



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**TRANSFORMACIÓN DEL ENDOCARPIO RESIDUAL (BAGAZO) DE
CÍTRICOS EN PRODUCTOS CON VALOR AGREGADO MEDIANTE UN
REACTOR TERMOMECANO-QUÍMICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA:

FERNANDO GARCÍA MAYA



Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. Eduardo Bárzana García

SECRETARIO: Dr. Óscar Hernández Meléndez

VOCAL: Dra. Carmina Montiel Pacheco

1er. SUPLENTE: M. en C. Luis Alejandro Díaz Flores

2do. SUPLENTE: Dr. Roeb García Arrazola

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ LA TESIS:

Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Facultad de Química.
Laboratorio de Ingeniería Química, Laboratorio de Ingeniería Agroindustrial.

ASESOR DE TESIS:

Dr. Óscar Hernández Meléndez

SUSTENTANTE:

Fernando García Maya

“No conozco hecho más alentador que el de la incuestionable capacidad del hombre para elevar su vida mediante un esfuerzo consciente”

Henry David Thoreau

ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	IV
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
MARCO TEÓRICO	6
MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS	6
PRETRATAMIENTOS DE MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS	8
PRETRATAMIENTOS FÍSICOS	9
PRETRATAMIENTOS QUÍMICOS	9
A) PRETRATAMIENTO ÁCIDO	9
B) PRETRATAMIENTO ALCALINO	10
C) OXIDACIÓN HÚMEDA	10
D) MÉTODO ORGANOSOLVENTE	10
PRETRATAMIENTOS FÍSICOQUÍMICOS	11
A) EXPLOSIÓN CON VAPOR	11
B) AGUA CALIENTE LÍQUIDA	11
C) EXPLOSIÓN DE FIBRAS CON AMONIACO (AFEX)	11
D) EXPLOSIÓN CON CO ₂	12
PRETRATAMIENTOS BIOLÓGICOS	12
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	12
FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA	14
FERMENTACIÓN ANAEROBIA METANOGENICA	15
OBJETIVOS	17
GENERAL:	17
PARTICULARES:	17
HIPÓTESIS	17
DIAGRAMA DE FLUJO	17
MATERIALES Y MÉTODOS	19
PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	19

CARACTERIZACIÓN DE BAGAZO. CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE CELULOSA, HEMICELULOSA, LIGNINA Y CENIZAS.	20
DETERMINACIÓN DE HUMEDAD	21
DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES	21
DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA	21
EXTRUSIÓN ALCALINA	22
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	23
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	23
FERMENTACIÓN CON SACCHAROMYCES CEREVISIAE	24
CUANTIFICACIÓN DE ETANOL POR CROMATOGRAFÍA DE GASES	25
ACONDICIONAMIENTO Y OBTENCIÓN DE LÍQUIDO RUMINAL	25
FERMENTACIÓN CON LÍQUIDO RUMINAL	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
CARACTERIZACIÓN DE BAGAZO	27
CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA	31
PRETRATAMIENTO ALCALINO CON REACTOR TERMO-MECANO-QUÍMICO	33
EVALUACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	35
EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA PRODUCCIÓN DE AZÚCARES	40
FIGURA 19. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE AZÚCARES EN RESIDUOS AGROINDUSTRIALES (LI Y COLS., 2004)	41
EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁLCALI EN LA PRODUCCIÓN DE AZÚCARES	41
PRUEBA DE ESCALAMIENTO EN SACARIFICACIÓN Y PRODUCCIÓN DE ETANOL CON S. CEREVISIAE	42
FERMENTACIÓN DE BAGAZO UTILIZANDO LÍQUIDO RUMINAL	46
CONCLUSIONES	52
PERSPECTIVAS	53
ANEXO	54

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Representación estructural de una matriz lignocelulósica (US Department of Energy Genome Programs image gallery, 2016).</i>	6
<i>Figura 2. Representación molecular del polímero celulosa.</i>	7
<i>Figura 3. Representación molecular del heteropolímero hemicelulosa.</i>	7
<i>Figura 4. Representación molecular de lignina.</i>	8
<i>Figura 5. Representación del efecto macroscópico del pretratamiento de materiales lignocelulósicos (Moiser y cols., 2005).</i>	9
<i>Figura 6. Mecanismo de hidrólisis enzimática de la celulosa.</i>	14
<i>Figura 7. Diagrama representativo del metabolismo anaerobio de materiales lignocelulósicos.</i>	16
<i>Figura 8. Bagazo de mandarina extrudado y deshidratado.</i>	20
<i>Figura 9. Reactor termo-mecano-químico.</i>	23
<i>Figura 10. Reactor de vidrio adaptado a una parrilla de calentamiento con un agitador mecánico.</i>	25
<i>Figura 11. Balance de Materia de la etapa de acondicionamiento de bagazo de toronja.</i>	27
<i>Figura 12. Balance de Materia de la separación del jugo de toronja.</i>	28
<i>Figura 13. Componentes de bagazo de mandarina reportados en materia seca.</i>	30
<i>Figura 14. Componentes de bagazo de toronja reportados en materia seca.</i>	30
<i>Figura 15. Bagazo de toronja pretratado a diferentes concentraciones de NaOH y temperatura.</i>	34
<i>Figura 16. Bagazo de mandarina pretratado a diferentes concentraciones de NaOH y temperatura.</i>	34
<i>Figura 17. Glucosa obtenida a partir de bagazo de toronja utilizando celulasa y pectinasa.</i>	37
<i>Figura 18. Glucosa obtenida a partir de bagazo de mandarina utilizando celulasa y pectinasa.</i>	39
<i>Figura 19. Efecto de la temperatura sobre la producción de azúcares en residuos agroindustriales (Li y cols., 2004)</i>	41
<i>Figura 20. Efecto de la concentración de álcali sobre la producción de glucosa en residuos de maíz (Li y cols., 2004).</i>	42
<i>Figura 21. Producción y consumo de azúcares durante la hidrólisis enzimática y fermentación en bagazo de mandarina.</i>	44
<i>Figura 22. Producción y consumo de azúcares durante la hidrólisis enzimática y fermentación en bagazo de toronja</i>	45
<i>Figura 23. Productos obtenidos durante la sacarificación de residuos lignocelulósicos (Zhao y cols., 2009).</i>	46
<i>Figura 24. Conversión de sustrato en bagazo de toronja. Muestra control.</i>	48
<i>Figura 25. Conversión de sustrato en bagazo de toronja. Muestra pretratada.</i>	49
<i>Figura 26. Glucosa obtenida a partir de bagazo de toronja utilizando pectinasa</i>	55
<i>Figura 27. Glucosa obtenida a partir de bagazo de toronja utilizando celulasa.</i>	56
<i>Figura 28. Glucosa obtenida a partir de bagazo de mandarina utilizando pectinasa</i>	58
<i>Figura 29. Glucosa obtenida a partir de bagazo de mandarina utilizando celulasa.</i>	59

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Condiciones de pretratamiento establecidas.</i>	22
<i>Tabla 2. Condiciones establecidas para la evaluación de la hidrólisis enzimática del bagazo (toronja o mandarina) pretratado a diferentes condiciones</i>	24
<i>Tabla 3. Caracterización del jugo obtenido de la molienda de residuos cítricos</i>	28
<i>Tabla 4. Obtención de etanol a partir de la fermentación con <i>S. Cerevisiae</i></i>	28
<i>Tabla 5. Proteína presente en las diferentes enzimas utilizadas.</i>	32
<i>Tabla 6. Azúcares presentes en las diferentes enzimas utilizadas</i>	33
<i>Tabla 7. Obtención de azúcares con celulasa y pectinasa en bagazo de toronja.</i>	36
<i>Tabla 8. Obtención de azúcares con celulasa y pectinasa en bagazo de mandarina.</i>	38
<i>Tabla 9. Fermentación de bagazo de toronja. Muestra control.</i>	47
<i>Tabla 10. Fermentación de bagazo de toronja. Muestra pretratada.</i>	49
<i>Tabla 11. Fermentación con líquido ruminal a muestra pretratada y sacarificada diluida diez veces.</i>	50
<i>Tabla 12. Producción de biomasa a las 144 horas utilizando líquido ruminal</i>	51
<i>Tabla 13. Obtención de azúcares con pectinasa en bagazo de toronja.</i>	54
<i>Tabla 14. Obtención de azúcares con celulasa en bagazo de toronja.</i>	55
<i>Tabla 15. Obtención de azúcares con pectinasa en bagazo de mandarina.</i>	57
<i>Tabla 16. Obtención de azúcares con celulasa en bagazo de mandarina.</i>	58

RESUMEN

En México se generan cerca de 76 millones de toneladas al año de residuos orgánicos, gran parte de ellos provienen de la industria de alimentos, del sector agroindustrial y del doméstico, sin embargo, esto se ha convertido en una problemática, debido a que no existe una conciencia ambiental clara para su manejo. Los efectos negativos que provocan cuando son arrojados al suelo son la generación de lixiviados, contaminación de mantos acuíferos, y la emisión al aire de gases de efecto invernadero provenientes de su descomposición microbiana bajo condiciones no controladas.

Durante el procesamiento de frutos cítricos se generan residuos agroindustriales formados por cáscaras, semillas y pulpas que representan alrededor del 50% de la masa inicial introducida. Surge entonces la estrategia implementada recientemente en el grupo de investigación, donde se considera el aprovechamiento integral de las cáscaras de frutos cítricos de temporada, con el propósito de obtener aceites esenciales, pectina y celulosa. Por otro lado, en el presente trabajo se exploró el potencial que tiene el bagazo (endocarpio residual libre de jugo) proveniente de los frutos toronja y mandarina, cuya producción anual a nivel nacional en 2016 fue de 425 mil toneladas para toronja y 291 mil toneladas para mandarina según el SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). La toronja y mandarina pertenecen al género *Citrus*, la composición proximal de sus bagazos es rica en celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina, los cuales al ser hidrolizados podrían producir en primera instancia azúcares reductores, y con una operación posterior un biocombustible.

Se realizó el pretratamiento alcalino de los bagazos de toronja y mandarina usando tres diferentes temperaturas (50°C, 70°C y 90°C) y tres concentraciones de hidróxido de sodio (1,25%, 2,5% y 3,75% m/m), con el fin de mejorar la sacarificación del material lignocelulósico presente en cada bagazo. Se utilizaron dos cocteles enzimáticos comerciales de pectinasa (Pectinex Novozymes,

Dinamarca) y celulasa (NS-22192, Novozymes, Dinamarca) para encontrar aquel procesamiento que favorezca una mayor producción de azúcares reductores.

El pretratamiento más eficiente para la obtención de glucosa a partir de residuos de mandarina se obtuvo al utilizar una concentración 2,75% m/m de NaOH y una temperatura de 90°C, y una posterior sacarificación mediante una mezcla enzimática pectinasa y celulasa. Para toronja las mejores condiciones resultaron con 1,25% m/m de NaOH y una temperatura de 90°C. La mezcla enzimática de ambos cocteles (celulasa y pectinasa al 1% m/m de proteína) fue la que produjo la mayor cantidad de azúcares reductores.

En un primer acercamiento se evaluó si el pretratamiento alcalino suave realizado a ambas pulpas permitía generar hidrolizados con características adecuadas para ser transformados hacia etanol utilizando una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* (Lallemand, EUA), obteniendo una concentración máxima de 22mg/mL de etanol para mandarina y 20 mg/mL para toronja al inocular 8,46mg de cepa liofilizada en 30g de material seco.

También se probó la factibilidad de los hidrolizados de pulpa de toronja para ser transformados en una mezcla gaseosa de metano y CO₂ a partir de la inoculación de líquido ruminal a una temperatura de 40°C. Se metabolizó cerca del 47% de la glucosa en el hidrolizado y al diluirlo diez veces se metaboliza prácticamente toda la glucosa.

INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas ha habido una tendencia creciente a la valorización de productos agrícolas crudos. A medida que las poblaciones se han vuelto más urbanizadas esta tendencia ha ido en aumento. Dentro de la globalización de la industria alimentaria la demanda de jugo y de bebidas en general se ha ampliado notablemente. Sin embargo, se observa que solo unas cuantas frutas y verduras han llegado a ser parte de la cartera exitosa de productos de las grandes empresas, dentro de las que se encuentran algunos de estos cítricos. Zumos tales como el de naranja, uva, piña, toronja, manzana, tomate y sus mezclas están bien posicionados en los países desarrollados.

Sin embargo, hoy en día enfrentamos un fuerte problema de contaminación ambiental y es de suma importancia encontrar alternativas para evitar esta situación y de ahí retomar la idea propuesta por Anastas y Warner (1998) sobre practicar la química verde, que consiste en diseñar productos y procesos químicos que reduzcan o eliminen el uso y la generación de compuestos peligrosos o contaminantes, además de promover la innovación en la química con beneficios económicos y ambientales.

Existe evidencia científica en que partiendo de los residuos de procesadoras de cítricos puede obtenerse una amplia gama de productos con alto valor, ya sea partiendo de bagazo, cáscaras o semillas. Se ha encontrado que el bagazo contiene varios mono y disacáridos residuales adheridos, siendo los principales glucosa, fructosa y sacarosa. Su matriz está compuesta por polisacáridos tales como celulosa, hemicelulosa y pectina (Ting y Deszyck, 1961). Estos últimos al ser hidrolizados con enzimas como pectinasas, celulasas, y beta-glucosidasa, permiten producir glucosa, fructosa, galactosa, arabinosa, xilosa, ramnosa, y ácido galacturónico (Nishiyo y Nagai, 1979; Marshall y cols, 1985; Ben-Shalom, 1986; Echeverria y cols., 1988; Grohmann y Baldwin, 1992; Grohmann y cols., 1994, 1995).

La hidrólisis de la pectina genera ácido galacturónico, además de monosacáridos como arabinosa y xilosa, los azúcares mencionados anteriormente pueden ser fermentados por *Escherichia coli* K011 la cual a través de ingeniería genética se le integra en el cromosoma los genes que codifican para la enzima piruvato decarboxilasa y la alcohol deshidrogenasa de *Zymomonas mobilis* para producir etanol y ácido acético (Grohmann y cols., 1994.). *Escherichia coli* KO11 es una cepa bacteriana recombinante reportada para fermentar arabinosa y xilosa, así como las hexosas a etanol (Ohta y cols., 1990; Beall y cols., 1991).

El concepto de la utilización de la celulosa como materia prima para producir azúcares que puedan ser bio-convertidos a combustibles mediante el empleo de microorganismos ha retomado gran importancia en los últimos años debido a los efectos adversos que han producido los gases de efecto invernadero provenientes de hidrocarburos de origen fósil (Sun & Cheng, 2002). Las fuentes celulósicas potencialmente utilizables son los desechos de la industria maderera (en forma de aserrín), los agrícolas (bagazos), y los domésticos (jardinería).

En la actualidad, la mayoría del etanol combustible en los Estados Unidos se produce a partir de maíz. El reto principal de la industria y la biotecnología en la producción de combustibles es la bioconversión de la celulosa, por lo que las enzimas celulasas han adquirido una importancia enorme en estos procesos. Para contender con los grandes volúmenes de residuos lignocelulósicos requeridos en la producción de etanol a niveles industriales, se hacen necesarias las enzimas con altas actividades en diferentes condiciones de temperatura, salinidad y pH, además de contar con una cepa capaz de metabolizar la mayor concentración posible del sustrato producido (Sun y Cheng, 2002).

