sacarificación y Fermentación Simultánea (SFS)

El proceso de SFS se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: se agregó al medio de cultivo Buffer citrato 1M, pH 4.5, extracto de levadura 10 g/l (Bioxon, Becton Dickinson de Mexico), medio Peptona de cisteína 20 g/l (Bioxon, Becton Dickinson de Mexico), se homogenizó perfectamente y se esterilizó en autoclave (Yamato Scientific SK101C) a 120°C durante 15 minutos. Posterior a la esterilización y bajo condiciones estériles, se agregó el melón pretratado 1% (v/v), del complejo enzimático (10 ml) se tomó muestra de 2 ml y el inóculo de la levadura a concentración de 0.1% (v/v). Se incubó a 150 rpm a 35°C (Incubadora orbital INO 650V-7). Se tomaron muestras de 2 ml a 12, 24, 48 y 72 horas para cuantificación de azúcares (González *et al.*, 2019).

El rendimiento de etanol se calculó utilizando la ecuación:

$$\text{Rendimiento de etanol} = 100 \frac{\text{EtOH}^f}{1.111f[\text{biomasa}] \times 0.511}$$

Donde EtOH^f es la concentración más alta de etanol (g/l) lograda en el experimento, la expresión del denominador corresponde a la concentración teórica de etanol, 1.111f [biomasa] es el potencial glucosa en ensayos de sacarificación y 0.511 es el factor de conversión para glucosa a etanol (Aguilar-Reynosa *et al.*, 2017).

MÉTODO ANALÍTICO

Para la determinación de proteínas se utilizó el método de Bradford, (1976). El reactivo se preparó disolviendo 100 mg del colorante Azul de Comassie G-250 (SIGMA-ALDRICH) en 50 ml de etanol (Jalmek científica) al 95%. Se agregaron 100 ml de ácido fosfórico (J.T.Baker) 85% (p/v). La solución se diluyó en agua destilada y se aforó a 1 litro, el reactivo se mantuvo protegido de la luz y se filtró antes de usar. El ensayo se realizó colocando en un tubo de ensaye 0.100 ml de muestra, posteriormente se agregan 5 ml de agua destilada, se agitó y se dejó reposar, y finalmente se midió la absorbancia a 595 nm (BIOBASE-EL10A).

Los contenidos de celulosa, hemicelulosa y lignina del melón (cascara y semilla) fueron determinados por el método de fibra detergente. Consistió en añadir 1 g de melón a bolsas filtro (ANKOM Technology), para realizar la fibra detergente cruda. Las bolsas filtro se desgrasaron por 10 min con éter de petróleo (Jalmek científica) y se introdujeron en el Instrumento de digestión ANKOM200 (ANKOM Technology) con agitación a 65 rpm. Se vertió solución ácida (H₂SO₄; ANKOM Technology) y se puso en agitación y calentamiento dentro del equipo ANKOM200 por 40 min, después se sacaron y se secaron (Biobase Biodustry BOV-T70C) por 2 horas y se metieron en acetona (Jalmek científica) por 10 min para desgrasar. Se introdujeron nuevamente al instrumento de digestión ANKOM200, ahora con la solución base (NaOH; ANKOM Technology), se pusieron en agitación y calentamiento por 40 min, posteriormente se colocaron en la secadora (Biobase Biodustry BOV-T70C) por dos horas.

Se realizó la fibra detergente neutra, desgrasando la bolsa con acetona (Jalmek científica) por 10 min y colocándola en el instrumento de digestión ANKOM200. Se añadió solución detergente neutra (solución química premezclada ANKOM Technology), sulfito de sodio (Jalmek científica) y alfa-amilasa (ANKOM Technology) en el recipiente. Se puso en agitación y calentamiento por 45 min, se repitió el secado.

Para la fibra detergente ácida, se desgrasaron y colocaron las muestras en el recipiente, se añadió solución detergente ácida (solución química premezclada ANKOM Technology), se procesaron por 60 min con agitación y calentamiento. Enseguida se secaron y finalmente se incineraron en mufla (BIOBASE Biodustry MB4-10) a 600°C por 2 horas. Esto se realizó para saber qué porcentaje de lignina, hemicelulosa y celulosa están presentes en la fracción de desechos de melón seca (Van Soest *et al.*, 1991).

El contenido de glucosa, xilosa, arabinosa y etanol fueron cuantificados por HPLC (Agilent technology 1200 series Quaternary). Todas las muestras fueron filtradas a través de un filtro nylon desechable de 0.22 μm antes de inyectarse al equipo. Las muestras (Fase estacionaria) fueron analizadas en una columna Rezex RCM monosaccharide marca Phenomenex. La temperatura fue de 80°C y como fase móvil (eluyente), fue utilizado ácido sulfúrico 5M (Jalmek científica) (González *et al.*, 2019).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el procesamiento de los datos se utilizó el paquete Statistical Analysis Systems (SAS) versión 9.0. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de comparación de medias Tukey ($p \leq 0.05$). Todos los análisis fueron realizados por triplicado y se muestran las medias aritméticas, así como su desviación estándar correspondiente.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

COMPOSICIÓN DEL MELÓN COMO MATERIA PRIMA

Los resultados de la caracterización química de los residuos de melón seco sin tratamiento hidrotérmico LHW se muestran en la Tabla 5. Las muestras presentan un contenido de azúcares totales y reductores derivado de su naturaleza frutícola, destacando los contenidos de glucosa y xilosa, monosacáridos que pueden ser empleados en la fermentación alcohólica. Montoro *et al*, (2015) menciona que en la caracterización del melón encontró 73.4 mg/l de azúcares totales.

Tabla 5. Caracterización química del melón seco sin tratamiento Hidrotérmico (LHW):

Determinación	Concentración (mg/l)
Azúcares totales	57.975±0.1
Azúcares reductores	12.162±0.1
Glucosa	0.774±0.2
Xilosa	0.639±0.1

La composición lignocelulósica por tamaño de partícula de los residuos de melón sin tratamiento LHW se muestran en la Tabla 6. El componente mayoritario de los residuos de melón es la hemicelulosa, seguido por lignina y celulosa, lo que generaría una mayor cantidad de pentosas, derivadas de la hidrólisis de hemicelulosa.

Por otra parte, el tamaño de partícula afecta el contenido lignocelulósico presente en el melón, teniendo un impacto favorable en la disminución del contenido de lignina, lo que permite exponer más a la celulosa. Niño *et al.*, (2013) menciona que disminuir el tamaño de las partículas aumenta el área de superficie específica, se obtiene mayor liberación de azúcares, esto se debe a que el proceso de molienda del material vegetal permite incrementar su

accesibilidad, siendo este uno de los factores más importantes que determinan la facilidad de la hidrólisis de un sustrato lignocelulósico.

Tabla 6. Contenido químico en base seca (% , p/p) de la biomasa lignocelulósica según el tamaño de partícula de los residuos de melón seco.

Diámetro de partícula (mm)	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina
2.38	3%±0.02	25%±0.05	20%±0.07
1.68	6%±0.03	25%±0.05	16%±0.06
0.841	13%±0.1	15%±0.04	10%±0.03

PRODUCCIÓN DE EXTRACTO ENZIMÁTICO MEDIANTE FML

En la figura 1 se muestra la cinética de los azúcares totales y reductores durante el proceso fermentativo para la obtención del extracto enzimático. Se observa una importante disminución de los azúcares totales dentro de las primeras 48 horas, posiblemente debido a la hidrólisis por parte del microorganismo en busca de fuentes de carbono monoméricas y de fácil asimilación. La tendencia de disminución en la concentración de azúcares totales se mantiene desde las 48 horas hasta las 240 horas, donde se alcanza una reducción del 75%, mostrando que el hongo *Aspergillus niger* en condiciones de 30°C presenta la maquinaria enzimática para degradar los residuos de melón, conformados por carbohidratos complejos lignocelulósicos y carbohidratos de fácil asimilación. La temperatura óptima para *A. niger* es de 30 °C para su crecimiento y producción de enzimas (Bansal *et al.*, 2012).

En cuanto a la cinética de azúcares reductores durante el proceso fermentativo, se observa una disminución en las primeras 24 horas, manteniendo un promedio de 3.7 mg/ml entre las 24 y 96 horas de fermentación, lo que representa que el microorganismo está asimilando los monosacáridos para metabolizarlos y estimular el crecimiento celular. A las 120 horas de fermentación se presenta un incremento en la concentración de azúcares reductores, manteniendo un promedio de 8.2 mg/ml entre las 120 y las 216

horas de fermentación, con una tendencia de disminución hacia las 240 horas. Este incremento en el contenido de azúcares reductores se puede deber a la acumulación de disacáridos y monosacáridos derivados de la degradación de los polisacáridos presentes en la matriz vegetal, e incluso a grupos reductores en las terminaciones de los polímeros hidrolizados (Baskan *et al.*, 2016). Es sabido que el hongo *Aspergillus niger* es un microorganismo que degrada los polisacáridos de la pared celular de plantas y es capaz de producir celulasas (Florencio *et al.*, 2016; Patyshakuliyeva *et al.*, 2016; Abdullah *et al.*, 2018), xilanasas y lacasas (Romero-Cortez *et al.*, 2019).