Una vez elegidos los materiales celulósicos es necesario pretratarlos mediante métodos fisicoquímicos y biológicos (Galbe y Zacchi, 2007; Lee y cols., 2007). Para obtener los máximos rendimientos de transformación de la biomasa su pretratamiento debe ser muy eficiente y permitir una alta recuperación de los carbohidratos y la lignina (sin descomponerlos). El líquido debe contener bajas o nulas concentraciones de inhibidores para la etapa de fermentación (por ejemplo:

vainillina, ácido p-cumárico y ácido ferúlico provenientes de la degradación de la lignina; ácido acético y 5-hidroximetilfurfural (HMF), que son compuestos derivados de la degradación de hexosas y pentosas, evitando así un paso extra para su eliminación, y con ello mantener bajos los costos de operación (Klinkey cols., 2004). Se han estudiado diferentes tipos de pretratamientos, buscando satisfacer las necesidades anteriores, y en general, son una combinación de condiciones físicas y químicas (Mosier y cols., 2005).

Independientemente del método de pretratamiento a utilizar, en primer lugar se recomienda cortar o pulverizar la biomasa mediante trituración, astillamiento o molienda, con el propósito de aumentar el área superficial de la celulosa (Moiser y cols., 2005).

Por lo general, durante los pretratamientos en medios alcalinos la estructura de la celulosa queda íntegra, pero se produce una hidrólisis parcial de la hemicelulosa y lignina. Tienen la ventaja de no producir inhibidores de la fermentación cuando se trabaja bajo temperaturas moderadas ($<100^{\circ}\text{C}$), (Galbe y Zacchi, 2007).

Una vez liberados los azúcares, el siguiente paso es la fermentación microbiana para la producción de etanol, que ha sido el primer biocombustible de uso industrial. El microorganismo tradicionalmente usado en la industria de producción de alcohol es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que llega a crecer hasta en concentraciones de 146 g/L de etanol a 30°C , en un lote continuo (van Maris y cols., 2006).

Los residuos lignocelulósicos de cítricos presentes en pequeñas, medianas y grandes empresas constituyen una materia prima muy abundante, han sido poco estudiados y representan la oportunidad para ser transformados en diversos productos con valor agregado, por ejemplo, la obtención de etanol ó metano, ésto dentro de un marco pertinente de evaluación costo-beneficio-huella de carbono.

MARCO TEÓRICO

Materiales lignocelulósicos

La comprensión de la complejidad que presenta la biomasa lignocelulósica, especialmente su composición química y estructura, son un requisito previo para el desarrollo de las tecnologías de pretratamiento eficaces para abrir su estructura. El diseño de enzimas eficientes que permitan liberar los azúcares es otra estrategia fundamental, así como la ingeniería de microorganismos para convertir los azúcares en diversos productos químicos de base biológica (Lee y cols., 2007).

El componente principal de los residuos agroindustriales es la lignocelulosa (figura 1), la cual está constituida por tres fracciones principales: la celulosa (40-60%), que está protegida por la hemicelulosa (con una composición aproximada de 20-40%) y por la lignina (10-25%), formando una matriz compleja (BNDES, 2008).

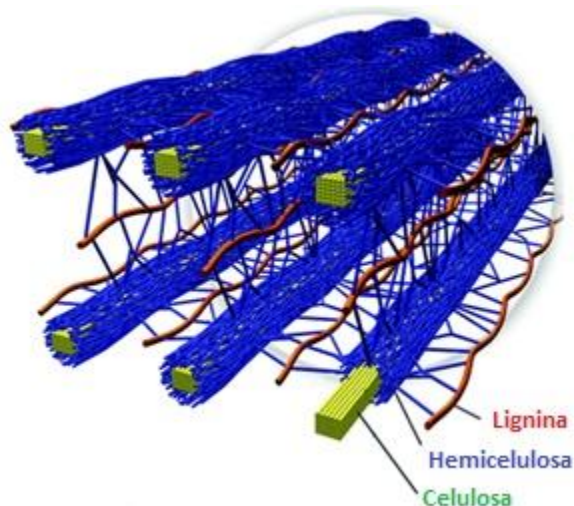


Figura 1. Representación estructural de una matriz lignocelulósica (US Department of Energy Genome Programs image gallery, 2016).

La celulosa es un polímero lineal del dímero (celobios) con enlaces β -1,4, su hidrólisis genera unidades de D-glucosa. La celulosa forma una estructura muy cristalina, rígida y difícil de romper (figura 2). La hemicelulosa es un heteropolisacárido que puede contener ~85% de pentosas (D-xilosa 75% y L-arabinosa 10%), ~15% de hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) y además, ácidos metilglucurónico, galacturónico y glucurónico (figura 3); la hemicelulosa es mucho más fácil de hidrolizar que la celulosa. La lignina es un heteropolímero amorfo ramificado de naturaleza fenólica con grupos metoxi y fenil propánicos formado por alcoholes aromáticos como el cumarílico, coniferílico y sinapílico (figura 4) (BDNES, 2008; Carreón y cols., 2009; Cuervo y cols., 2009).

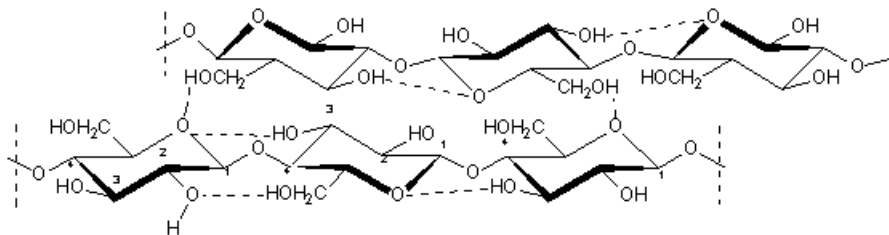


Figura 2. Representación molecular del polímero celulosa.

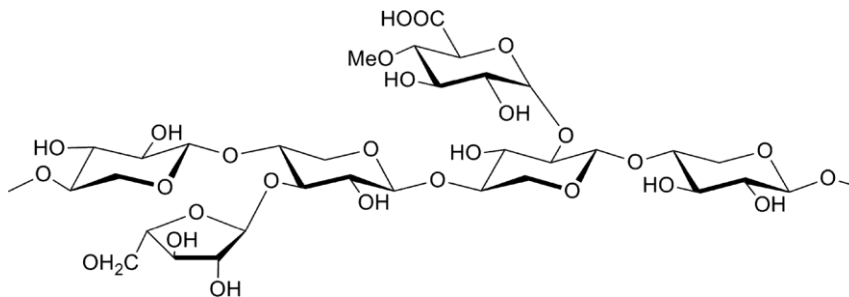


Figura 3. Representación molecular del heteropolímero hemicelulosa.

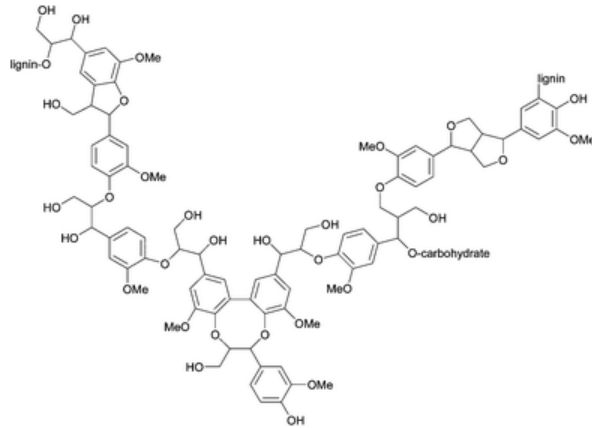


Figura 4. Representación molecular de lignina.

Pretratamientos de materiales lignocelulósicos

El proceso clave para la producción eficaz de azúcares monoméricos es el pretratamiento de la biomasa. El complejo denominado lignocelulosa está compuesto por una matriz de celulosa y hemicelulosa, protegida por cadenas de lignina. El pretratamiento se realiza para romper la matriz y generar porosidad, para de esta manera facilitar el acceso de las enzimas al sustrato (Sánchez y cols., 2008).

El pretratamiento se realiza para producir cambios en la estructura macroscópica y microscópica de la biomasa (figura 5), con el objetivo de facilitar la posterior hidrólisis enzimática.

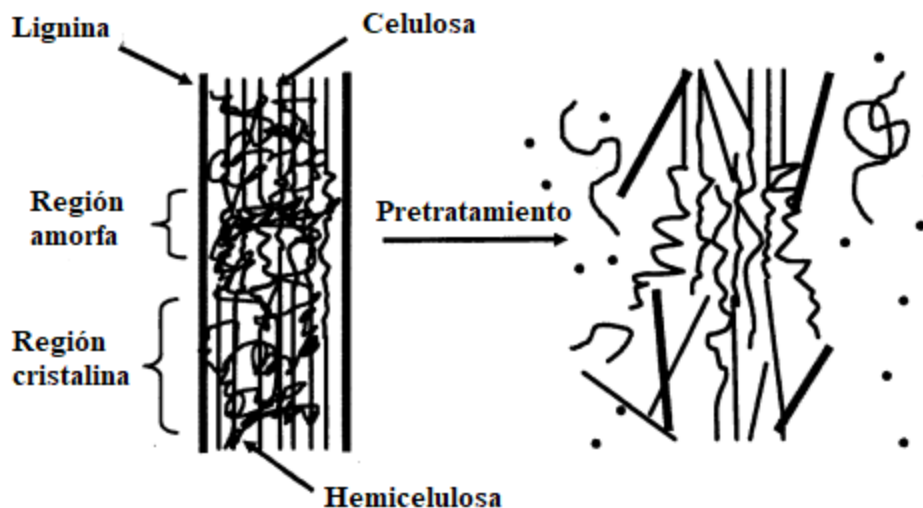


Figura 5. Representación del efecto macroscópico del pretratamiento de materiales lignocelulósicos (Moiser y cols., 2005).

Pretratamientos físicos

Los pretratamientos físicos no utilizan ningún producto químico y se realizan con el propósito de disminuir el tamaño de partícula por medios mecánicos tales como trituración, pulverización o molienda. Así mismo, se aumenta la superficie de contacto de la biomasa.

Pretratamientos químicos

Los métodos químicos implican el uso de agentes químicos diluidos, por ejemplo: ácidos, álcalis, amoníaco, disolventes orgánicos, SO₂, CO₂ o similares. Estos métodos son fáciles de utilizar y presentan un buen rendimiento en su conversión en periodos cortos de contacto.

a) Pretratamiento ácido

El tratamiento previo con ácido ha sido ampliamente estudiado; con éste se alcanzan altos rendimientos en la transformación de la hemicelulosa e incluso la celulosa puede ser transformada en azúcares a partir del complejo denominado "lignocelulosa".

Se lleva a cabo normalmente con ácidos diluidos (por lo general entre 0,2% y 2,5%) a temperaturas entre 130 y 210°C. El ácido sulfúrico es el más estudiado para el tratamiento previo, sin embargo, también se utilizan los ácidos clorhídrico, nítrico y fosfórico. El medio ácido ataca a los polisacáridos, especialmente a la hemicelulosa, resultando más fácil su hidrólisis en comparación con la celulosa (Cardona y cols., 2009). Sin embargo, el ácido también promueve la producción de diversos compuestos inhibidores para el crecimiento de los microorganismos como el ácido acético, furfural y 5-hidroximetilfurfural (HMF).

b) Pretratamiento alcalino

El tratamiento previo alcalino de la matriz lignocelulósica provoca una digestión de la lignina y hace que la celulosa y hemicelulosa queden disponibles para una degradación enzimática mejorada (Pandey y cols., 2000). Mediante este proceso los sustratos se pueden fraccionar en lignina soluble, hemicelulosa y celulosa, lo que hace posible transformarlos en productos con alto valor. Los hidróxidos de sodio, potasio, calcio y amonio son utilizados en este proceso de pretratamiento. La ventaja de ello es que se utilizan temperaturas y presiones menores en comparación con otras tecnologías de pretratamiento (Moiser y cols., 2005).

c) Oxidación húmeda

La oxidación húmeda consiste en tratar la matriz lignocelulósica con agua y con oxígeno a temperaturas superiores a 120°C (Banerjee y cols., 2009). Mediante esta técnica se promueve la transferencia de la hemicelulosa y lignina desde la fase sólida hacia la fase líquida. Las principales reacciones en la oxidación húmeda son la formación de ácidos del proceso hidrolítico y las reacciones oxidativas. Los productos de hidrólisis de la hemicelulosa provenientes de la oxidación húmeda son oligosacáridos (Alvira y cols., 2010).

d) Método Organosolvente

En esta técnica se utilizan numerosas mezclas de disolventes orgánicos como metanol, etanol, acetona, etilenglicol, ácido acético, entre otros con el objetivo de

solubilizar la lignina y proveer celulosa y hemicelulosa para que las enzimas las puedan hidrolizar fácilmente (Zhao y cols., 2009).

Pretratamientos Fisicoquímicos

a) Explosión con vapor

La biomasa se calienta con vapor de alta presión durante unos minutos (20-50 bar y una temperatura de 160-290°C); el tratamiento se detiene con la descompresión súbita del sistema a la presión atmosférica (Sánchez y cols., 2005; Neves y cols., 2007) lo que provoca que se expanda la matriz lignocelulósica, resultando en la separación de las fibras individuales, dejando expuesta a la celulosa (Balat y cols., 2008). La recuperación de xilosa es alta (45-65%), lo cual establece que el pretratamiento de explosión con vapor sea una alternativa económicamente atractiva (Hamelinck y cols., 2005).

b) Agua caliente líquida

Este método utiliza agua líquida caliente a presión por encima de su punto de ebullición, lo cual permite hidrolizar la hemicelulosa (Neves y cols., 2007). Es un método de pretratamiento hidrotérmico que libera una cantidad elevada de oligosacáridos y azúcares de hemicelulosa. El tratamiento se produce generalmente a temperaturas de 170-230°C, en combinación con presiones superiores a 5 MPa durante 20 minutos, sin embargo, contribuye a la generación de productos como furfural y ácidos carboxílicos que son muy tóxicos para la fermentación, ya que inhiben el crecimiento microbiano (De Silva y cols., 2010).

c) Explosión de fibras con amoníaco (AFEX)

En este proceso la biomasa es pretratada con amoníaco a temperaturas de 60 a 100°C y altas presiones por un periodo de tiempo variable. Cuando la presión es liberada mediante una expansión rápida del gas provoca el hinchamiento y la ruptura física de las fibras y una decristalización parcial de la celulosa. La digestibilidad de la biomasa se incrementa notablemente después del pretratamiento, por lo tanto, la hidrólisis enzimática tiene rendimientos altos.

Este pretratamiento puede alcanzar más del 90% de la conversión de celulosa y hemicelulosa a azúcares fermentables. A pesar de que se puede remover una pequeña cantidad de lignina o hemicelulosa en el proceso, la digestión enzimática (incluso con bajas cargas de enzima) permite obtener rendimientos altos, comparado con otras alternativas de pretratamiento (Wyman y cols., 2005).

d) Explosión con CO₂

El pretratamiento con CO₂ actúa de forma similar a la técnica de explosión con vapor de agua o amoníaco, sin embargo, la explosión con CO₂ tiene un mayor beneficio que sus homólogos, ya que no promueve la formación de inhibidores (Hamelink y cols., 2005; Prasad y cols., 2007).

El método está basado en la utilización de CO₂ como fluido super crítico, el cual se refiere como un fluido comprimido por arriba de su presión y temperatura crítica, en este estado presenta características de difusión como un gas y una alta interpenetración en matrices sólidas, lo que facilita la remoción de lignina de la matriz.

Pretratamientos biológicos

Los pretratamientos biológicos emplean microorganismos capaces de degradar la lignina, por ejemplo, los hongos.

Una de las ventajas más importantes de este método es que no necesitan productos químicos ni fuerzas mecánicas; sin embargo, no se garantiza la total hidrólisis de los oligosacáridos. Los rendimientos de hidrólisis resultan ser bajos en comparación con la enzimática y de larga duración, lo cual es una limitante para llevarlo a operaciones de escala industrial (Balat y cols., 2008).

Hidrólisis enzimática

En la sacarificación los hidratos de carbono complejos se convierten en monómeros simples. En comparación con la hidrólisis ácida, la hidrólisis enzimática requiere menos energía y las condiciones son más suaves (Ferreira y cols., 2009). Las condiciones óptimas para hidrolizar la celulosa van de 40 a 50°C

y un intervalo de pH de 4 a 5 (Neves y cols., 2007). La hidrólisis enzimática es ventajosa en comparación con la hidrólisis química ácida o alcalina debido a su baja toxicidad, en este caso para *S cerevisiae* que se inoculara en una etapa posterior para llevar a cabo la fermentación. En esta operación no se forma ningún subproducto inhibitorio. La hidrólisis enzimática es llevada a cabo por enzimas las cuales tienen la característica de ser específicas para su sustrato. La celulosa se hidroliza a glucosa mientras que la hemicelulosa da lugar a diversas pentosas y hexosas en menor concentración (figura 6).

Las enzimas denominadas celulasas se pueden clasificar en tres clases (Olsson y cols., 2005):

- Exo-1,4- β -D-glucanasas o celobiohidrolasas (CBH), las cuales cortan unidades de celobiosa residuales en la cadena de celulosa. Esta clase también incluye a la menos común exo-1,4- β -D-glucanohidrolasa, la cual libera D-glucosa desde los extremos o residuos de la cadena de celulosa.
- Endo-1,4- β -glucanasas (EG). Estas enzimas hidrolizan los enlaces glucosídicos β -1,4 internamente y al azar en la cadena de celulosa.
- 1,4- β -D-glucosidasas, las cuales hidrolizan celobiosa a glucosa y también corta unidades de glucosa desde los oligosacáridos.

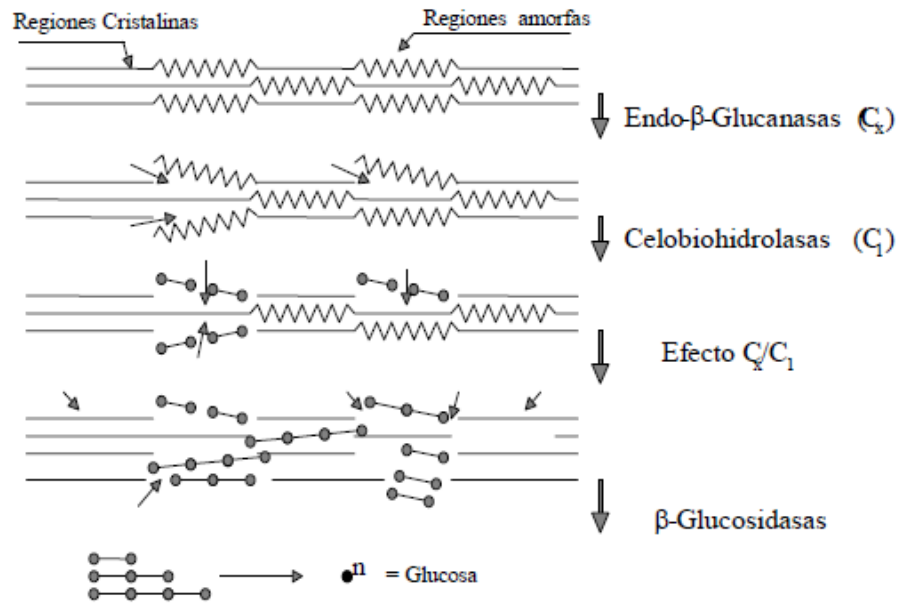


Figura 6. Mecanismo de hidrólisis enzimática de la celulosa.

Fermentación alcohólica

La producción de etanol es un proceso muy conocido: la fermentación alcohólica. En todos los casos se parte de azúcares libres, que pueden proceder del almidón o celulosa. En las primeras etapas de la fermentación cada molécula de glucosa se transforma en dos moléculas de ácido pirúvico. A partir de dicho ácido, diferentes rutas metabólicas conducen a la formación de otros tantos productos finales. En la fermentación alcohólica que llevan a cabo las levaduras, el producto final resultante es etanol y en menor proporción el glicerol (Fajardo, 2016).

Como fuente de glucosa se utilizan materiales muy diversos: granos de maíz, caña de azúcar, celulosa de la madera, sorgo, papas, trigo e incluso residuos vegetales ricos en fibras. Todos ellos son los materiales comúnmente empleados (García, 2011).

Fermentación anaerobia metanogénica

La fermentación metanogénica se lleva a cabo en un ambiente anaeróbico estricto y la realizan microorganismos que se autorregulan de acuerdo con el pH y temperatura del medio y se lleva a cabo en tres etapas simultáneas (figura 7):

Hidrólisis: Se transforman por hidrólisis compuestos orgánicos complejos (proteínas, grasas, carbohidratos, etc.) en compuestos de menor peso molecular. Los productos de esta fase son los que sirven de sustrato a los microorganismos formadores de ácidos en la siguiente etapa.

Etapas acidogénica: Durante esta etapa tiene lugar la fermentación de las moléculas orgánicas solubles en compuestos que puedan ser utilizados directamente por las bacterias metanogénicas (ácidos acético, fórmico, H_2) y compuestos orgánicos más reducidos (ácidos propiónico, butírico, valérico, láctico y etanol principalmente) que tienen que ser oxidados por bacterias acetogénicas en la siguiente etapa del proceso. La importancia de la presencia de este grupo de bacterias no sólo radica en el hecho que produce el alimento para los grupos de bacterias que actúan posteriormente, sino que, además eliminan cualquier traza del oxígeno disuelto del sistema.

Etapas acetogénica: Mientras que algunos productos de la fermentación pueden ser metabolizados directamente por los organismos metanogénicos (H_2 y ácido acético), otros (etanol, ácidos grasos volátiles y algunos compuestos aromáticos) deben ser transformados en productos más sencillos, como acetato (CH_3COO^-) e hidrógeno (H_2), a través de las bacterias acetogénicas.

Etapas metanogénica: Los microorganismos transforman las sustancias generadas en las etapas anteriores (acetato, H_2 y CO_2) en metano y dióxido de carbono.

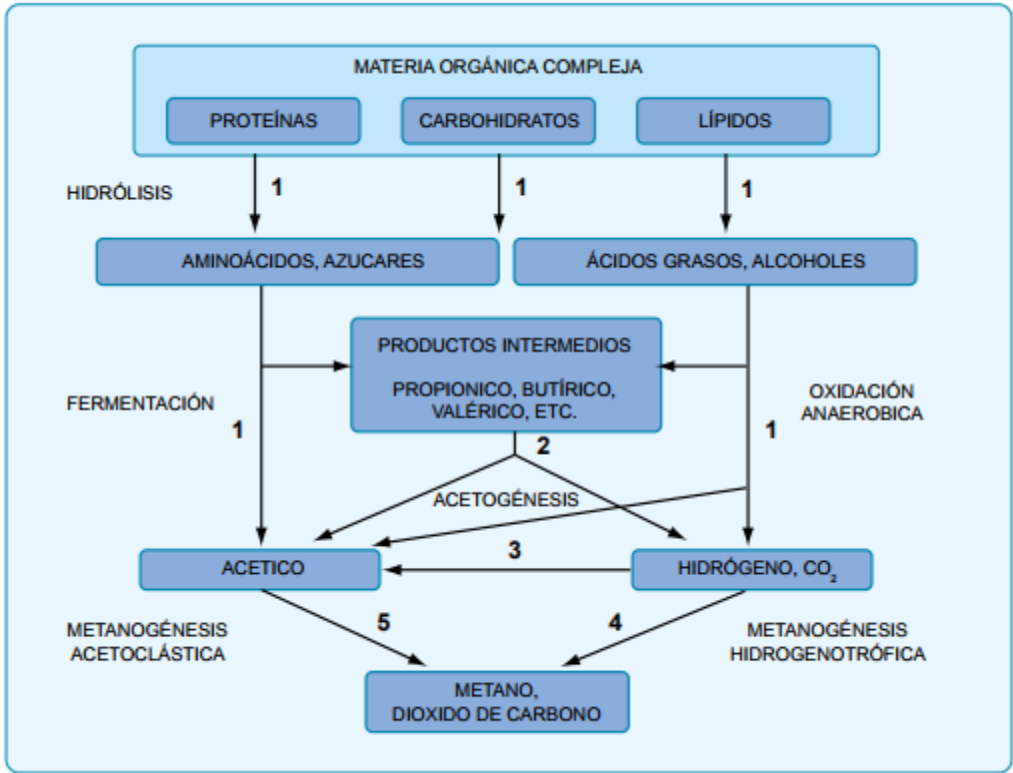


Figura 7. Diagrama representativo del metabolismo anaerobio de materiales lignocelulósicos.

OBJETIVOS

General:

Evaluar el potencial del endocarpio residual proveniente de dos frutos cítricos diferentes para obtener hidrolizados ricos en azúcares mediante su acondicionamiento alcalino en un reactor termo-mecano-químico.

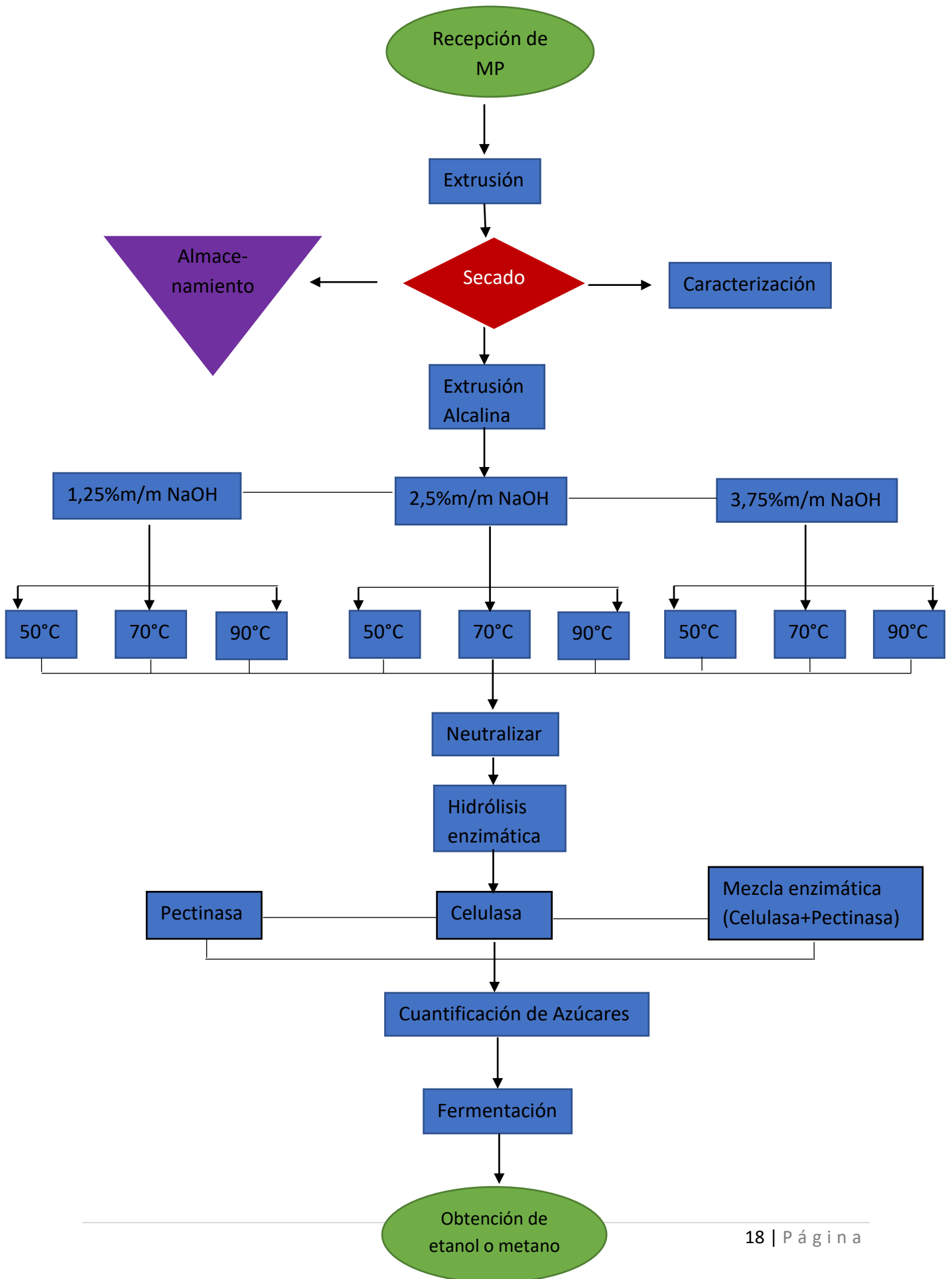
Particulares:

- Caracterizar el bagazo de ambos cítricos (toronja y mandarina).
- Determinar las condiciones óptimas para producir azúcares reductores en función de las variables de pretratamiento: temperatura y concentración de álcali.
- Evaluar dos cocteles enzimáticos con actividad hidrolítica para los sustratos mayoritarios: pectina y celulosa.
- Evaluar el potencial de los hidrolizados para la obtención de etanol o metano.

HIPÓTESIS

Un pretratamiento alcalino suave provocará una ruptura de la matriz lignocelulósica, facilitando así la sacarificación de los bagazos. Ello se verá reflejado en un aumento en la concentración de azúcares en comparación con los bagazos sin pretratamiento.