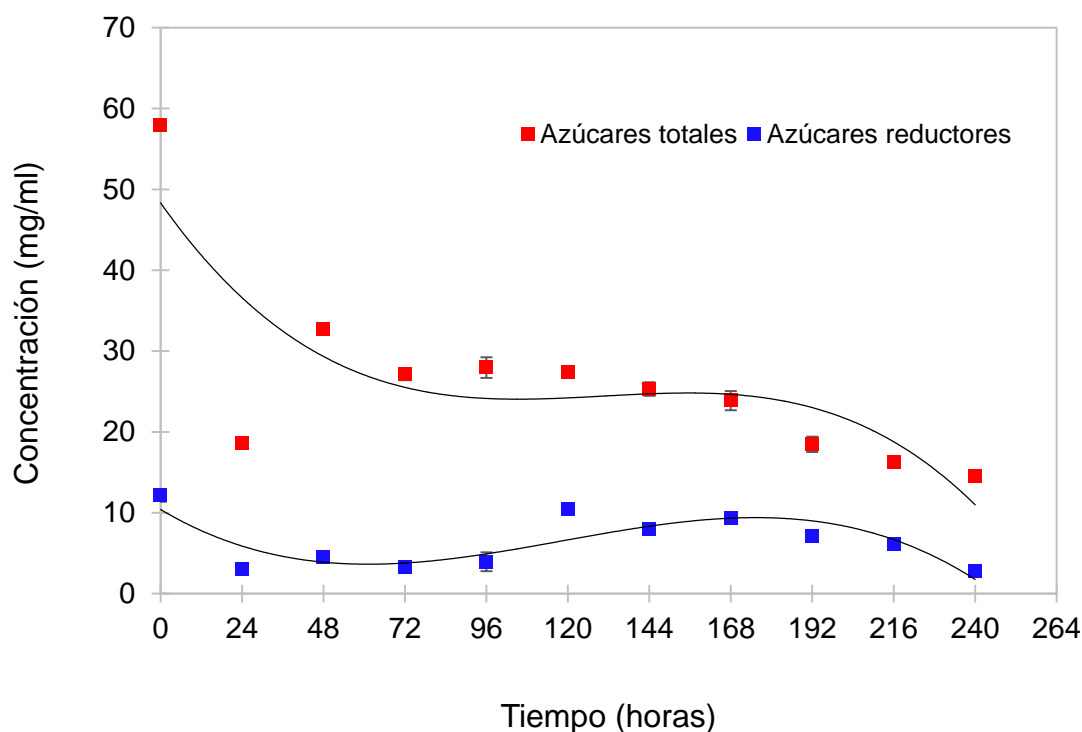


Figura 1. Comportamiento cinético de azúcares totales y reductores durante el proceso de fermentación líquida de los residuos de melón deshidratados. Los puntos representan la media de los valores experimentales y las barras la desviación estándar.

El perfil de monosacáridos derivado de la cinética de fermentación de los residuos de melón se muestra en la figura 2. Se observa que de los tres monosacáridos evaluados (glucosa, xilosa y arabinosa) la glucosa mostró mayores valores (3.70 ± 0.016 g/l) a las 96 horas de fermentación. Los valores

obtenidos nos indican que el microorganismo es capaz de hidrolizar enzimáticamente los residuos lignocelulósicos y obtener glucosa como fuente de carbono para sus funciones metabólicas. Cabe destacar que, aunque el mayor monosacárido cuantificado es la glucosa, también se presentan cantidades de xilosa (0.35 ± 0.017 g/l) y arabinosa (0.076 ± 0.001 g/l) obteniendo sus valores máximos a las 72 horas.

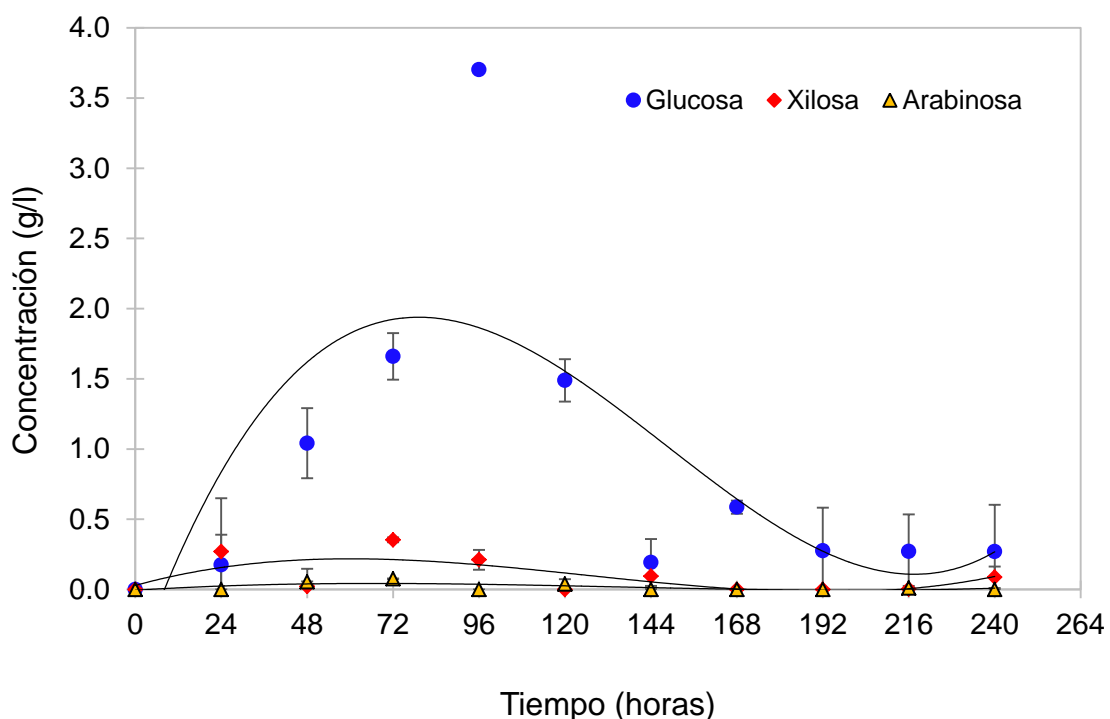


Figura 2. Comportamiento cinético del perfil de monosacáridos durante el proceso de fermentación líquida de los residuos de melón deshidratados. Los puntos representan la media de los valores experimentales y las barras la desviación estándar.

El método de unión del pigmento a la proteína (Bradford, 1976) conlleva un proceso simple, estable y sensible de interacción colorante-proteína y puede ser empleado en la estimación de los procesos metabólicos de los microorganismos (Córdova-López y col., 1996; Adekunle y col., 2017; Inca-Torres y col., 2018). La determinación indirecta de biomasa de *Aspergillus niger*, se expresó en concentración de proteína en mg/ml promedios, observándose una tendencia creciente en relación al tiempo de incubación, con un valor máximo de 2.07

mg/ml a las 240 horas de evaluación (Figura 3). Llenque-Díaz *et al.* (2015) menciona que la producción de celulasas por *A. niger* se incrementó significativamente en la medida que aumentaba las horas de incubación en el biorreactor en las condiciones de ensayo. En un estudio para evaluar el potencial de los residuos de melón como sustrato en un cultivo semisólido para la bioproducción de celulasas y el potencial prebiótico *in vitro*, Rolim *et al.*, (2018) mostraron la capacidad de crecimiento y generación de celulasas a partir del hongo *Aspergillus oryzae*.

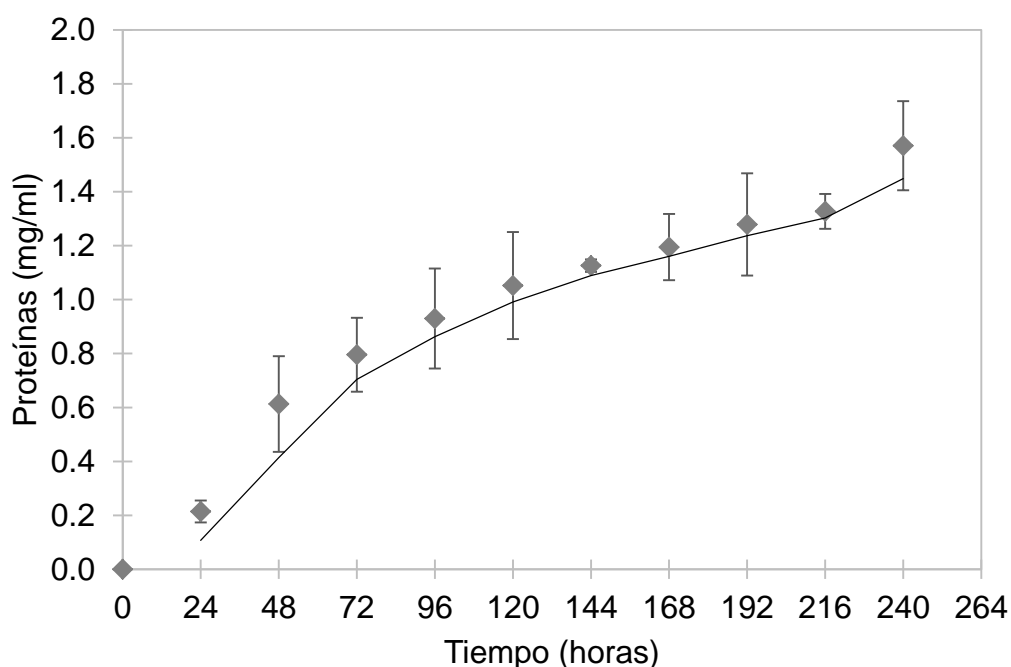


Figura 3. Comportamiento cinético del contenido de proteínas durante el proceso de fermentación líquida de los residuos de melón deshidratados. Los puntos representan la media de los valores experimentales y las barras la desviación estándar.

ANÁLISIS EXPERIMENTAL DEL PRETRATAMIENTO LHW

Los niveles evaluados experimentalmente para poder estudiar el efecto del pretratamiento LHW presentaron perfiles de calentamiento y enfriamiento con tiempos de 30 ± 2 °C/seg y 40 ± 2 °C/seg respectivamente. La tabla 7 muestra los análisis de varianza efectuados para los azúcares totales y reductores de la fracción sólida de los tratamientos derivados del diseño ortogonal L-9. Posterior al tratamiento LHW, los factores temperatura, tamaño de partícula y tiempo en

los niveles individuales evaluados, no mostraron efectos significativos ($p \leq 0.10$) para la liberación de azúcares totales. Sin embargo, el modelo estimado por el análisis de Taguchi ($R^2 = 86.1\%$) logró determinar que el mayor efecto para incrementar los niveles de azúcares totales para la fracción sólida hidrolizada está dado por el tamaño de partícula, seguido por la temperatura del proceso (Figura 4).

Tabla 7. ANOVA del diseño Taguchi para los azúcares totales y reductores de la fracción sólida del residuo de melón tratado con LHW.

Azúcares totales	Fuente	GL	SS Sec	SS Ajust	MC Ajust	F	p
	Temperatura	2	75.90	75.90	37.952	2.39	0.295
	Partícula	2	102.38	102.38	51.191	3.23	0.237
	Tiempo	2	18.53	18.53	9.263	0.58	0.631
	Error residual	2	31.72	31.72	15.858		
	Total	8	228.53				
Azúcares reductores	Fuente	GL	SS Sec	SS Ajust	MC Ajust	F	p
	Temperatura	2	2.7250	2.7250	1.3625	10.54	0.087
	Partícula	2	0.6493	0.6493	0.3247	2.51	0.285
	Tiempo	2	1.6711	1.6711	0.8355	6.46	0.134
	Error residual	2	0.2585	0.2585	0.1293		
	Total	8	5.3040				

Para los azúcares reductores en la fracción sólida obtenida posterior al tratamiento LHW, solamente el factor temperatura, mostró un efecto significativo ($p \leq 0.10$) para la liberación de azúcares reductores. El modelo estimado por el análisis de Taguchi ($R^2 = 95.1\%$) logró determinar que el mayor efecto para incrementar los niveles de azúcares reductores para la fracción sólida hidrolizada está dado por la temperatura seguido por el tiempo de residencia del proceso (Figura 5).

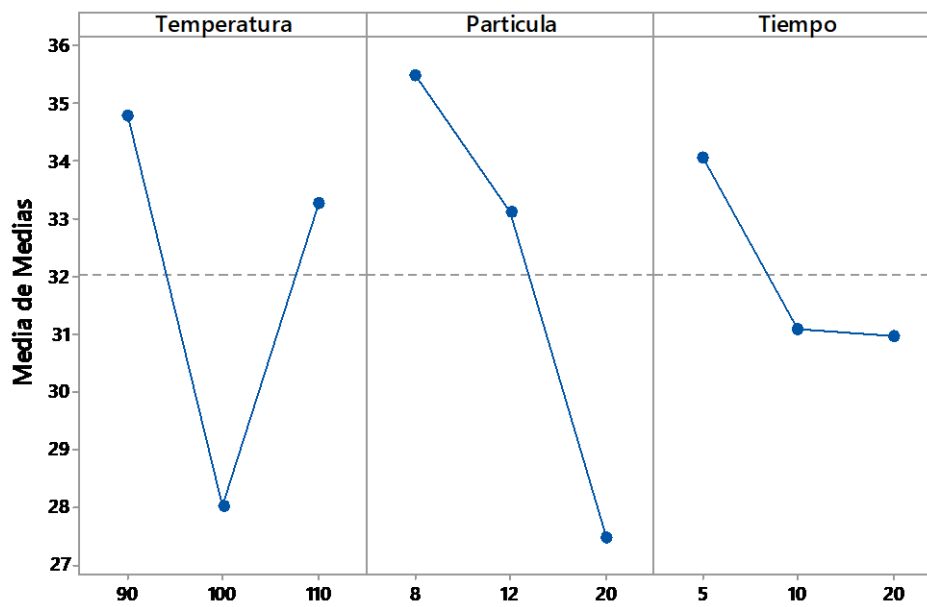


Figura 4. Efectos principales para las medias de azúcares totales liberados en la fracción sólida tratada con LHW.

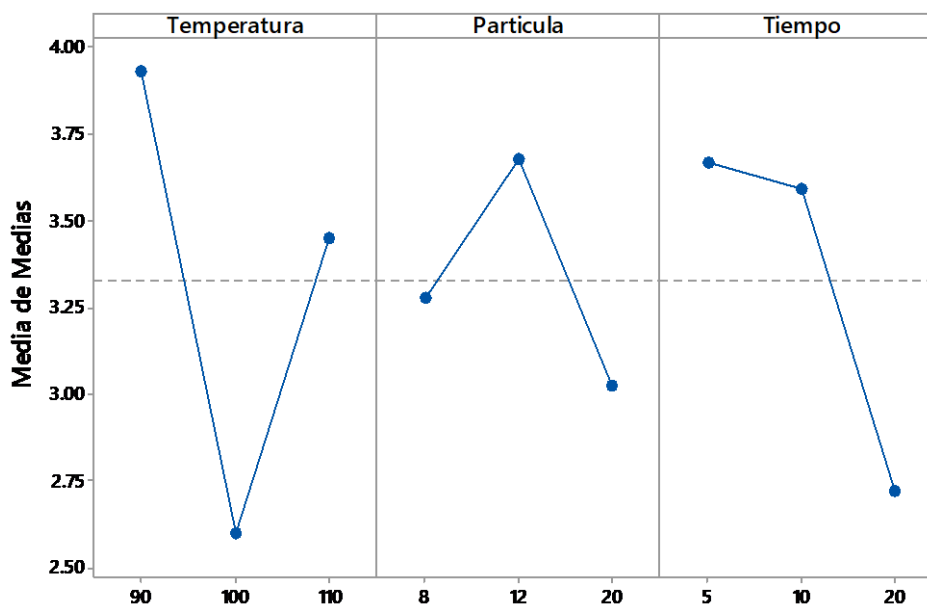


Figura 5. Efectos principales para las medias de azúcares reductores liberados en la fracción sólida tratada con LHW.

La tabla 8 muestra los análisis de varianza efectuados para los azúcares totales y reductores de la fracción líquida de los tratamientos derivados del diseño

ortogonal L-9. Dentro del análisis de la liberación de azúcares totales en la fracción líquida obtenida posterior al tratamiento LHW, el único factor que mostró efecto significativo ($p \leq 0.10$) fue el tamaño de partícula. El modelo estimado por el análisis de Taguchi ($R^2 = 94.8\%$) logró determinar que el mayor efecto para incrementar los niveles de azúcares totales para la fracción líquida hidrolizada está dado por el tamaño de partícula, seguido por el tiempo de residencia del proceso (Figura 6).

Tabla 8. ANOVA del diseño Taguchi para los azúcares totales y reductores de la fracción líquida del residuo de melón tratado con LHW.

	Fuente	GL	SS Sec	SS Ajust	MC Ajust	F	p
Azúcares totales	Temperatura	2	0.3912	0.3912	0.1956	0.15	0.871
	Partícula	2	37.2630	37.2630	18.6315	14.17	0.066
	Tiempo	2	10.7749	10.7749	5.3875	4.10	0.196
	Error residual	2	2.6304	2.6304	1.3152		
	Total	8	51.0596				
	Fuente	GL	SS Sec	SS Ajust	MC Ajust	F	p
Azúcares reductores	Temperatura	2	1.9628	1.9628	0.9814	1.12	0.471
	Partícula	2	2.5258	2.5258	1.2629	1.45	0.409
	Tiempo	2	0.5839	0.5839	0.2919	0.33	0.749
	Error residual	2	1.7452	1.7452	0.8726		
	Total	8	6.8176				

Respecto a los factores evaluados en la fracción líquida obtenida posterior al tratamiento LHW, ninguno mostró un efecto significativo ($p \leq 0.10$) para la liberación de azúcares reductores. Sin embargo, el modelo estimado por el análisis de Taguchi ($R^2 = 74.4\%$) logró determinar que el mayor efecto para incrementar los niveles de azúcares totales para la fracción sólida hidrolizada está dado por el tamaño de partícula, seguido por la temperatura del proceso (Figura 7).