DIAGRAMA DE FLUJO



MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de la muestra

Se tomaron toronjas y mandarinas frescas de temporada y se separaron las cáscaras, las cuales fueron destinadas a otro proyecto para recuperar los aceites esenciales. Los frutos enteros libres se exprimieron para recuperar los endocarpios residuales. Los bagazos internos frescos exprimidos fueron inmediatamente recolectados y se introdujeron en un reactor termo mecánico disponible en el laboratorio para reducir significativamente el tamaño de las partículas y separar exhaustivamente el jugo remanente en las muestras. Se recolectó el jugo y se le cuantificaron azúcares reductores totales por el método DNS (Miller, 1959). Se procedió a evaluar el potencial del jugo residual presente en el endocarpio para la producción de etanol, con el objetivo de aprovechar por completo la matriz. Para ello se colocaron 25 gramos de jugo en tubos de plástico y se colocaron en una centrífuga (Labtek XC-2000, China) durante cinco minutos a 3000 RPM, la determinación de azúcares reductores se realizó a ambos líquidos (toronja y mandarina) por el método de DNS. Posteriormente a cada fase se le inoculó 2 g/L de la cepa de *Sacharomyces cerevisiae* (Lallemand, EUA) disponible en la planta piloto de cerveza de la Facultad de Química y se incubó a 28°C durante cinco días. El contenido de etanol se determinó por cromatografía de gases en un equipo Gow-Mac (Series 580; Bridgewater, NJ) equipado con un detector de ionización de flama y una columna de acero inoxidable de 1/8" y 6 pies de longitud (2% Silar 10C, Graphpac GC 80/100; Alltech, Deerfield, EUA). Se utilizó nitrógeno grado cromatográfico (Praxair, México) como fase móvil con un flujo de 20 mililitros por minuto. El detector de ionización de flama se alimentó con hidrógeno (30 mililitros/minuto) y aire (300 mililitros/minuto) grado cromatográfico (Praxair, México). Las temperaturas del inyector, horno y detector fueron mantenidas en 180, 190 y 200°C respectivamente. Se utilizó una curva patrón de etanol anhidro (Meyer, grado analítico) en agua como estándar externo para cuantificar el contenido de etanol.

En esta primera extracción de jugo residual se trabajó a temperatura ambiente, sin modificación previa del pH (pH=6). Posteriormente la muestra de bagazo se secó en una estufa de convección Lindberg/Blue, modelo M01430A-1 (EUA) a una temperatura de 60°C durante 24 horas para posterior almacenamiento de la fase sólida (figura 9).



Figura 8. Bagazo de mandarina extrudado y deshidratado.

Caracterización de bagazo. Cuantificación del contenido de celulosa, hemicelulosa, lignina y cenizas.

Para la caracterización completa de la fibra se utilizó el método de detergentes ácido y neutro, reportado previamente por Van Soest y Wine (Igartuburu y cols., 1997) colocando 0,5 gramos de materia seca y adicionado 50 mililitros de disolución detergente respectivo, calentando a ebullición (~103°C) durante una hora en un sistema de reflujo. El detergente neutro remueve el material soluble, el cual contiene básicamente proteínas, azúcares, lípidos y pectina. El detergente ácido remueve la hemicelulosa y retiene el material no soluble (que incluye la celulosa y la lignina de las paredes celulares). Posteriormente se adicionaron 10 mililitros de disolución saturada de KMnO_4 para oxidar por completo a la lignina y dejar únicamente a la celulosa. Esta última muestra se calcinó en una mufla a 550°C por 4 horas para la cuantificación de cenizas o minerales.

Determinación de humedad

El contenido de humedad en ambas muestras se determinó por gravimetría en una balanza analítica AND, modelo MF-50 (Japón) equipada con una lámpara de secado (Kirk y cols., 1996; Nollet, 1996).

Determinación de azúcares reductores

A la fracción obtenida posterior a la hidrólisis enzimática se le cuantificaron azúcares reductores totales con el método de DNS (Miller, 1959; James, 1999). El ácido 3,5-dinitrosalicílico se reduce en presencia del grupo aldehído reductor proveniente de la glucosa, formando el ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, mientras que el grupo aldehído reductor se oxida para formar un grupo carboxílico. El color resultante se midió por espectrofotometría de luz visible (540 nm) en un equipo Perkin Elmer, modelo Lambda 2S (EUA).

Para cuantificar glucosa en los hidrolizados se utilizó un kit electrónico (*Johnson & Johnson, EUA*), el cual consiste en aplicar 1 gota de muestra problema (diluida previamente) sobre una tira reactiva que contiene en su interior a la enzima glucosa oxidasa inmovilizada. La tira reactiva puede registrar una concentración de glucosa comprendida entre 1 a 1,7 mg/mL, con un intervalo de confiabilidad superior al 95%. Se verificó mediante una curva de calibración de glucosa (*Sigma-Aldrich, EUA*) en un intervalo de concentración de 1 a 2 mg/mL.

Determinación de proteína

Se cuantificó utilizando el método de Bradford (Nielsen, 1998) colocando 1.0 gramos de cada bagazo seco en 100 mL de agua destilada. La mezcla fue sometida a reflujo por 10 minutos. A partir del sobrenadante se tomó una alícuota de 0,1 mL y se adicionó 5 mL del reactivo Azul Brillante de Coomassie G-250 (*Bio-rad Laboratories, Inc., EUA*). Se dejó estabilizar durante 5 minutos y se midió la absorbancia a 595 nm. Para la curva patrón se utilizó albúmina sérica bovina (*Sigma-Aldrich, EUA*) en un intervalo de concentración de 1 a 10 mg/mL.

Extrusión alcalina

Se introdujeron 25 gramos de material seco al reactor termo-mecánico (figura 9), implementando la temperatura y la concentración de álcali deseada para cada tratamiento (tabla 1). Se cuenta con una configuración previa del husillo que permite obtener un tamaño de partícula conveniente. El material pretratado se recolectó en una bolsa al final del reactor y se neutralizó con H₃PO₄ concentrado.

Tabla 1. Condiciones de pretratamiento establecidas.

Temperatura (°C)	NaOH% m/m
50	1,25
50	2,5
50	3,75
70	1,25
70	2,5
70	3,75
90	1,25
90	2,5
90	3,75

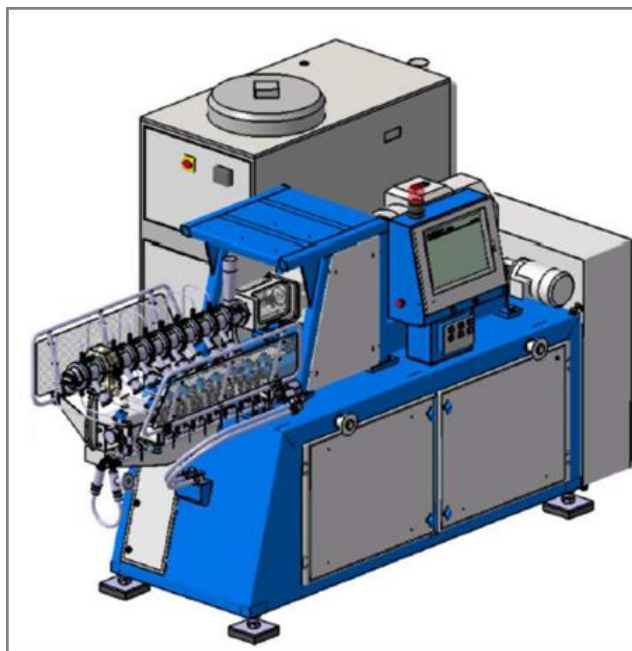


Figura 9. Reactor termo-mecano-químico.

Determinación de la actividad enzimática

En el laboratorio se dispone de un coctel celulolítico NS-22192 (Novozymes, Dinamarca) cuya actividad fue determinada mediante el método del papel filtro Whatman No. 1. (Ghose, 1987; Mandels y cols., 1976). El resultado fue expresado en unidades de papel filtro (FPU)/mL. La actividad enzimática del coctel pectinolítico Pectinex (Novozymes, Dinamarca) fue verificada mediante el ácido galacturónico producido (Blumenkrantz, 1973), partiendo de una carga inicial de 10 mg de pectina aislada en el laboratorio (Castro, 2017) en 2 mL de disolución tampón (pH 4,5). Se probó una temperatura de 45°C y un tiempo de reacción de 60 minutos. El volumen de enzima elegido fue 50 μ L.

Hidrólisis enzimática

Para esta operación se introdujeron 0,5 gramos de materia seca en un tubo de ensayo con 5 mL de buffer de citratos 0,1 M. Se adicionó 200 μ L del coctel Pectinex, o 45 μ L del coctel celulolítico NS-22192; es decir, una relación de 10 mg

proteína/ g muestra (1% m/m), como lo sugiere la literatura (Wilkins y cols., 2005). En el caso de la adición de ambas formulaciones se agregó 100 µL de Pectinex y 22 µL de celulasa NS-22192. Los tubos se incubaron a 45°C, durante 72 h y 200 rpm. Pasado este tiempo se cuantificaron azúcares reductores totales por el método DNS. Mediante la enzima glucosa oxidasa inmovilizada en un chip se determinó la concentración de glucosa.

Tabla 2. Condiciones establecidas para la evaluación de la hidrólisis enzimática del bagazo (toronja o mandarina) pretratado a diferentes condiciones

Enzima	Bagazo	
Pectinasa	Mandarina	Toronja
Celulasa	Mandarina	Toronja
Pectinasa+Celulasa	Mandarina	Toronja

Fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*

Para evaluar el impacto del pretratamiento alcalino sobre la calidad de los hidrolizados enzimáticos obtenidos se llevó a cabo la fermentación de los azúcares (hexosas) para el pretratamiento en que la producción de azúcares fuese mayor para cada uno de los dos bagazos. Se colocaron 30 gramos de materia seca en un matraz de tres bocas de 0,5 L (figura 11) adicionando 300 mL de buffer de citrato 100 mM, 6,24 mL de pectinasa y 1,3 mL de celulasa, es decir, 10 mg proteína total/g muestra. La hidrólisis se llevó a cabo durante 144 horas con agitación a 100 RPM. Posterior a esta operación se adicionó 8,46 mg de la cepa de levadura liofilizada y se dejó durante 120 horas a temperatura ambiente (28°C) (Fajardo, 2016). El monitoreo de la producción y consumo de azúcares, así como la producción de etanol se midió cada 24 horas.



Figura 10. Reactor de vidrio adaptado a una parrilla de calentamiento con un agitador mecánico.

Cuantificación de etanol por cromatografía de gases

Se inyectaron 3 μL de la muestra previamente fermentada y centrifugada al cromatógrafo de gases y se determinó la concentración de etanol por medio de un estándar externo construyendo una curva de calibración de etanol.

Acondicionamiento y obtención de líquido ruminal

La muestra de líquido ruminal fue amablemente proporcionada por el Dr. Alejandro Castrejón (FMVZ-UNAM) en el Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA, UNAM), ubicada en Topilejo en la Ciudad de México.

El líquido ruminal se obtuvo del estómago de una borrega alimentada con rastrojo de maíz. Mediante una sonda y una bomba de vacío se extrajo la muestra, inmediatamente se filtró con una manta de cielo para recibir el líquido libre de sólidos en un frasco de vidrio de color ámbar a temperatura ambiente. Se burbujeó

CO₂ con la finalidad de desplazar cualquier oxígeno presente y crear condiciones de anaerobiosis. Se mantuvo a 40°C durante su traslado al laboratorio y se aisló por completo del contacto con la luz.

Fermentación con líquido ruminal

Inicialmente se determinó su contenido de proteína por el método de Bradford, con la intención de cuantificar su concentración inicial en el líquido.

Para llevar a cabo la fermentación se trabajó con los hidrolizados enzimáticos del bagazo de toronja pretratado a 90°C y 1,25% NaOH. La carga inicial de materia orgánica consistió en colocar 40 mL de hidrolizado (10% consistencia) en cinco diferentes matraces Erlenmeyer de 50 mL. Se colocaron cinco controles de bagazo crudo utilizando una consistencia de 10%. Se burbujeó CO₂ a cada uno de los matraces conteniendo los hidrolizados enzimáticos o muestras crudas para desplazar el oxígeno disuelto. Se agregó el líquido ruminal aclimatado a 40°C con las cargas iniciales: 1,25 mL, 2,5 mL, 3,75 mL, 5,0 mL y 6,25 mL respectivamente. Dichos matraces fueron sellados y burbujeados nuevamente con CO₂. Se colocó un globo vacío en el cuello cada matraz para recibir el gas formado durante toda la fermentación. Se incubaron durante 144 horas (6 días) a 40°C con agitación suave, manteniendo oscuridad en el interior de la incubadora (Rubio, 2015). Posteriormente se trabajó con diluciones 1:1, 1:5 y 1:10 del hidrolizado enzimático antes mencionado, inoculando 6,25 mL de líquido ruminal en cada matraz siguiendo el procedimiento antes señalado. Se incubaron los matraces por 3 días bajo las condiciones antes mencionadas.

Transcurrida la fermentación se determinó la concentración final de azúcares reductores totales y glucosa. Para determinar la cantidad de proteína de la biomasa producida se tomó 500 µL del medio de fermentación y se colocó en tubos con taparroscas, se agregó 500 µL de NaOH 0,2 M y la mezcla se calentó a ebullición por 10 minutos. Se neutralizaron con H₂SO₄ 0,2 M. Se tomaron 50 µL de líquido neutralizado y se aplicó reactivo de Bradford. Se incorporó una curva patrón de albúmina sérica bovina. Se midió la absorbancia de las muestras a 595 nm en el espectrofotómetro de luz visible (Hernández-Meléndez y cols., 2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de bagazo

Durante la preparación de la muestra se evaluó un primer uso potencial del proceso de acondicionamiento partiendo de bagazo “húmedo”, es decir, tal cual se recibiría de alguna planta procesadora de jugos, para finalmente obtener un bagazo con menor humedad, tamaño de partículas inferiores y jugo limpio.

En la figura 11 se muestran los valores experimentales correspondientes al balance de materia del bagazo de toronja. Esta información es consistente con la reportada por Sánchez y cols., 2014, quienes reportaron un contenido de materia seca de 17,8% para la pulpa de naranja. En este caso fue 15,8%.

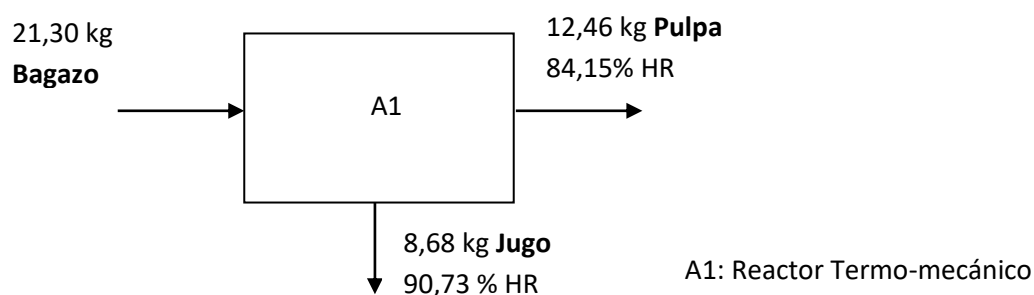


Figura 11. Balance de Materia de la etapa de acondicionamiento de bagazo de toronja.

Al llevar a cabo la centrifugación del jugo proveniente del acondicionamiento A1, se observa que en promedio un ~26% consta de sólidos muy finos, componentes de la fibra (sedimento) y prácticamente el ~95% corresponde a la fracción líquida (sobrenadante) (figura 12 y tabla 3). Así mismo se cuantificaron azúcares reductores totales (ART) en ambas fases con el objetivo de aprovechar por completo la matriz, obteniéndose una mayor concentración de ART en el sobrenadante con respecto al sedimento (compuesta principalmente por polisacáridos), lo que explica que la producción de etanol sea mayor en el

sobrenadante, lugar donde se encuentra el sustrato óptimo para la levadura *S. cerevisiae* (tabla 4).