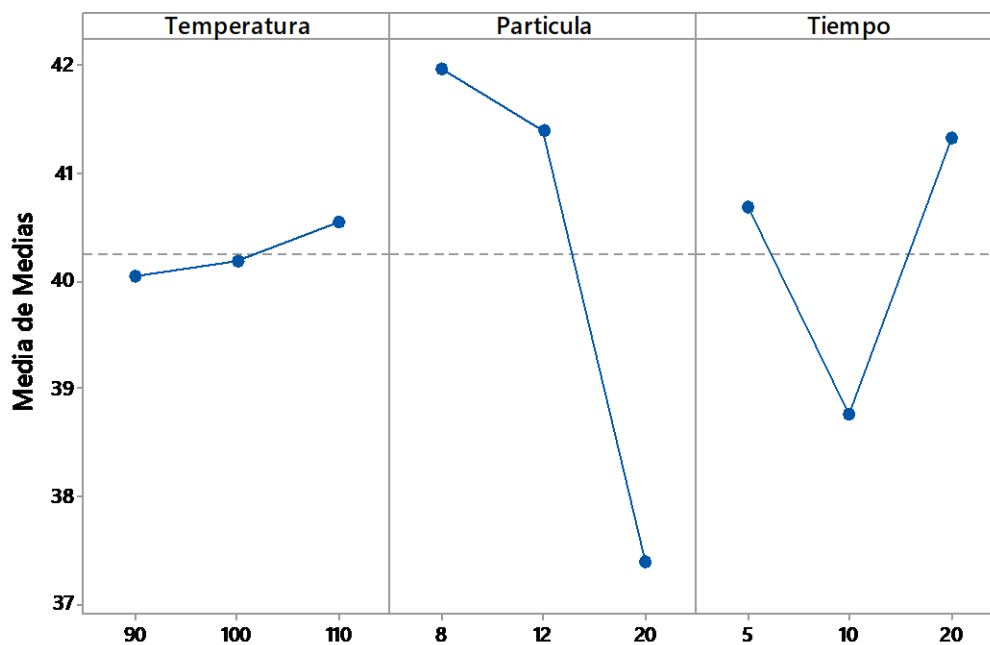


Figura 6. Efectos principales para las medias de azúcares totales liberados en la fracción líquida tratada con LHW.

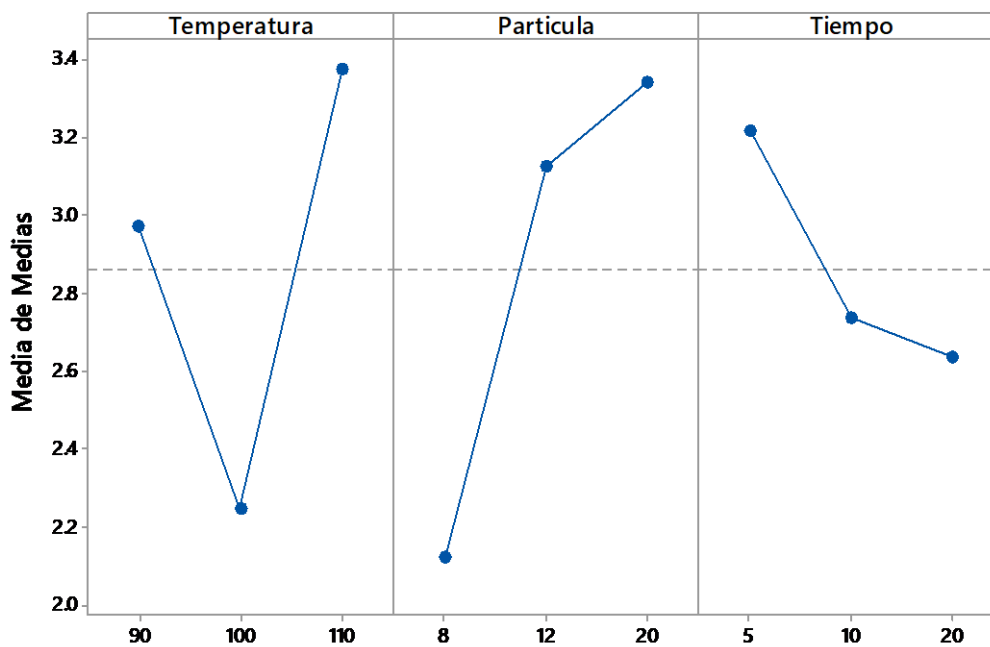


Figura 7. Efectos principales para las medias de azúcares reductores liberados en la fracción sólida tratada con LHW.

El diseño experimental permitió determinar las condiciones que más favorecen la liberación de azúcares totales y reductores posterior al tratamiento con LHW (Tabla 9).

Tabla 9. Condiciones obtenidas para favorecer la liberación de azúcares totales y reductores

	Temperatura (°C)	Partícula (mm)	Tiempo (min)
Slurry			
Azúcares totales	90	8	5
Azúcares reductores	90	12	5
Hidrolizado			
Azúcares totales	110	8	20
Azúcares reductores	110	20	5

Los tiempos de exposición prolongados a temperaturas elevadas induce a que los azucares totales y reductores comiencen a degradarse, transformándose en compuestos no deseados para una posterior utilización (fenoles y furfurales) (Avci *et al.*, 2013).

ANÁLISIS DE FIBRA

En cuanto al análisis de fibras posterior al tratamiento con LHW, se buscaba disminuir la concentración de hemicelulosa y lignina en la fracción sólida y obtener una mayor cantidad de celulosa en el slurry procesado (Ruiz y col., 2013). De acuerdo con lo mostrado en la Figura 8, los tratamientos con menor temperatura llevan una tendencia a disminuir el contenido de hemicelulosa en el slurry, seguido con un mayor tamaño de partícula.

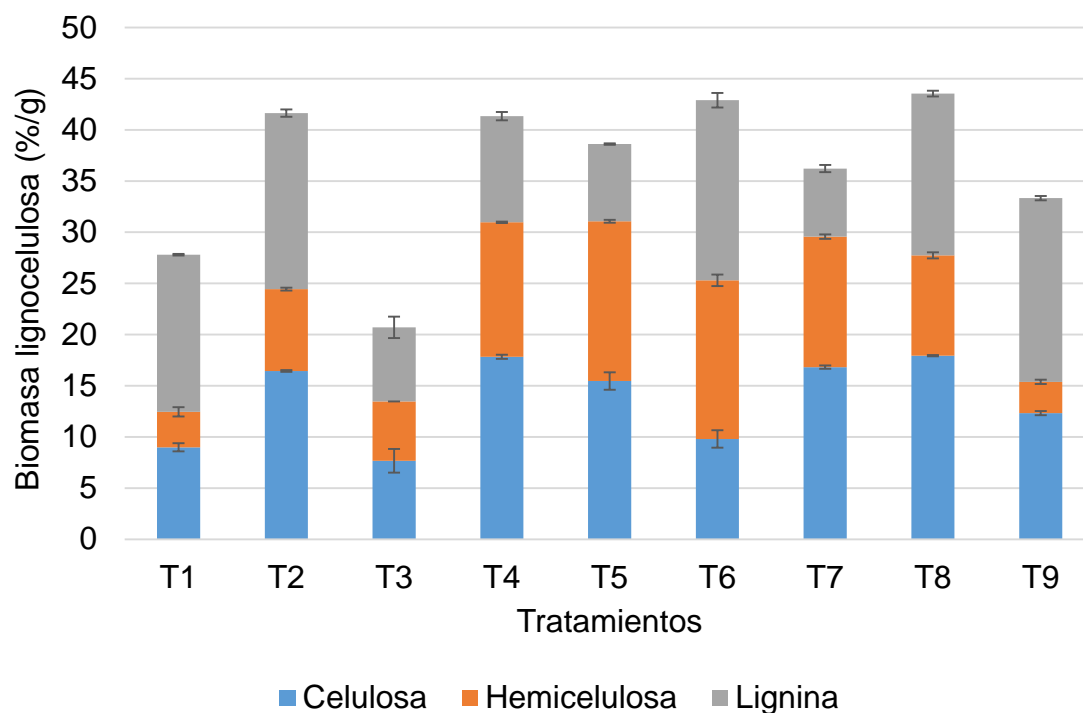


Figura 8. Porcentaje del contenido de biomasa lignocelulósica en la fracción sólida de melón pretratado.

Aunque los datos del ANOVA no mostraron un efecto significativo ($p \leq 0.10$) para la disminución de hemicelulosa (Tabla 10), el modelo estimado ($R^2 = 82.5\%$) corrobora que el mayor efecto para disminuir el contenido de hemicelulosa para la fracción sólida hidrolizada está dado por la temperatura del proceso, seguido del tiempo de residencia (Figura 9).