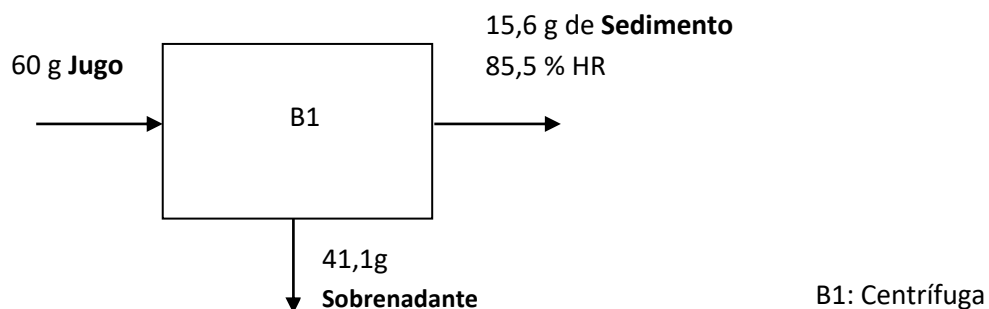


Figura 12. Balance de Materia de la separación del jugo de toronja.

Un ejemplo idéntico se realizó para el bagazo de mandarina y en las Tablas 3 y 4 se muestran los resultados condensados.

Tabla 3. Caracterización del jugo obtenido de la molienda de residuos cítricos

Jugo		
	Mandarina	Toronja
ART mg/mL	38,6	32,7
%Sobrenadante	79,5	68,5
%Sedimento	16	26
%Humedad	82,4	85,5

Tabla 4. Obtención de etanol a partir de la fermentación con *S. Cerevisiae*

Producción de Etanol		
	Mandarina	Toronja
Sobrenadante		
ART mg/mL	28	27,5
Etanol mg/mL	8,6	8,1
Sedimento		
ART mg/mL	12	14
Etanol mg/mL	2,8	5,6

En la caracterización de los macro componentes presentes en el bagazo proveniente de los frutos obtenidos en la Central de Abastos de la Ciudad de México se obtuvieron valores de celulosa de 15% y 12% para mandarina y toronja respectivamente, los cuales representan una fuente primordial de glucosa. Dichos valores se encuentran en sintonía con los reportados por Sánchez y cols., 2014 para pulpa de naranja (9,93% de celulosa). La hemicelulosa se encuentra en una menor proporción, es decir, 3% en toronja y 6% en mandarina. La lignina presentó un valor de 2% para toronja y 5% para mandarina, en este sentido, Sánchez y cols., 2014, reportaron un valor de 2,81% de lignina para pulpa de naranja. Para pectina se obtuvieron valores de 38% y 36% para mandarina y toronja respectivamente. El porcentaje de material péctico de ambos endocarpios es mayor en comparación con reportes científicos con valores de ~23% de pectina (base seca) a partir de cáscara de lima (Ciriminna, 2015). El resto de los componentes no tienen especial importancia nutricional y no representan cuantitativamente cifras elevadas (Rojas, 1994).

Es importante destacar la composición de glucosa adherida que aún presentan ambos bagazos (14% para mandarina y 14% para toronja), así como la composición másica de otros azúcares adheridos, que pueden ser fructosa y sacarosa, los cuales registraron valores de 8 y 9% para la mandarina y toronja respectivamente. Un pretratamiento alcalino suave (para reducir el tamaño de las partículas principalmente) será indispensable para no dañar los azúcares nativos, ya que constituyen la fuente primordial de azúcares en comparación con los porcentajes de celulosa y/o pectina.

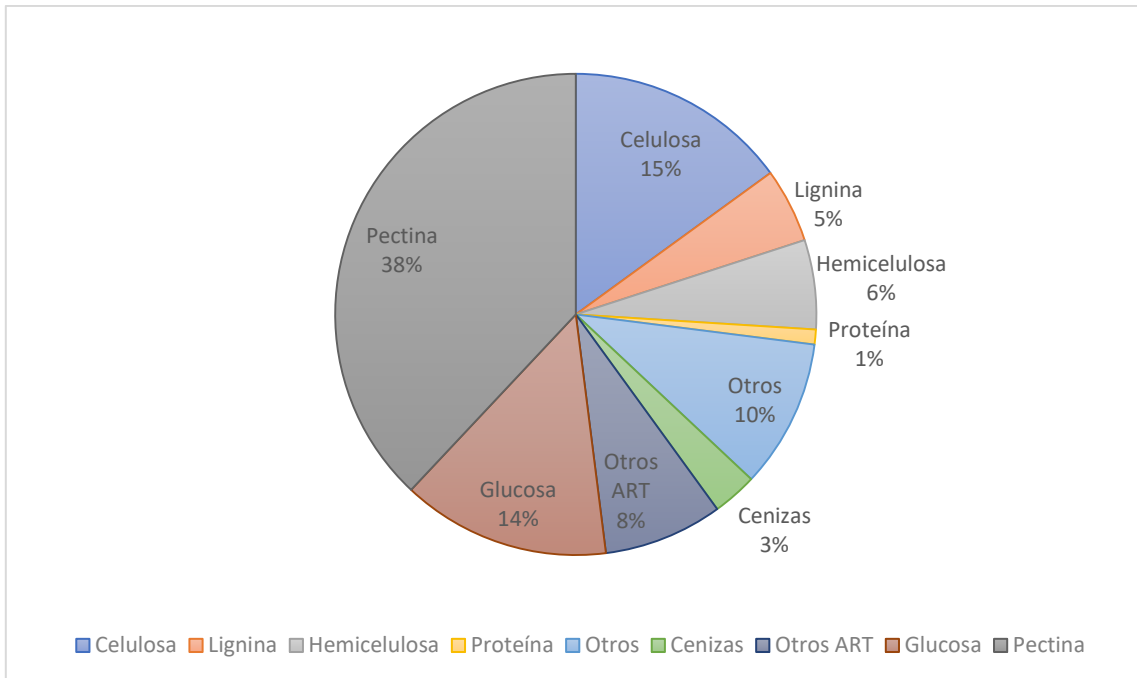


Figura 13. Componentes de bagazo de mandarina reportados en materia seca.

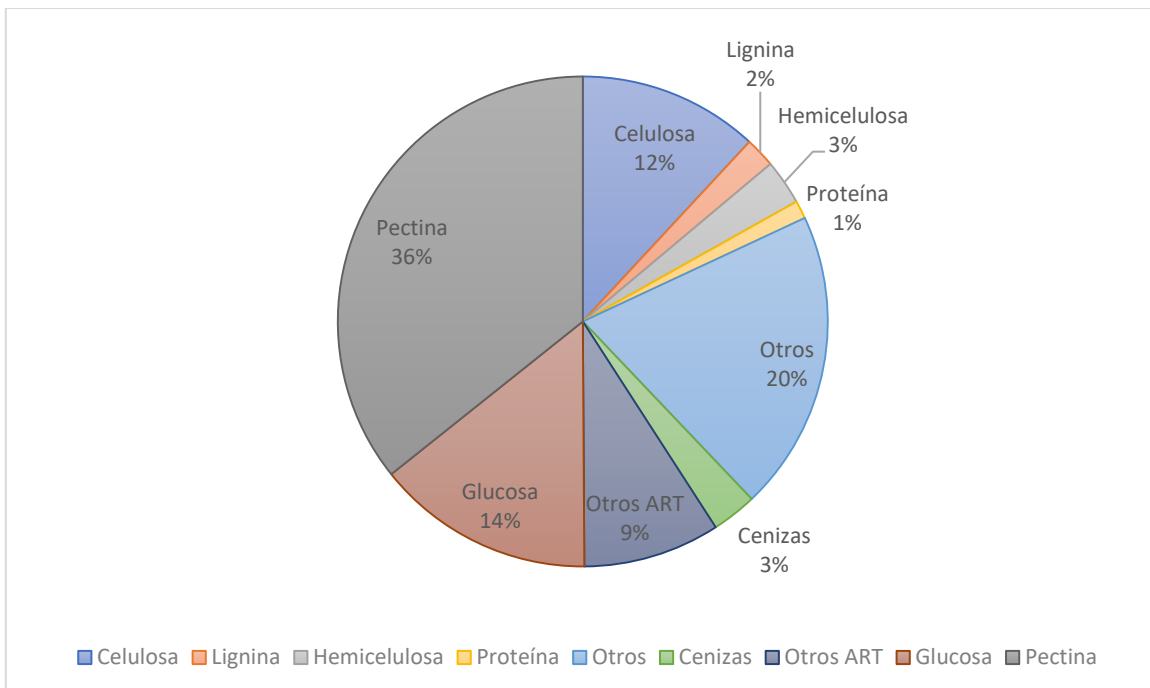


Figura 14. Componentes de bagazo de toronja reportados en materia seca.

Cabe mencionar que al llevar a cabo la neutralización con ácido fosfórico sobre el bagazo (posterior al proceso de pretratamiento alcalino) existe la formación de sales por medio de una reacción ácido-base, por lo tanto, hay un reajuste menor en el contenido de minerales. Por ello es importante considerar el contenido de oxisales en la matriz ya que puede representar un efecto inhibitorio para los diferentes microorganismos utilizados en este trabajo. Para *S. cerevisiae* se encuentra reportado un efecto inhibitorio para una concentración de cloruro de sodio al 8% (Duran y cols., 2005). En la matriz utilizada se observa una concentración máxima de sales del 6% para el bagazo pretratado con NaOH 3,5%, lo cual no representa un factor limitante para el crecimiento de este microorganismo.

Caracterización enzimática

Se evaluó la actividad celulolítica del coctel NS-22192 utilizando el método propuesto por Ghose en 1987. Los valores de actividad se reportaron en unidades FPU (Unidades de Papel Filtro/mL). La actividad enzimática sobre papel filtro debe medirse a diluciones de la enzima tales que liberen en el medio de reacción una cantidad absoluta de 2 mg de glucosa producida en 60 minutos. Aplicando la siguiente fórmula se obtuvieron 172 FPU/mL, lo cual es un parámetro de la actividad hidrolítica de la enzima para dicho sustrato.

$$FPU/mL = \frac{0,37}{\text{concentración que produce 2mg de gucosa}}$$

$$FPU/mL = \frac{0,37}{0,00215}$$

$$FPU/mL = 172$$

En un ensayo realizado por Decker y cols., 2003 sobre actividad de celulasas reportaron actividades desde 14,1 FPU/mL y hasta 62,6 FPU/mL evaluado en diferentes fuentes de celulosa, lo que indica que la enzima con la que se trabajó presenta una actividad hidrolítica alta con respecto a las referencias consultadas y este parámetro permite tener una estimación de la conversión de celulosa a glucosa al utilizar este coctel enzimático.

Se determinó el contenido de proteína en cada una de las enzimas utilizando el método de Bradford para así adicionar el volumen referente al 1% de proteína con respecto al material seco, tal como lo proponen Wilkins y cols., 2005. En la tabla 7 se presenta la cantidad de proteína presente en la enzima.

Tabla 5. Proteína presente en las diferentes enzimas utilizadas.

Enzima	Proteína mg/mL
Pectinex Novozymes (Pectinasa)	24,0
NS-22192 Novozymes (Celulasa)	115,0

Así mismo, se llevó a cabo la reacción con DNS para cuantificar azúcares presentes en las enzimas y con ello evitar una sobreestimación en la producción de azúcares. A continuación, se presentan los valores obtenidos.

Tabla 6. Azúcares presentes en las diferentes enzimas utilizadas

Enzima	ART mg/mL	Glucosa mg/mL
Pectinex Novozymes (Pectinasa)	3,8	3,0
NS-22192 Novozymes (Celulasa)	6,1	5,0

Con respecto a la actividad del coctel pectinolítico ésta fue evidente, ya que el ácido galacturónico producido fue $11,6 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Se considera que el valor de actividad de pectinasa no es del todo representativo para este ensayo, ya que la pectina al ser un polímero complejo, su hidrólisis genera otros productos adicionales al ácido galacturónico y que no se tomaron en cuenta con el método utilizado (azúcares). Por esta razón se optó por trabajar con cargas de 1% de proteína referente a la materia seca utilizada, tal y como lo sugiere la literatura (Wilkins y cols., 2005).

Pretratamiento alcalino con reactor termo-mecano-químico

En la figura 15 y 16 se muestra el bagazo obtenido y se observa un obscurecimiento en la muestra conforme aumenta la concentración de NaOH y la temperatura del tratamiento. Posiblemente este fenómeno ocurra por diferentes situaciones. Uno de ellos se propone que es debido a la remoción de lignina en la matriz y a su vez, los componentes de naturaleza fenólica que la conforman, al someterlos a tratamiento térmico, éstos lograrán polimerizarse entre sí, formando subproductos oscuros. De esta manera se explicaría el aumento gradual en el obscurecimiento en función del NaOH y la temperatura para el caso del bagazo de toronja (figura 15), sin embargo, este comportamiento no se observa tan claro para el caso de bagazo de mandarina (figura 16). Es interesante destacar que ambos bagazos contienen muy poca lignina nativa (figuras 13 y 14).

Con base en esto, se propone que no necesariamente deba removerse por completo la lignina durante el pretratamiento para obtener la mayor concentración de azúcares totales, si no que tan solo debe deconstruirse a la matriz, de tal manera que el acceso para la acción enzimática subsecuente sea el suficiente para entrar en contacto con el sustrato.



De izquierda a derecha se muestran los bagazos pretratados a 50°C, 70°C y 90°C y de arriba abajo corresponde a la concentración de NaOH 1,25%, 2,5% y 3,75%.

Figura 15. Bagazo de toronja pretratado a diferentes concentraciones de NaOH y temperatura.



De izquierda a derecha se muestran los bagazos pretratados a 50°C, 70°C y 90°C y de arriba abajo corresponde a la concentración de NaOH 1,25%, 2,5% y 3,75%.

Figura 16. Bagazo de mandarina pretratado a diferentes concentraciones de NaOH y temperatura.

Otro posible factor involucrado en el oscurecimiento se deba a la oxidación del ácido ascórbico (vitamina C). Se sabe en general que los productos cítricos son una excelente fuente de esta vitamina. Para la toronja está reportado un contenido de 40 mg/100g y para mandarina 25 mg/100g (Ting, 1983).

Al someter previamente el material cítrico a un proceso de secado la concentración del ácido ascórbico disminuye considerablemente debido a que es una vitamina termolábil, sin embargo, algunos autores indican que este procesamiento ayuda al mismo tiempo a conservar el ácido ascórbico en los productos deshidratados por inactivación de la enzima ácido ascórbico oxidasa; esta proteína actúa en productos frescos que no han sido sujetos a tratamientos térmicos que la desnaturalicen y su acción provoca la transformación de la vitamina C en ácido deshidroascórbico mediante el consumo de $\frac{1}{2}$ O₂ (Badui, 2000). Durante el proceso de pretratamiento el ácido ascórbico es expuesto a temperaturas mayores a los 50°C, lo cual promueve su degradación, provocando un pardeamiento en el material.