Tabla 10. ANOVA del diseño Taguchi para el contenido de hemicelulosa y lignina de la fracción Sólida del residuo de melón tratado con LHW.

	Hemicelulosa						
	Fuente	GL	SS Sec	SS Ajust	MC Ajust	F	p
	Temperatura	2	127.26	127.26	63.632	3.82	0.208
	Partícula	2	13.70	13.70	6.852	0.41	0.709
	Tiempo	2	16.54	16.54	8.269	0.50	0.668
	Error residual	2	33.33	33.33	16.667		
	Total	8	190.84				
	Lignina						
	Fuente	GL	SS Sec	SS Ajust	MC Ajust	F	p
	Temperatura	2	4.715	4.715	2.357	0.35	0.740
	Partícula	2	20.051	20.051	10.026	1.50	0.401
	Tiempo	2	148.518	148.518	74.259	11.08	0.083
	Error residual	2	13.407	13.407	6.704		
	Total	8	186.691				

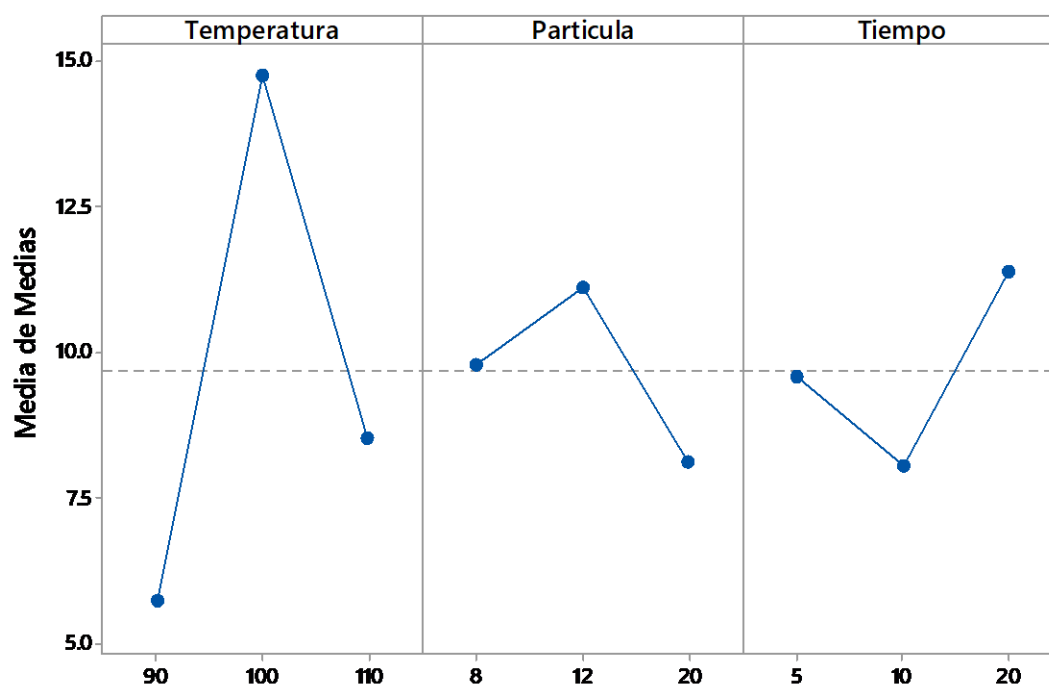


Figura 9. Efectos principales para las medias de disminución de hemicelulosa en la fracción sólida tratada con LHW

Por otra parte, el tiempo de residencia en el proceso de LHW mostró un efecto significativo ($p \leq 0.10$) para la disminución de lignina en la fracción sólida tratada (Tabla 10). El descenso en el contenido de lignina se vio afectado en primera instancia por el tiempo de residencia ($R^2 = 92.8\%$), seguido por el tamaño de partícula del material (Figura 10).

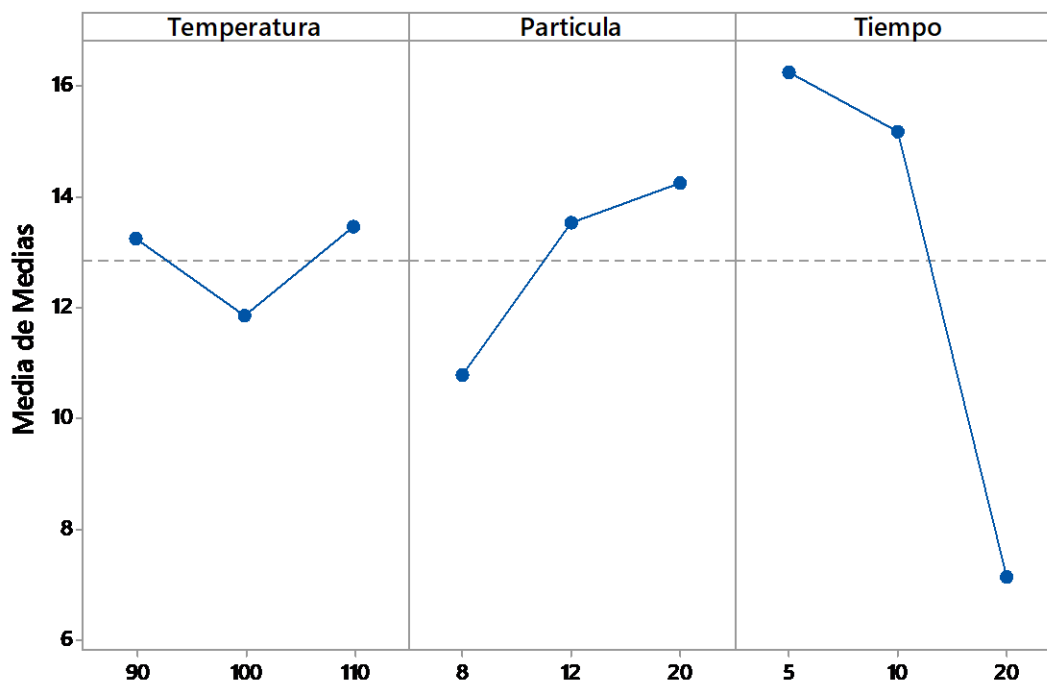


Figura 10. Efectos principales para las medias de disminución de lignina en la fracción sólida tratada con LHW

El diseño experimental permitió determinar las condiciones que más favorecen la solubilización de hemicelulosa y lignina en la fracción líquida, y con ello disminuir su contenido en la fracción sólida analizada posterior al tratamiento con LHW (Tabla 11).

Tabla 11. Condiciones obtenidas para favorecer la disminución de hemicelulosa y lignina en la fracción sólida posterior al tratamiento con LHW

Fracción sólida	Temperatura (°C)	Partícula (mm)	Tiempo (min)
Hemicelulosa	90	20	10
Lignina	100	8	20

Los residuos sólidos derivados de los tratamientos con LHW son más accesible para la hidrólisis enzimática por su mayor concentración de celulosa, como lo menciona Yu *et al.* (2015), que el método de agua caliente líquida para pretratar los pastos contribuyo en la mejora de la accesibilidad de la celulosa. Al calentarse en el proceso LHW la hemicelulosa se despolimeriza principalmente y sus productos de degradación se disuelven en la fase líquida durante el pretratamiento de LHW, mientras que la celulosa se retiene completamente en la porción sólida. La lignina sufre las reacciones simultáneas de despolimerización y repolimerización que se refieren a la transición vítrea del estado vítreo al gomoso (Ko *et al.*, 2015). El efecto principal que se pretende con los procesos hidrotérmicos es la solubilización de la fracción hemicelulósica (Ruiz *et al.*, 2013; Moure *et al.*, 2017) para dejar libre a la celulosa presente en el material tratado. Con el fin de estudiar el comportamiento del sistema agua-material lignocelulósico bajo procesamiento hidrotérmico, se han desarrollado modelos cinéticos para explicar la solubilización de la hemicelulosa y sus fracciones en procesos isotérmicos y no-isotérmicos (Ruiz *et al.*, 2013). Overend y Chornet (1987) definieron el factor de gravedad o el orden de reacción (R_0), para la solubilización de hemicelulosas en tratamientos hidrotermales isotérmicos como:

$$\log R_0 = \int_0^t \exp\left(\frac{T-T_{ref}}{\omega}\right) \cdot dt \quad (1)$$

Donde $\log R_0$ es el orden de reacción (min), T es la temperatura del proceso hidrotérmico (°C), t es el tiempo de reacción (min), T_{ref} es la temperatura de referencia y ω , es un parámetro empírico relacionado con la energía de activación de la hemicelulosa (14.75 K), suponiendo una cinética de pseudo primer orden (Ruiz y col., 2013). Debido al amplio rango de variación de R_0 , es

común usarlo en forma logarítmica. Los diversos tratamientos establecidos lograron un máximo valor de factor de severidad de $[\text{Log}R_0]=1.6$ para el tratamiento 7 (110°C de temperatura, tamaño de partícula de malla #8 (2.38-3.35 mm) y un tiempo de proceso de 20 minutos). Las características antes mencionadas generaron un perfil de monosacáridos con una cantidad final de glucosa de 15.3 g/l y de xilosa de 8.3 g/l, mismas que serán utilizadas en la siguiente etapa.

SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA (SFS) PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL

La cinética de la hidrólisis enzimática, la fermentación y sacarificación simultánea de los residuos tratados con LHW se muestran en la figura 11. En las primeras 12 horas del proceso se muestra la mayor concentración de etanol y glucosa (2.4 g/l y 19.1 g/l respectivamente). El incremento en la concentración de glucosa puede deberse a la acción conjunta que realizan las enzimas celulasas del extracto enzimático y de la levadura, logrando un aumento en los valores del monosacárido. La producción y concentración de etanol, parece estar ligada al contenido de glucosa en el medio fermentativo, el cual presenta un aumento en las primeras 12 horas de proceso y posteriormente comienza a descender, tanto la concentración de glucosa, como la de etanol, lo que resulta en bajas concentraciones de glucosa disponibles para la levadura, lo que conduce a una menor producción de bioetanol (Koppram et al., 2014).

En las condiciones del experimento dio como resultado un rendimiento de conversión a etanol del 23.33%, a comparación de otros autores el rendimiento fue bajo, García y Garza (2016) mencionan que obtuvieron una concentración máxima de 27 g/l de etanol, lo cual equivale a 90% de rendimiento en olote pretratado con una temperatura de operación de 35°C. Arismendy *et al.* (2015) menciona que *Saccharomyces* tiene buena producción de etanol a los 35°C.

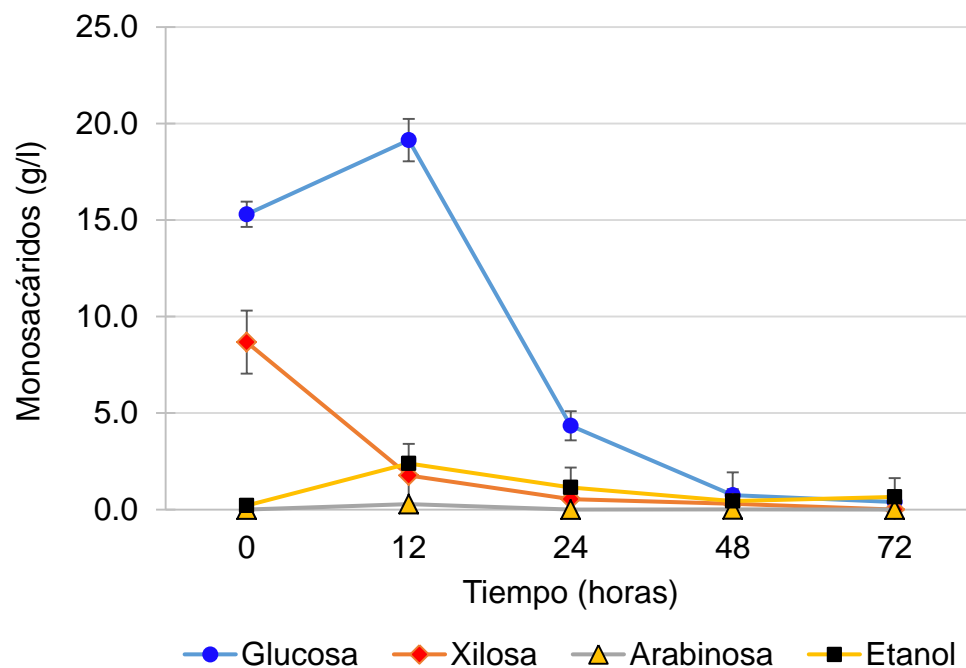


Figura 11. Comportamiento cinético del perfil de monosacáridos y producción de etanol durante el proceso SFS de los residuos de melón hidrolizados. Los puntos representan la media de los valores experimentales y las barras la desviación estándar.

CONCLUSIONES

- Los residuos de melón presentan buena cantidad de azúcares y biomasa lignocelulósica para ser considerados como materia prima promisoría en la obtención de metabolitos y biocombustibles como bioetanol.
- La cepa de *Aspergillus niger* evaluada fue capaz de degradar los residuos de melón, incrementando la concentración de monosacáridos en el medio.
- La secuencia del pretratamiento con hidrotérmico (LHW) e hidrólisis enzimática, incrementó la conversión de residuos de melón en azúcares fermentables. La hidrólisis y fermentación simultánea de residuos de melón pretratado, permite obtener azúcares por hidrólisis enzimática, mientras la levadura fue capaz de consumir los azúcares fermentables y producir bioetanol de segunda generación.

LITERATURA CITADA

- Abdullah, A., Hamid, H., Christwardana, M., & Hadiyanto, H. 2018. Optimization of Cellulase Production by *Aspergillus niger* ITBCC L74 with Bagasse as Substrate using Response Surface Methodology. HAYATI Journal of Biosciences, 25(3), 115.
<https://doi.org/https://doi.org/10.4308/hjb.25.3.115>
- Adekunle, A. E., Zhang, C., Guo, C., & Liu, C.-Z. 2017. Laccase Production from *Trametes versicolor* in Solid-State Fermentation of Steam-Exploded Pretreated Cornstalk. Waste and Biomass Valorization, 8(1), 153-159.
<https://doi.org/10.1007/s12649-016-9562-9>
- Aditiya H. B., Mahlia T. M. I., Chong W.T., Nur H., Sebayang A. H. 2016. Second generation bioethanol production: a critical review, Renew. Sustain. Energy Rev. (66):631–653.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1364032116303434>
- Aguilar D. L., Rodríguez-Jasso R. M., Zanuso E., Lara-Flores A. A., Aguilar, C. N., Sánchez A., Ruiz H. A. 2018. Operational strategies for enzymatic hydrolysis in a biorefinery. In: Kumar, S., Sani, R. (Eds.), Biorefining Biomass to Biofuels – Opportunities and Perception. Springer, Cham, pp. 223–248. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-67678-4_10
- Aguilar-Reynosa A. Romaní A., Rodríguez-Jasso R. M., Aguilar C. N., Garrote G., Ruiz L. H. A. 2017. Comparison of microwave and conduction-convection heating autohydrolysis pretreatment for bioethanol production. Bioresource Technology. 243:273–283
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.096>
- Aitken S. 2012. Wood chemistry and secondary cell wall structure. FRST 210 – Forest Biology II. The University of British Columbia, Vancouver.
<http://frst210.forestry.ubc.ca/lecture/>
- Alvira P., Tomás-Pejó E., Ballesteros M., Negro M. J. 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. Bioresour Technol. 101:4851–4861.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>
- Anwar Z., Gulfranz M., Irshad M. 2014. Agro-Industrial Lignocellulosic Biomass a Key to Unlock the Future Bio-Energy: A Brief Review. J. Radiat. Res. Appl. Sci. 7(2):163–173.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1687850714000119>

- Area M.C., Vallejos M. E. 2012. Biorrefinería a partir de residuos lignocelulósicos. Conversión de residuos a productos de alto valor. Saarbrücken. Editorial Académica Española. 210-215. https://books.google.com.mx/books/about/Biorrefiner%C3%ADa_a_partir_de_residuos_lign.html?id=6T6IMQEACAAJ&redir_esc=y
- Arismendy A. M, Sequeira M. J., Felissia F. E., Area M. C., Chamorro E. R. 2015. Evaluación de Cepas Fermentativas en la Hidrólisis y Fermentación Simultáneas (SSF) de Cascarilla de Arroz para la Producción de Bioetanol. RTyC. 30:357. <http://rtyc.utn.edu.ar/index.php/rtyc/article/view/179>
- Avci A., Saha B. C., Kennedy G. J., Cotta M. A. 2013. Dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover for enzymatic hydrolysis and efficient ethanol production by recombinant *Escherichia coli* FBR5 without detoxification. Bioresource Technology. 142:312-319. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852413007621>
- Balat M. 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via biochemical pathway: A review. Energy Conversion and Management. 52:858-875. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196890410003791>
- Bansal N., Tewari R., Soni R., Kumar S. S. 2012. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. Waste Management. 32:1341–1346. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.03.006>
- Barreto, S.M., Ó.J.S. Toro, y L.F.G. Mosquera. 2011. Representación matemática de la producción de enzimas lignocelulolíticas por fermentación en estado sólido empleando *Coriolus versicolor*. Vector. 6:63-70. http://vip.ucaldas.edu.co/vector/downloads/Vector6_8.pdf
- Bradford M. M. 1976. Un método rápido y sensible para la cuantificación de cantidades de microgramos de proteína utilizando el principio de unión de proteína-colorante. Anal. Biochem. 72:248-254.
- Brodeur G., Yau E., Badal K., Collier J., Ramachandran K. B., Ramakrishnan S. 2011. Chemical and Physicochemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review. Enzyme Research. 2011:17. <https://dx.doi.org/10.4061%2F2011%2F787532>
- Brummer V., Skryja P., Jurena T., Hlavacek V., Stehlik P. 2014. Suitable technological conditions for enzymatic hydrolysis of wastepaper by Novozymes® Enzymes NS50013 and NS50010. Appl Biochem Biotechnol. 174:1299–1308. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1119-4>

- Castañeda-Casasola C., Arana-Cuenca A., Favela-Torres E., Anducho-Reyes M. A., González A. E., Téllez-Jurado A. 2018. Producción de xilanas por *Aspergillus fumigatus* en fermentación en estados líquido y sólido. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 17(1):47-61
<http://rmiq.org/ojs311/index.php/rmiq/article/download/16/4/>
- Castrillo M., Bich G., Kramer G., Velazquez J., Rodriguez M., Zapata P. (2015). Evaluation of synthetic and semi- synthetic culture media for endo-1,4- β -glucanases secretion by *Trichoderma koningiopsis*. *Procedia Materials Science* (8):786-792.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211812815001376>
- Cheng J. J., Timilsina G. R. 2011. Status and barriers of advanced biofuel technologies: a review. *Renew Energy*. 36:3541–3549.
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2011.04.031>
- Choi, I. S., Lee, Y. G., Khanal, S. K., Park, B. J., Bae, H. J. 2015. A low-energy, cost-effective approach to fruit and citrus peel waste processing for bioethanol production. *Applied Energy*. 140:65–74.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306261914012392>
- Cofecyt. 2011. Informe: Debilidades y Desafíos Tecnológicos del Sector Productivo – Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva. [En línea]. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/noticias/san-juan-bioetanol-partir-del-descarte-de-melones>. Fecha de consulta: 20 de enero 2019.
- Córdova-López, J., Gutiérrez-Rojas, M., Huerta, S., Saucedo-Castañeda, G., & Favela-Torres, E. (1996). Biomass estimation of *Aspergillus niger* growing on real and model supports in solid state fermentation. *Biotechnology Techniques*, 10(1), 1-6. <https://doi.org/10.1007/BF00161075>
- Demirbas A. 2005. Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. *Energy Source*. 27:327–337.
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00908310390266643>
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.T., Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3):350-356.
- El-Mansi E. M. T., Bryce C., Hartley B., Demain, A. 2012. *Fermentation Microbiology and Biotechnology*. London: CRC Press. Pp. 130.
<https://books.google.com.mx/books>
- Espinoza-Arellano J. J., Orona-Castillo I., Guerrero-Ramos L. A., Molina-Morejón V. M., Ramírez-Quiroga E. C. 2019. Análisis del financiamiento, comercialización y rentabilidad del cultivo del melón con enfoque de

“siembras por etapas” en la Comarca Lagunera de Coahuila, México. *CienciaUAT*. 13(2): 71-82. <http://www.scielo.org.mx/pdf/cuat/v13n2/2007-7858-cuat-13-02-71.pdf>.

Espinoza, A. J. J., Lozada, M. y Leyva, S. (2011). Posibilidades y restricciones para la exportación de melón cantaloupe producido en el municipio de Mapimí, Dgo., México al mercadode los Estados Unidos. *Revista Mexicana de Agronegocios*. 15(28): 593-604. <https://www.redalyc.org/pdf/141/14115904013.pdf>

Evcan E. y Tari C. 2015. Production of bioethanol from apple pomace by using cocultures: Conversion of agro-industrial waste to value added product. *Energy*. 88:775-782. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0360544215006921>

Florencio, C., Cunha, F. M., Badino, A. C., Farinas, C. S., Ximenes, E., & Ladisch, M. R. (2016). Secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* cultivated by submerged and sequential fermentation processes: Enzyme production for sugarcane bagasse hydrolysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 90, 53-60. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.04.011>

Gabriel K. J., El-Halwagi M. M. 2013. Modeling and optimization of a bioethanol production facility. *Clean Technol Environ*. 15:931–44. <https://www.researchgate.net/deref/http%3A%2F%2Fdx.doi.org%2F10.1007%2Fs10098-013-0584-8>

García V. P., Garza G. Y. 2016. Simultaneous Saccharification and Fermentation process of pre-treated corn cob. *Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias*. 5(9): 2007-9990. <http://ciba.org.mx/index.php/CIBA/article/view/50/205>

Gibson L. J. 2012. The hierarchical structure and mechanics of plant materials. *J R Soc Interface*. 9(76):2749–2766. <https://royalsocietypublishing.org/doi/pdf/10.1098/rsif.2012.0341>

Gírio F. M., Fonseca C., Carvalheiro F., Duarte L. C., Marques S., Bogel-Lukasik R. 2010. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. *Bioresour Technol* 101:4775–4800. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.088>

Gomez A., Rodrigues M., Montanes C., Dopazo C., Fueyo N. 2011. The technical potential of first-generation biofuels obtained from energy crops in Spain. *Biomass Bioenergy*. 35:2143–55. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.02.009>

- González G. K. D., Rodríguez-Jasso R. M, Loredó-Treviño A., Ruiz L. H. A., Cardona C. (2019). Performance of *Saccharomyces cerevisiae* yeast in bioethanol production from agroindustrial residues (tesis de maestría). Facultad de Ciencias Químicas en la Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo, Coahuila.
- Grohmann K, Baldwin E.A., Buslig B.S., Ingram L.O. 1994. Fermentation of galacturonic acid and other sugars in orange peel hydrolysates by the ethanologenic strain of *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett.* 16:281-6. <https://doi.org/10.1007/BF00134626>
- Gutiérrez-Rojas I., Moreno-Sarmiento N., Montoya D. 2015. Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. *Revista Iberoamericana de Micología.* 32(1):1-12. <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-iberoamericana-micologia-290-articulo-mecanismos-regulacion-hidrolisis-enzimatica-celulosa-S1130140614000138>
- Havlik P., Schneider O.A., Schmid E., Bottcher H., Fritz S., Skalsky R. 2011. Global land-use implications of first- and second-generation biofuel targets. *Energy Policy.* 39(5):690-702. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2010.03.030>
- Hernández C., Díaz A. I., Laca A., Laca A., Díaz M. (agosto de 2017). Obtención de bioetanol a partir de hidrolizados de residuos de fruta, II Congreso Nacional de Jóvenes Investigadores en Ciencia, Ingeniería y Tecnología de los Alimentos. http://www.aaiq.org.ar/SCongresos/docs/06_029/papers/06c/06c_1638_516.pdf
- Huber T., Mussig J., Curnow O., Pang S., Bickerton S., Staiger M. P. 2012. A critical review of all-cellulose composites. *J Mater Sci.* 47:1171–1186. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10853-011-5774-3>
- Ibraheem O., Ndimba B.K. 2013. Molecular adaptation mechanisms employed by ethanologenic bacteria in response to lignocellulose derived inhibitory compounds. *International Journal of Biological Sciences.* 9(6):598-612. <https://doi.org/10.7150/ijbs.6091>
- Imman S., Arnthong J., Burapatana V., Laosiripojana N., Champreda N. 2013. Autohidrólisis de residuos agrícolas tropicales por pretratamiento de agua caliente líquida comprimida. *Bioquímica Aplicada y Biotecnología.* 170:1982 – 1995. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12010-013-0320-1>
- Inca-Torres, A. R., Urbina-Salazar, A. D. R., Falcón-García, G., Carbonero-Aguilar, P., Morgado, B. R., Parrado, J., & Bautista, J. (2018). Hydrolytic

enzymes production by *Bacillus licheniformis* growth on fermentation media formulated with sewage sludge. Journal of Biotech Research, 9. <http://www.btsjournals.com/assets/2018v9p14-26.pdf>

- Ingale S., Sanket J. J., Guptel A. 2014. Production of bioethanol using agricultural waste: banana pseudo stem. Brazilian Journal of Microbiology. 45(3):885-892. <https://dx.doi.org/10.1590%2Fs1517-83822014000300018>
- Izarra M. L., Santayana M. L., Villena G. K., Gutiérrez-Correa M. 2010. Influencia de la concentración de inóculo en la producción de celulasa y xilanasa por *Aspergillus niger*. Revista Colombiana de Biotecnología. 7(2):139-150. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77617808011>
- Jambo S. A., Abdulla R., Azhar S. H. M., Marbawi H., Gansau J. A., Ravindra P. 2016. A review on third generation bioethanol feedstock. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 65:756–769. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.064>
- Ko J.K., Kim Y., Ximenes E., Ladisch M.R. 2015. Effect of Liquid Hot Water Pretreatment Severity on Properties of Hardwood Lignin and Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. Biotechnol. Bioeng. 112(2): 252-262. <https://doi.org/10.1002/bit.25349>
- Koppram R., Tomás-Pejó E., Xiros C., Olsson L. 2014. Lignocellulosic ethanol production at high-gravity: challenges and perspectives. Trends Biotechnol. 32:46–53. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.10.003>
- Limayem A., Ricke S. C. 2012. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. Prog Energy Comb Sci. 38:449–467. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2012.03.002>
- Liu, Z.H., Chen, H.Z., 2016. Simultaneous saccharification and co-fermentation for improving the xylose utilization of steam exploded corn stover at high solid loading. Bioresour. Technol. 201: 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.023>
- Llenque-Díaz L. A., Muñoz R. M, Espejo V. E., Moreno R. A. 2015. Producción de celulasas por *Aspergillus niger* a partir de bagazo de caña de azúcar en biorreactor aireado. Ciencia y Tecnología.11(4):39-49. <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/PGM/article/download/1151/1090>
- Menon V., Rao M. 2012. Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. Prog Energy Comb Sci 38:522–550. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2012.02.002>