Según Bornik y Kroh (2013) demostraron que matrices que contienen ácido galacturónico en su composición al someterlas a tratamiento térmico en pH de 3 a 6, existe formación de componentes de degradación tales como furano, que proporcionan una tonalidad marrón a la matriz una vez que se comienzan a producir dichos productos, hasta llegar a compuestos poliméricos, dando así una mayor intensidad de oscurecimiento, lo cual posiblemente también ocurra en el bagazo de toronja y mandarina.

Evaluación de la hidrólisis enzimática

En el caso del bagazo de toronja se obtuvo la mayor concentración de azúcares al utilizar celulasa y pectinasa (tabla 9 y figura 17; 1,25%NaOH + 90°C) produciendo por cada gramo de materia seca 423,7 mg de azúcares reductores totales (ART), así como 267,3 mg de glucosa/g MS. En comparación con el ensayo donde únicamente se utilizó pectinasa (bajo las mismas condiciones) se obtuvieron 389,2 mg ART/g MS y 252 mg glucosa/g MS (anexo, tabla 15 y figura 26).

Esto significa que después del pretratamiento y sacarificación enzimática se producen cantidades de glucosa muy cercanas a las teóricas esperadas por la hidrólisis completa de la celulosa (12% para la toronja, figura 14) $\times 1,11 = 133,2$ mg glucosa/g bagazo) + 140 mg de glucosa nativa/g bagazo = 273,2 mg glucosa/g bagazo.

Una apreciación que saltó a la vista fue que el ácido galácturónico esperado en los hidrolizados también resultó sensible al método DNS (mostrando un extremo reductor), lo cual produjo el cromóforo típico detectado en 540 nm. Esto fue corroborado mediante la elaboración de una curva patrón de ácido galacturónico, reactivo disponible en el laboratorio.

Tabla 7. Obtención de azúcares con celulasa y pectinasa en bagazo de toronja.

Celulasa + Pectinasa			
Temperatura	% m/m NaOH	Azúcares reductores** mg/g materia seca	Glucosa mg/g materia seca
50	1,25	389,2	203,1
50	2,75	384,2	124,2
50	3,75	270,3	138,3
70	1,25	359,2	191,2
70	2,75	337,7	216,4
70	3,75	292,3	190,9
90	1,25	423,7	267,3
90	2,75	321,8	191,1
90	3,75	368,7	242,1

**Azúcares reductores (ART) + ácido galacturónico.

Es importante destacar que el pretratamiento alcalino suave aplicado no tiene un efecto negativo sobre la degradación de la glucosa presente de manera nativa en

el bagazo de toronja, lo cual permite poner en perspectiva la factibilidad de este proceso de acondicionamiento para la obtención de azúcares y ser transformados en múltiples aplicaciones.

Puede apreciarse un efecto benéfico al combinar ambos cocteles enzimáticos sobre el sustrato acondicionado.

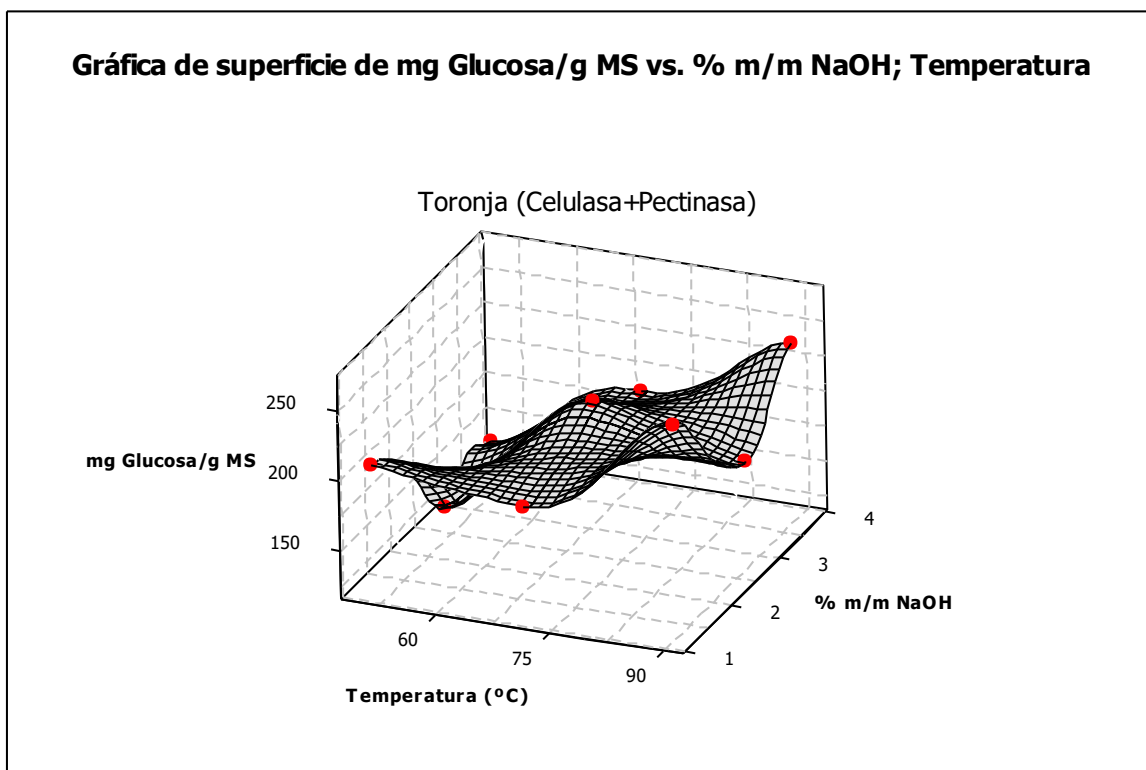


Figura 17. Glucosa obtenida a partir de bagazo de toronja utilizando celulosa y pectinasa.

Con respecto al bagazo de mandarina el mejor tratamiento (2,75%NaOH + 90°C) fue utilizando la mezcla enzimática de pectinasa y celulosa (tabla 10 y figura 18), obteniendo 753 mg/g MS de azúcares reductores, de los cuales 303,4 mg/g MS son glucosa. Esto fue expresado por gramo de materia seca, mientras que con el uso exclusivo de pectinasa a las mismas condiciones se obtuvieron valores de 745,59 mg ART/g MS con 244 mg glucosa/g MS (anexo, tabla 17 y figura 28) y con celulosa 505,20 mg ART/g MS de los cuales 220 mg/g MS corresponden a glucosa (anexo, tabla 18 y figura 29). Esto significa que después del

pretratamiento y sacarificación enzimática se producen cantidades de glucosa muy cercanas a las teóricas esperadas por la hidrólisis completa de la celulosa (15% para la mandarina, figura 13) $\times 1,11 = 166,5$ mg glucosa/g bagazo + 140 mg de glucosa nativa/g bagazo = 306 mg glucosa/g bagazo.

Tabla 8. Obtención de azúcares con celulasa y pectinasa en bagazo de mandarina.

Celulasa + Pectinasa			
Temperatura	% m/m NaOH	Azúcares** mg/g materia seca	Glucosa mg/g materia seca
50	1,25	702,5	198
50	2,75	966,5	231,6
50	3,75	996,9	222
70	1,25	841,3	238,8
70	2,75	929,3	242,4
70	3,75	668,7	174
90	1,25	689,5	237,6
90	2,75	753,3	303,4
90	3,75	942,8	231,6

**Azúcares reductores (ART) + ácido galacturónico.

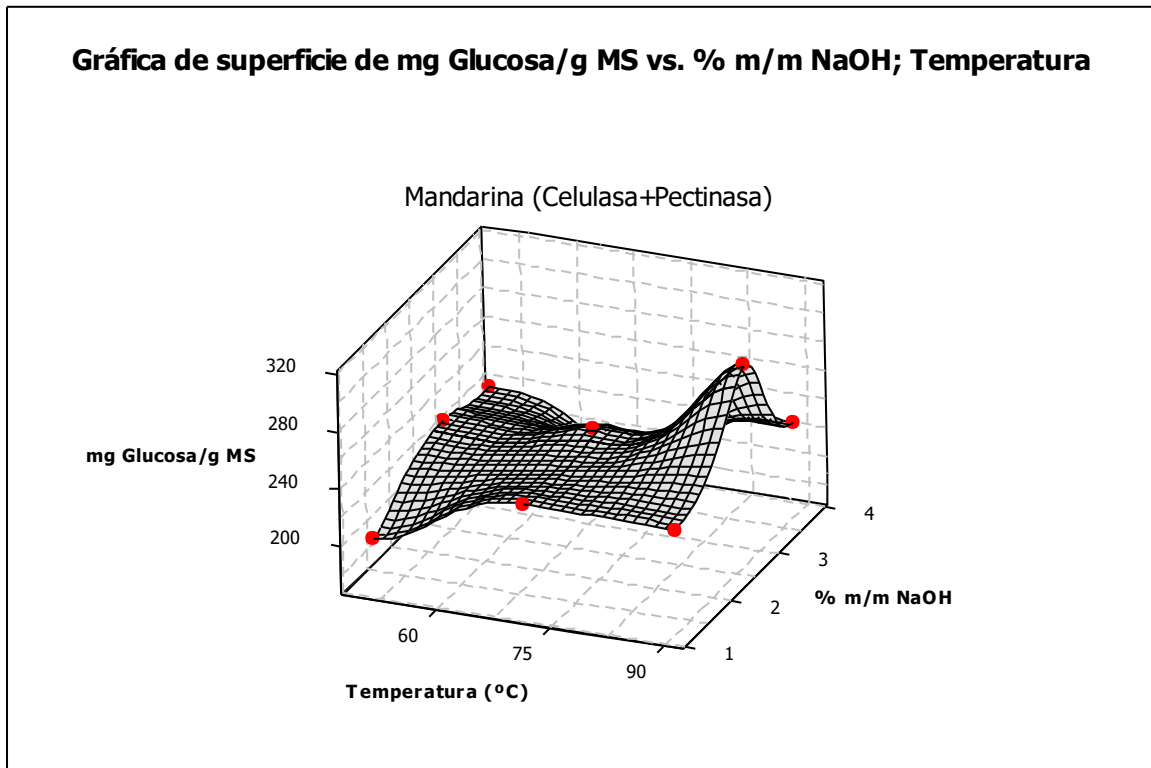


Figura 18. Glucosa obtenida a partir de bagazo de mandarina utilizando celulasa y pectinasa.

La mayor producción de azúcares con la mezcla enzimática se debe a que en los endocarpios existen dos polisacáridos, los cuales son una fuente importante de azúcares (celulosa y pectina) y al introducir dos grupos de enzimas específicas para cada uno de ellos (celulasas y pectinasas) se potencializa la producción de azúcares. Las pectinasas son un grupo de enzimas de diversos tipos encargadas de degradar a la pectina hasta sus compuestos monoméricos elementales, tales como arabinosa, galactosa, xilosa, ácido ferúlico, apiosa y fructosa, entre otros (de Vries y Visser, 2001; Jayani y cols., 2005).

Todo parece indicar que uno de los factores que afectan la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica es la asociación de las cadenas de celulosa con otros polímeros y estructuras protectoras que están presentes en la pared celular como la lignina, pectinas, hemicelulosa, proteínas, etc., los cuales al parecer han sido eliminados por el pretratamiento alcalino suave (Taherzadeh, 2007).

Efecto de la Temperatura en la producción de azúcares

En la figura 19 se muestra la producción de glucosa en función de la concentración de NaOH y la temperatura de un ensayo realizado por Li y colaboradores en 2004; y se observa en primera instancia que conforme se aumenta la temperatura en el pretratamiento, la producción de glucosa aumenta. Así mismo; en el presente trabajo la producción de azúcares se vio favorecida a una temperatura de 90°C en ambos bagazos y este fenómeno se puede explicar debido a que al alcanzar esta temperatura se rompen las interacciones moleculares en la lignina, lo que permite una mayor exposición de las fibras de celulosa y hemicelulosa, las cuales son la fuente potencial de azúcares. La temperatura del medio favorece la desestabilización de los enlaces covalentes que mantienen unidos a los monómeros de la lignina (Fu y cols., 2010). Asumir que la temperatura de hidrólisis es una variable importante en la producción de azúcares a partir de celulosa tiene validez, considerando que la degradación de los polímeros aumenta con el incremento de la temperatura y que la degradación térmica del polímero de celulosa se inicia a partir de 160°C (Tillman, 1981).

Se ha demostrado que la temperatura y el uso de álcali tienen una estrecha relación en la remoción de lignina. En 2007 Saha y Cotta fueron capaces de maximizar la sacarificación en residuos agroindustriales y trabajar a temperaturas cercanas a 30°C, sin embargo, fue necesario utilizar una concentración de NaOH de 8,6% m/m para remover cerca de 16,7% de lignina.

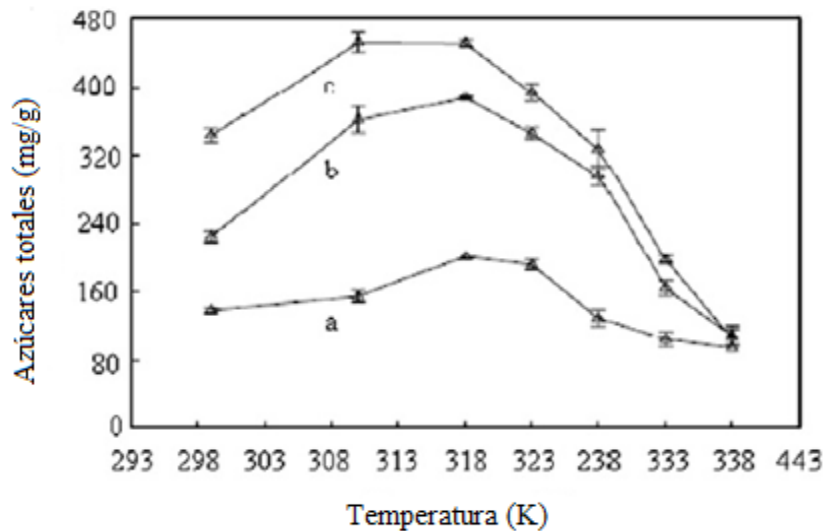


Figura 19. Efecto de la temperatura sobre la producción de azúcares en residuos agroindustriales (Li y cols., 2004)

Efecto de la concentración de álcali en la producción de azúcares

En este ensayo se identificó la concentración de NaOH que favoreció una mayor producción de azúcares, en el caso del bagazo de mandarina fue de 2,75% m/m de NaOH y para bagazo de toronja 1,25% m/m NaOH. En la figura 20 se observa la dependencia de la producción de glucosa en función de la concentración de NaOH, es decir, conforme aumenta la concentración de álcali en el pretratamiento la concentración de glucosa se incrementa (rastrojo de maíz). En este trabajo se alcanzaron 2 máximos: 2,75% de NaOH (mandarina) y 1,25% de NaOH (toronja).

Cabe resaltar que en la caracterización de los endocarpios se obtuvieron valores de 5% de lignina en mandarina y 2% para toronja. A partir de esto, se puede decir que el uso de disoluciones de álcali para remover lignina en biomasa depende directamente de la proporción en que esté presente y en este caso bastó con utilizar una concentración de NaOH al 1,25% m/m para modificar su estructura (2% de lignina) y NaOH al 2,75% m/m (5% de lignina), en bagazo de toronja y mandarina, respectivamente.

En un estudio realizado por Li y colaboradores en 2004 utilizando residuos de maíz pretratado con diferentes concentraciones de NaOH identificaron que la producción de glucosa aumentaba conforme se sometía a concentraciones de álcali más altas (figura 20). Cabe mencionar que dentro de este estudio la temperatura se mantuvo constante a 50°C.

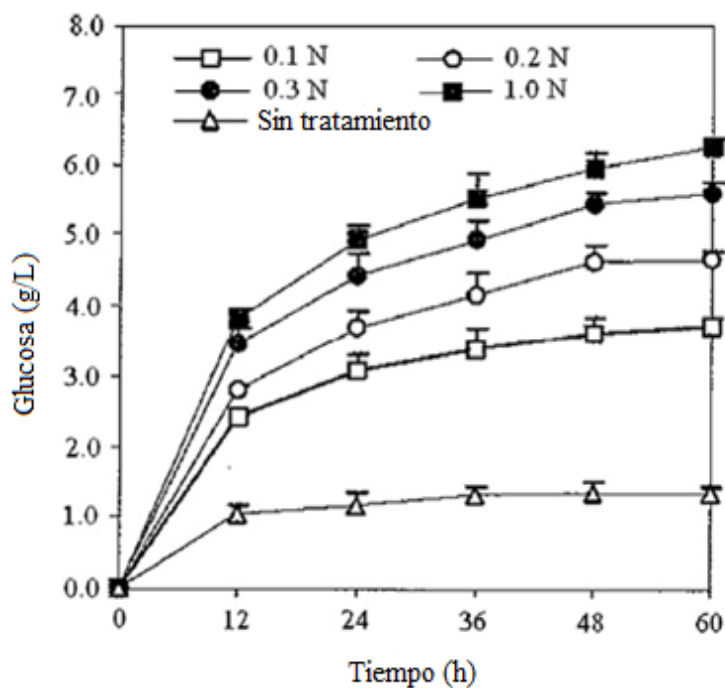


Figura 20. Efecto de la concentración de álcali sobre la producción de glucosa en residuos de maíz (Li y cols., 2004).

Dentro del ensayo con los diferentes bagazos, se observa que caracterizar inicialmente el contenido de lignina en la muestra puede ser un parámetro importante para proponer condiciones de pretratamiento. Así mismo, se debe considerar que los macro componentes de los cuales depende principalmente la producción de azúcares son los polímeros celulosa y hemicelulosa, sin embargo, es importante conocer la composición de la materia prima para maximizar su aprovechamiento, como en este caso la pectina presente en alta cantidad.

Prueba de escalamiento en sacarificación y producción de etanol con *S. cerevisiae*

En este ensayo se trabajó con el bagazo pretratado a las condiciones que favorecieron la máxima producción de azúcares, es decir, para mandarina 2,75% NaOH+ 90°C y para toronja 1,25% NaOH+ 90°C, en ambos casos se aplicó la mezcla de dos cocteles enzimáticos. De esta manera se validó el comportamiento

sobre la producción de azúcares durante la sacarificación de la celulosa y del consumo de éstos en el proceso de fermentación (figura 21 y 22).

La figura 21 corresponde a bagazo de mandarina y se observa que durante las primeras 144 horas (6 días) se produjo un máximo de ~86 mgART/mL, de los cuales ~32mg/mL corresponden a glucosa. La glucosa proviene de 16,7 mg/mL de celulosa + 14 mg/mL de glucosa adherida al bagazo = 30,7 mg/mL. A partir de ello, se estimaría una producción de etanol de ~15.4 a 16,0 mg/mL (considerando una conversión de glucosa del 100%). En este caso se obtuvo un máximo de etanol de ~22 mg/mL (figura 21). Como se recordará, se encuentran presentes otros hidratos de carbono adheridos al bagazo, tales como fructosa y sacarosa y galactosa (Grohmannet y cols., 1994; Machado y cols., 2010), los cuales cuantifican de manera adicional 8 mg/mL (~4 mgEtOH/mL), que fueron metabolizados a etanol, de acuerdo con el balance en la figura 13.

El contenido de glucosa proporcionado por la mezcla enzimática se encuentra cerca de 0,1 mg/mL, de tal manera que no impacta significativamente en la producción de etanol.

Puede apreciarse en la figura 21 que los azúcares reductores totales no son consumidos en su totalidad, esto es debido a la presencia del ácido galacturónico remanente que no puede ser metabolizado por *Saccharomyces cerevisiae*. Como se comentó previamente este compuesto resultó sensible al método analítico DNS, cuyo valor esperado según la figura 13 sería ~38 mg/mL, un valor similar a los azúcares remanentes observados en la figura 21.

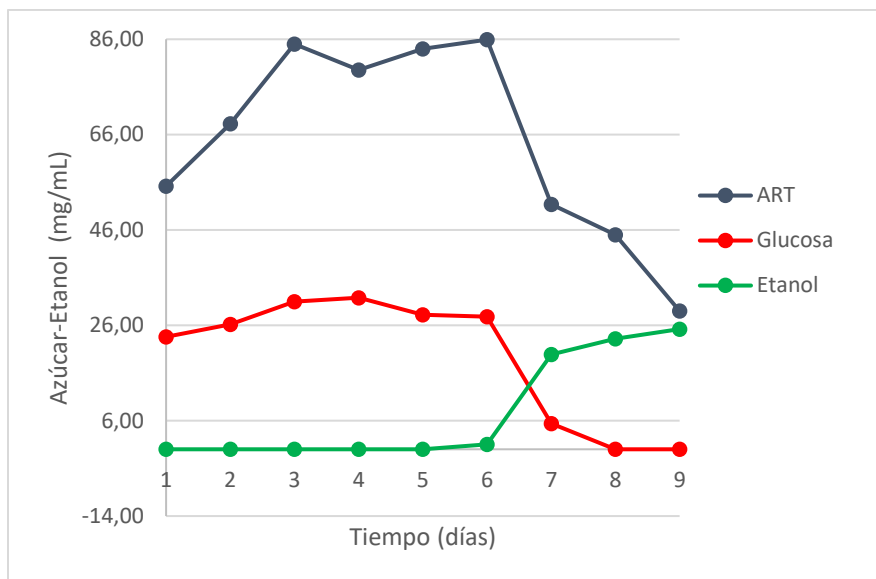


Figura 21. Producción y consumo de azúcares durante la hidrólisis enzimática y fermentación en bagazo de mandarina.

En la figura 22 se observa el comportamiento obtenido en la producción y consumo de azúcares para bagazo de toronja, alcanzando valores cercanos a los de mandarina, con un máximo de ~86 mg ART/mL y ~28 mg glucosa/mL que corresponden al día cuatro. La glucosa teórica proviene de 13,3 mg/mL de celulosa + 14 mg/mL de glucosa adherida al bagazo = 27,3 mg/mL. Posterior a este tiempo se observa que la glucosa es metabolizada por completo por la levadura al día 8 y corresponde al valor máximo obtenido de etanol, es decir, cerca de ~20 mg/mL (figura 22). El valor teórico esperado de etanol a partir de glucosa es ~14 mg/mL, sin embargo, se produce un adicional que proviene de la fermentación de los azúcares adheridos al bagazo nativo (fructosa, sacarosa), que de acuerdo con la figura 14 son ~9 mg/mL (~4,5 mL EtOH/mL).

Puede apreciarse en la figura 22 al ácido galacturónico remanente que no puede ser metabolizado por *Saccharomyces cerevisiae*, cuyo valor esperado según la figura 15 sería ~36 mg/mL, un valor similar a los azúcares remanentes observados en la figura 22.

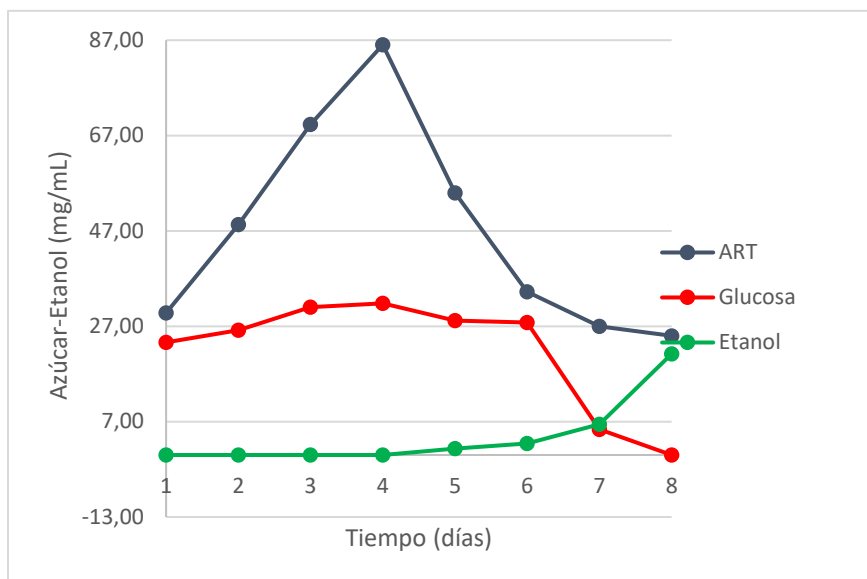


Figura 22. Producción y consumo de azúcares durante la hidrólisis enzimática y fermentación en bagazo de toronja

Cabe resaltar la importancia de cuidar la fase de pretratamiento para no degradar los azúcares adheridos en el bagazo de forma nativa y de esta manera generarse inhibidores de la fermentación, de ser así, la levadura se encontraría en estrés metabólico y no se observarían los valores de producción de etanol encontrados.

En una investigación realizada por Zhao y colaboradores en 2009 estudiaron la sacarificación y fermentación simultánea en materiales lignocelulósicos (figura 23), los autores reportaron una cepa de *S. cerevisiae* modificada genéticamente para metabolizar algunas pentosas, las cuales son producto de la sacarificación y de esta manera aumentar los rendimientos en la obtención de etanol. El microorganismo más utilizado para la producción de etanol en procesos industriales es *S. cerevisiae*, que ha demostrado ser muy robusto y bien adaptado a la fermentación de hidrolizados lignocelulósicos. *S. cerevisiae* puede fermentar fácilmente hexosas, pero difícilmente xilosa en hidrolizados de lignocelulosa, porque *S. cerevisiae* carece de enzimas que convierten la xilosa en xilulosa, para ello es necesario la ingeniería metabólica (Galbe, 2002).

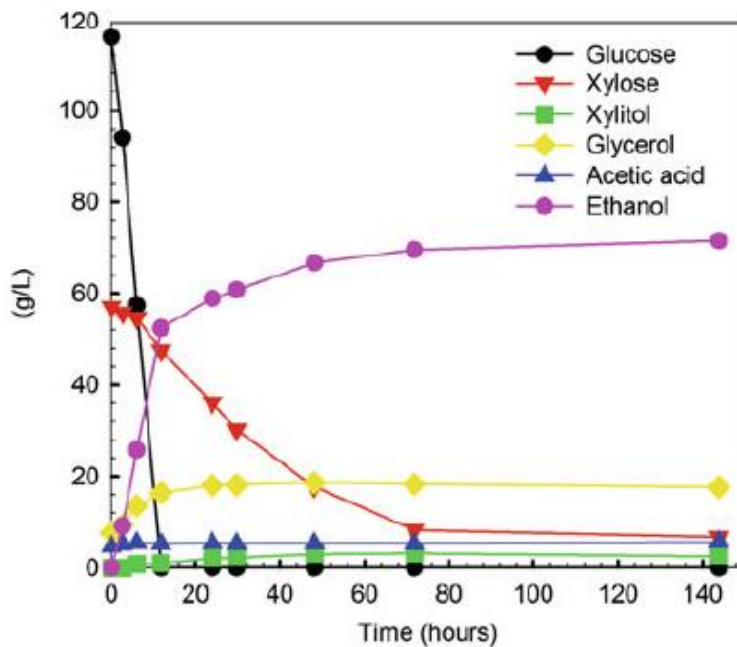


Figura 23. Productos obtenidos durante la sacarificación de residuos lignocelulósicos (Zhao y cols., 2009).

En la figura 23 se muestran diversos productos que se pueden obtener a partir de materiales lignocelulósicos y con esto obtener un beneficio, por ejemplo, la obtención de un jarabe rico en azúcares podría utilizarse en la elaboración de confites, endulzantes para bebidas e incluso como medio de cultivo para la producción de vinagre.

Fermentación de bagazo utilizando líquido ruminal

Previamente en el grupo de investigación se llevó a cabo la fermentación anaeróbica de residuos pretratados de lirio acuático usando líquido ruminal. Este material lignocelulósico contiene carbohidratos como la hemicelulosa (~33%) y celulosa (19%) presente en una menor proporción. La temperatura de pretratamiento 80°C y NaOH al 3,75% m/m generó un material en que se obtuvo el mejor resultado de digestibilidad: ~77,6% (con respecto a la materia seca), por lo

que se obtuvo una mejoría del 18,4% en comparación con la digestión del lirio sin pretratamiento (Rubio, 2015).

Para este trabajo se tomó la experiencia previa y se colocó una muestra control, es decir, aquella en que no se sometió a pretratamiento e hidrólisis enzimática al endocarpio de toronja disponible en ese momento del año (tabla 11 y figura 24) con la finalidad de evaluar el potencial del bagazo para la obtención de metano a partir de azúcares producidos de este mismo, utilizando diferentes microorganismos, los cuales tienen un metabolismo anaeróbico estricto.

Se observa que el grado de conversión de sustrato es proporcional al volumen inoculado de líquido ruminal, resultando en una conversión de azúcares reductores totales adheridos del 79,2% y para la glucosa un valor superior al 84,1%. Al final se apreció una cantidad considerable de fibras en el fondo del matraz quedando sin transformarse. La concentración proteica inicial del líquido ruminal fue 1,6 mg/mL. Los matraces fueron cargados con 40 mL de disolución amortiguadora de citrato 100 mM y 4 gramos de bagazo crudo (10% consistencia).

Tabla 9. Fermentación de bagazo de toronja. Muestra control.