- Miller G. L. 1959. Modified DNS method for reducing sugars. *Anal. Chem*, 31(3), 426-428.
- Mohr A., Raman S. 2013. Lessons from first generation biofuel and implications for the sustainability appraisal of second-generation biofuels. *Energy Policy*. 63:114–22. <https://dx.doi.org/10.1016/j.enpol.2013.08.033>
- Montoro, M. L., Herrero, M. L., Sardella, M. F., Vallejo, M. D., & Deiana, A. C. (agosto de 2015). Influencia de las variables de pretratamiento sobre la biodisponibilidad de azúcares para la producción de bioetanol a partir de melón. En O. Pagola (presidencia) CAIQ2015: "Innovación y optimización en productos, procesos y energía para un desarrollo sustentable", VIII Congreso Argentino de Ingeniería Química. Buenos Aires, Argentina. http://www.aaiq.org.ar/SCongresos/docs/06_029/papers/06c/06c_1638_516.pdf
- Moure, A., Garrote, G., & Domínguez, H. (2017). Effect of Hydrothermal Pretreatment on Lignin and Antioxidant Activity. In Ruiz H., Hedegaard Thomsen M., & T. H. (Eds.), *Hydrothermal Processing in Biorefineries* (pp. 5-43). Springer. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-56457-9_2
- Niño L. L., Acosta C. A., Gelves Z. R. 2013. Evaluación de pretratamientos químicos para la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos de yucca. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*. 69:317-326. <https://www.redalyc.org/pdf/430/43029812024.pdf>
- Overend, R. P., & Chornet, E. (1987). Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, 321(1561), 523-536. <https://doi.org/https://doi.org/10.1098/rsta.1987.0029>
- Patyshakuliyeva, A., Arentshorst, M., Allijn, I. E., Ram, A. F. J., de Vries, R. P., & Gelber, I. B. (2016). Improving cellulase production by *Aspergillus niger* using adaptive evolution. *Biotechnology Letters*, 38(6), 969-974. <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2060-0>
- Ribeiro BE. 2013. Beyond common place biofuels: social aspects of ethanol. *Energy Policy*. (57):355-62. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2013.02.004>
- Ritslaid K., Kuut A., Olt J. 2010. State of the art in bioethanol production. *Agronomy Res.* 8(1):236–54. <https://pdfs.semanticscholar.org/88c6/689464b7def8e63e54ddc78d205d8a24b908.pdf>
- Rodríguez V. R. (1 de julio de 2019). Productores de melón de Tlahualilo registran pérdidas al desplomarse el precio. *Inforural*. Recuperado de

<https://www.inforural.com.mx/productores-de-melon-de-tlahualilo-registran-perdidas-al-desplomarse-el-precio/>

- Rojas G. A. F., Flórez M. C. 2019. Valorización de residuos de frutas para combustión y pirolisis. *Revista Politécnica*. 28(15): 42-53. <https://doi.org/10.33571/rpolitec.v15n28a4>
- Rolim P.M., Fidelis G. P., Padilha C. E. A., Santos E. S., Rocha H.A.O., Macedo G.R. 2018. Phenolic profile and antioxidant activity from peels and seeds of melon (*Cucumis melo* L. var. *reticulatus*) and their antiproliferative effect in cancer cells. *Braz J Med Biol Res*. 51(4):1-14. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20176069>
- Romero-Cortes T., López-Pérez P. A., Pérez E. V. H., Medina-Toledo A. K., Aparicio-Burgos J. E., Cuervo-Parra J. A. 2019. Confrontation of *Trichoderma asperellum* VSL80 Against *Aspergillus niger* VIA the effect of enzymatic production. *Chil. j. agric. anim. sci.* 35(1):19-38. <http://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902019005000202>
- Ruiz, H. A., Rodríguez-Jasso, R. M., Fernandes, B. D., Vicente, A. A., & Teixeira, J. A. (2013). Hydrothermal processing, as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 21, 35-51. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2012.11.069>
- Saini J. K., Saini R., Tewari L. 2015. Lignocellulosic agricultura wastes as biomass Feed stocks for second-generation bioetanol production: concepts and recent developments. *Biotech*. 5:337–53. <https://link.springer.com/article/10.1007/s13205-014-0246-5>
- Sarkar N., Ghosh S. K., Bannerjee S., Aikat K. 2012. Bioethanol production from agricultural wastes: anover view. *Renew Energy*. 37:19–27. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.474.1414&rep=rep1&type=pdf>
- SENASICA, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2018). Directorio de empresas certificadas en la implementación de Buenas Prácticas Agrícolas y Buenas Prácticas de Manejo en los Procesos de Producción y Empacado de Frutas y Hortalizas para Consumo Humano en Fresco. [En línea]. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/328072/DIRECTORIO_EMPRESAS_Y_AREAS_al_31_de_abril_2018.pdf. Fecha de consulta: 19 de junio de 2018.
- Seguí G. L., Fito M. P. 2017. An Integrated Approach for Pineapple Waste Valorisation. *Bioethanol Production and Bromelain Extraction from*

- Pineapple Residues. *Journal of Cleaner Production*. 172:1224-1231. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.10.284>
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). (2017). Atlas Agroalimentario 2017. Primera Edición. SAGARPA-SIAP. 116-117. <http://online.pubhtml5.com/clsi/ibhs/>
- Suarez C., Nieto I.J. 2013. Cultivo biotecnológico de macrohongos comestibles: una alternativa en la obtención de nutraceuticos. *Revista Iberoamericana de Micología*. 30:1-8. <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-iberoamericana-micologia-290-articulo-cultivo-biotecnologico-macrohongos-comestibles-una-S113014061200054X>
- Subhadra B. G. 2010. Sustainability of algal biofuel production using integrate renewable energy park (IREP) and algal biorefinery approach. *Energy Policy*. 38:5892–901. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2010.05.043>
- Taherzadeh M. J., Karimi K. 2008. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *Int J Mol Sci*. 9(9):1621-51. <https://doi.org/10.3390/ijms9091621>
- Talebnia F., Karakashev D., Angelidaki I. 2010. Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresour Technol*. 101:4744–4753. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.080>
- Van Dyk J. S., Pletschke B. I. 2012. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes – factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnol Advan*. 30:1458–1480. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.03.002>
- Van Soest P. J., Robertson J. B., Lewis B. A. 1991. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *J Dairy Sci*. 74: 3583-3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Wan C., Li. 2011. Efecto de la extracción de agua caliente y el pretratamiento de agua caliente líquida sobre la degradación fúngica de las materias primas de biomasa. *Tecnología Bioambiental*. 102(20):9788-9793. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.004>
- Weiqi W., Shubin W., Liguó L. 2013. Combinación de pretratamiento de agua caliente líquida y molienda de discos húmedos para mejorar la eficiencia de la hidrólisis enzimática del eucalipto. *Tecnología Bioambiental*. 128:725-730. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.130>

- Widmer W. W., Narciso J. A., Grohmann K., Wilkins M. R. 2009. Simultaneous saccharification and fermentation of orange processing waste to ethanol using *Kluyveromyces marxianus*. *J Biol Eng.* 2:17-29. <https://elibrary.asabe.org/abstract.asp?aid=29174>
- Yang H., Wang K., Ma J., Yang J., Shi Z. 2017. Liquid Hot Water Pretreatment of Wheat Straw for Full Carbohydrates Biorefinery. *BioResources.* 12(3):6342-6352. https://bioresources.cnr.ncsu.edu/wpcontent/uploads/2017/07/BioRes_12_3_6342_Yang_WMYS_Liquid_Hot_Water_Pretreatment_Wheat-Straw_Carbohydrates_Biorefinery_11752.pdf
- Yu Q., Liu J., Zhuang X., Yuan Z., Wang W., Qi W., Wang Q., Tan X., Kong X. 2016. Liquid hot water pretreatment of energy grasses and its influence of physico-chemical changes on enzymatic digestibility. *Bioresource Technology.* 199:265-270. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.086>
- Zabed H., Sahu J.N., Boyce A.N., Faruq G. 2016. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: A overview on Feed stock and technological approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 66:751–774. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.08.038>
- Zamora-Hernández T., Prado-Fuentes A., Capataz-Tafur J., Barrera-Figueroa B. E., Peña-Castro J. M. 2014. Demostraciones prácticas de los retos y oportunidades de la producción de bioetanol de primera y segunda generación a partir de cultivos tropicales. *Educación Química.* 25(2):122-127. <http://www.scielo.org.mx/pdf/eq/v25n2/v25n2a6.pdf>