Muestra sin pretratar y sacarificar							
Identificación	Líquido ruminal adicionado (mL)	mg ART (inicial)**	mg ART (final)	% Conversión ART	mg Glucosa (inicial)	mg Glucosa (final)	% Conversión Glucosa
1C (24 h)	1,25	804,0	446,0	44,5	360,0	267,3	25,8
2C (48 h)	2,5	804,0	385,9	52,0	360,0	240,8	33,1
3C (72 h)	3,75	804,0	332,7	58,6	360,0	187,3	48,0
4C (96h)	5	804,0	247,4	69,2	360,0	144,0	60,0
5C (120 h)	6,25	804,0	176,5	78,0	360,0	57,4	84,1
5C (144 h)	6,25	804,0	166,9	79,2	360,0	No detectable	>84,1

**Azúcares reductores (ART) + ácido galacturónico.

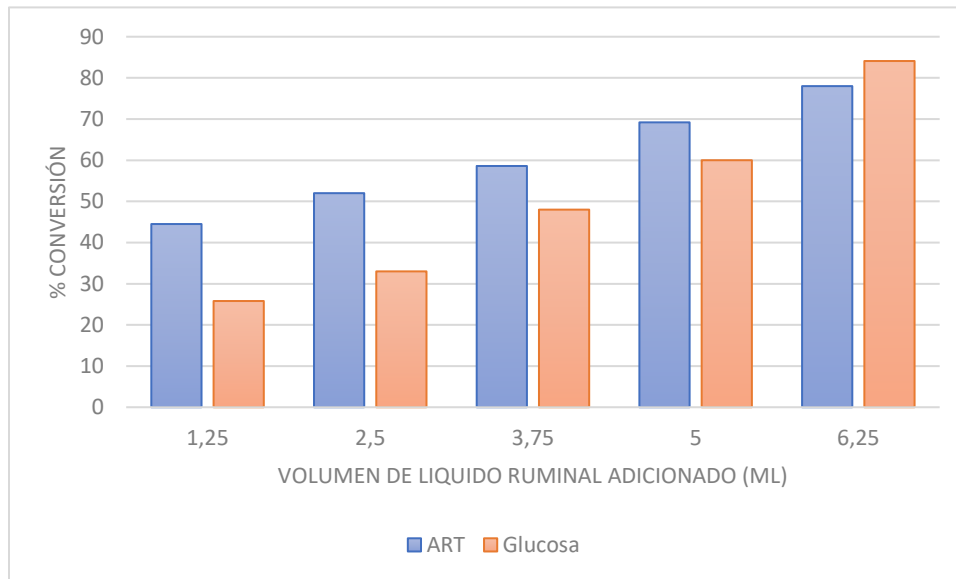


Figura 24. Conversión de sustrato en bagazo de toronja. Muestra control.

Como ya fue mostrado previamente, la concentración de azúcares reductores totales adheridos al bagazo de toronja crudo es significativa, su conversión durante la fermentación fue del 79,2%. Por su parte, la glucosa presentó una conversión superior al 84,1%, quedando en el medio una concentración menor de 1 mg/mL no detectable por el kit de medición. La concentración final de azúcares parece indicar que no fueron obtenidos azúcares reductores adicionales o ácido galacturónico por el proceso de transformación del residuo lignocelulósico.

Por otro lado, la muestra pretratada e hidrolizada contiene una mayor concentración inicial de azúcares, glucosa y ácido galacturónico (AG) con respecto a los experimentos de control sin pretratamiento y sacarificación, pero la conversión de éstos durante la fermentación fue baja, ya que solo se obtuvo 38,9% de transformación para los azúcares reductores totales y AG, además 47,0% para glucosa (tabla 12 y figura 25). Es posible que se esté presentando un proceso de aclimatación de los microorganismos, ya que su fuente de carbono natural en el interior del estómago del rumiante es el rastrojo de maíz. También es posible que tenga lugar un proceso de represión catabólica, al existir

concentraciones elevadas de glucosa y ácido galacturónico en los hidrolizados. Por estas razones, se decidió diluir el hidrolizado de toronja con agua destilada, en una proporción 1:1, 1:5 y 1:10, como lo sugieren trabajos previos de fermentación anaeróbica de residuos provenientes de la industria alimentaria, con el propósito de generar una mezcla rica en metano y CO₂ (Méndez y cols., 2009).

Tabla 10. Fermentación de bagazo de toronja. Muestra pretratada.

Muestra extrudada y sacarificada							
Identificación	Líquido ruminal adicionado (mL)	mg ART (inicial)**	mg ART (final)	% Conversión ART	mg Glucosa (inicial)	mg Glucosa (final)	% Conversión Glucosa
1E (1:4)	1,25	2648,6	2619,5	1,1	1090	937,4	14
2E (1:4)	2,5	2648,6	2548,0	3,8	1090	893,8	18
3E (1:4)	3,75	2648,6	2450,0	7,5	1090	831,7	23,7
4E (1:4)	5,0	2648,6	2383,4	10,0	1090	792,0	27,34
5E (1:4)	6,25	2648,6	2259,9	14,7	1090	770,2	29,34
5E 144 Hrs	6,25	2648,6	1618,8	38,9	1090	577,6	47,01

**Azúcares reductores (ART) + ácido galacturónico.

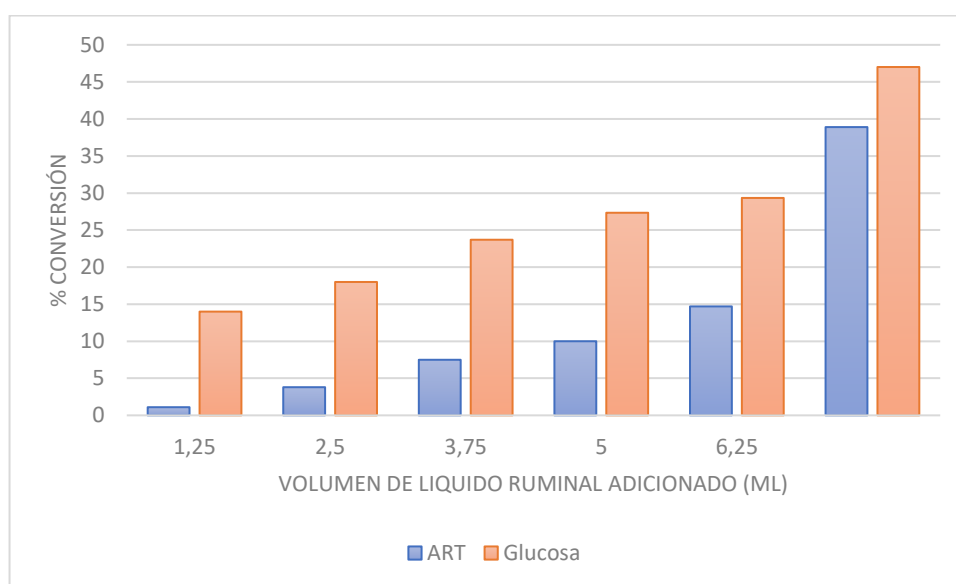


Figura 25. Conversión de sustrato en bagazo de toronja. Muestra pretratada.

El bajo aprovechamiento observado para los sustratos parece tener relación con una baja carga microbiana inoculada a cada matraz (1,9, 3,9, 5.9, 7,9 y 9,8 mg de proteína) conteniendo 40 mL de hidrolizado enzimático (concentración de azúcares reductores + AG de 66,2 g/L) con 10% de carga de sólidos. Por ejemplo, Oliva y cols., 2017 han reportado la adición de microorganismos en concentración de 1 g/L a hidrolizados de paja de cebada con una concentración inicial de glucosa de 50 g/L.

Para promover la adición de un volumen menor de inóculo ruminal (acceso limitado) al hidrolizado enzimático, se optó por diluir la muestra de hidrolizado enzimático en proporción 1:1, 1:5 y 1:10; con la finalidad de observar si la población microbiana presente en el líquido ruminal es capaz de metabolizar por completo los azúcares reductores + AG disponibles en las muestras diluidas. En la tabla 13 se presentan los resultados de la fermentación llevada a cabo durante un periodo de tres días. La conversión de glucosa es completa para los hidrolizados con dilución 1:5 y 1:10. En cuanto a los azúcares reductores totales + AG fue 47,3 y 77,0% respectivamente. Para la dilución del hidrolizado en proporción 1:1, la conversión de glucosa y ART + AG sigue manteniéndose baja.

Tabla 11. Fermentación con líquido ruminal a muestra pretratada y sacarificada diluida diez veces.

Muestra extrudada y sacarificada					
Identificación	Líquido ruminal adicionado (mL)	mg ART (inicial)**	mg ART (final)	% Conversión ART	% Conversión Glucosa
Dil 1:10	6,25	264,9	61,0	77,0	100
Dil 1:5	6,25	529,7	279,3	47,3	100
Dil 1:1	6,25	1324,3	688,0	48,0	63,6

***Azúcares reductores (ART) + ácido galacturónico.*

Tabla 12. Producción de biomasa a las 144 horas utilizando líquido ruminal

Identificación	Líquido ruminal adicionado (mL)	mg Proteína (inicial)	mg Proteína (final)
Dil 1:10	6,25	9,8	12,0
5E	6,25	9,8	85,6
5C	6,25	9,8	46,7

En la tabla 14 puede apreciarse que para los experimentos 5E (hidrolizado enzimático) y 5C (bagazo de control), la producción de biomasa aumentó de manera considerable, principalmente para la muestra de hidrolizado enzimático; en este sentido, para la muestra con dilución 1:10 (hidrolizado enzimático), la cantidad de biomasa generada fue menor. En todos los experimentos llevados a cabo en esta etapa se observó la presencia de aumento en el volumen de los globos colocados en la parte superior de los matraces.

En 2006 la FAO publicó un artículo referente a las emisiones producidas por el ganado, e identificó que el metano representa cerca del 54% de los gases de efecto invernadero, mientras que los rumiantes producen aproximadamente 6% de este gas, lo cual está relacionado directamente con su alimentación. En este trabajo se presenta una alternativa de aprovechamiento de residuos utilizando las características del metabolismo llevado a cabo en rumiantes para obtención de metano, el cual puede ser aislado y aprovechado como combustible.

CONCLUSIONES

La extrusión alcalina suave y sacarificación enzimática de pulpas o endocarpios de mandarina y toronja favoreció la producción de glucosa y ácido galacturónico en comparación con las muestras de bagazo crudo, sin ser afectados por el proceso de pretratamiento los azúcares nativos adheridos. Las hexosas fueron fermentadas fácilmente por *Sacharomyces cerevisiae* para la producción de etanol.

Las condiciones más favorables para el procesamiento de ambos residuos resultaron ser 90°C, en combinación con NaOH de 2,75% para bagazo de mandarina y 1,25% para bagazo de toronja. Para ello se utilizó una mezcla enzimática de pectinasa (3XL) y celulasa (NS-22192) implementando una carga de 10% de sólidos durante la sacarificación. Bajo estas condiciones se obtuvieron 753 mg de ART/g extrudado, de los cuales 303 mg/g extrudado corresponden a glucosa para mandarina. Para toronja se obtuvieron 423 mg de ART/g extrudado y 267 mg/g de extrudado para glucosa.

Los productos obtenidos de la sacarificación enzimática pueden servir como sustrato para la propagación de biomasa de microorganismos anaerobios presentes en el líquido ruminal y posteriormente ser utilizados como inóculo para la generación de gas metano en volúmenes de hidrolizados más grandes. Se metabolizó cerca del 47% de la glucosa en el hidrolizado y al diluirlo en cinco y diez veces se metaboliza por completo la glucosa.

El aprovechamiento de este tipo de residuos agroindustriales evitaría la producción de contaminantes del aire, suelo y mantos acuíferos, además de promover la innovación en ciencia y tecnología con los principios de la química verde y crear consciencia ambiental sobre el manejo de los residuos.

PERSPECTIVAS

El presente trabajo surgió como una propuesta para dar solución a la acumulación de desechos agroindustriales provenientes de industrias procesadoras de jugos cítricos. A través de los experimentos realizados se estudiaron factores como temperatura y concentración de NaOH en el pretratamiento para generar azúcares reductores adicionales a los ya presentes de manera natural en ambos bagazos.

Así mismo se trabajó con la cepa *S. cerevisiae* para la producción de etanol y con la microflora proveniente de rumiantes; sin embargo, lo prolongado que resultó el trabajo no permitió la identificación los microorganismos presentes. Se recomienda hacer una identificación detallada de los microorganismos presentes en los hidrolizados, para comprender el metabolismo de las pentosas y del ácido galacturónico, puesto que este último es uno de los productos mayoritarios de la sacarificación enzimática y la cuantificación de metano para la mezcla gaseosa proveniente de la fermentación metanogénica.

En este proyecto se utilizó líquido ruminal proveniente de ganado cuya alimentación estuvo basada en rastrojo de maíz; sin embargo, sería conveniente trabajar con líquido de rumiantes cuya dieta sea rica en residuos semejantes a los presentados en dicho trabajo, es decir, bagazo de cítricos o frutas, lo que significa que posiblemente la microflora se encuentre muy familiarizada con este tipo de sustratos y se encuentre mayormente adaptada.

ANEXO

Tabla 13. Obtención de azúcares con pectinasa en bagazo de toronja.

Pectinasa			
Temperatura	% m/m NaOH	mg Azúcares reductores**/g materia seca	mg Glucosa/g materia seca
50	1,25	304,80	128
50	2,75	312,79	272
50	3,75	282,32	204
70	1,25	448,65	176
70	2,75	337,26	188
70	3,75	272,83	156
90	1,25	389,21	252
90	2,75	344,01	156
90	3,75	316,28	184

**Azúcares reductores (ART) + ácido galacturónico.

Figura 26. Glucosa obtenida a partir de bagazo de toronja utilizando pectinasa

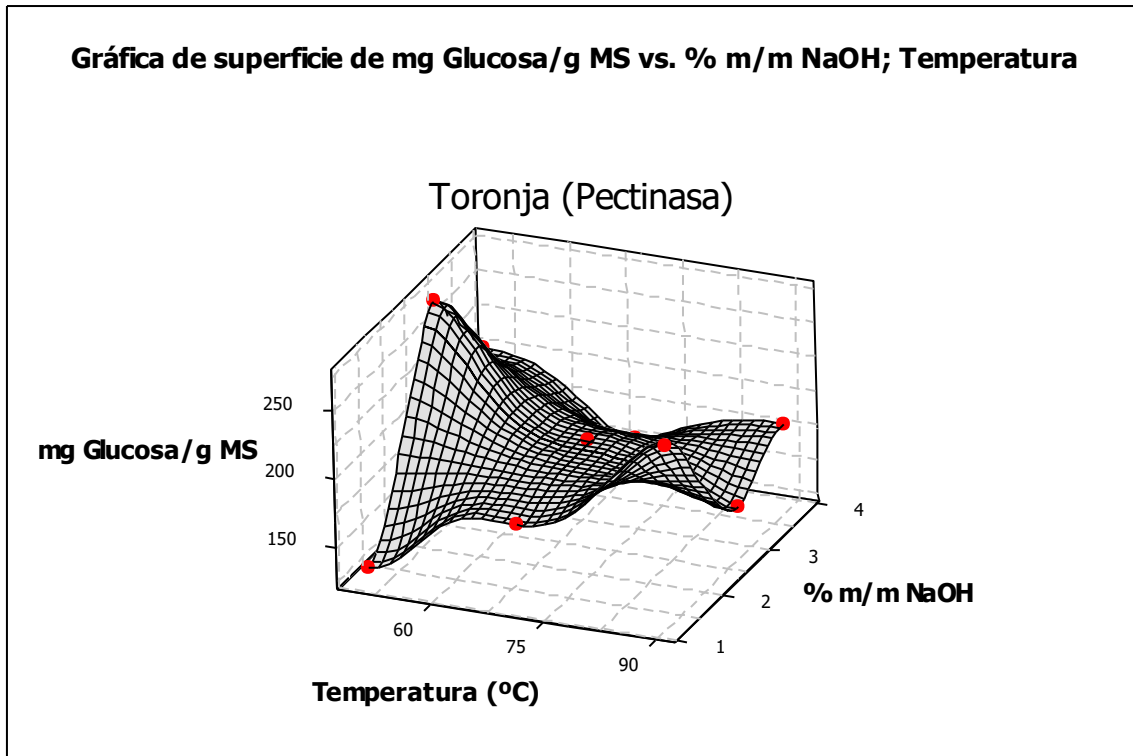


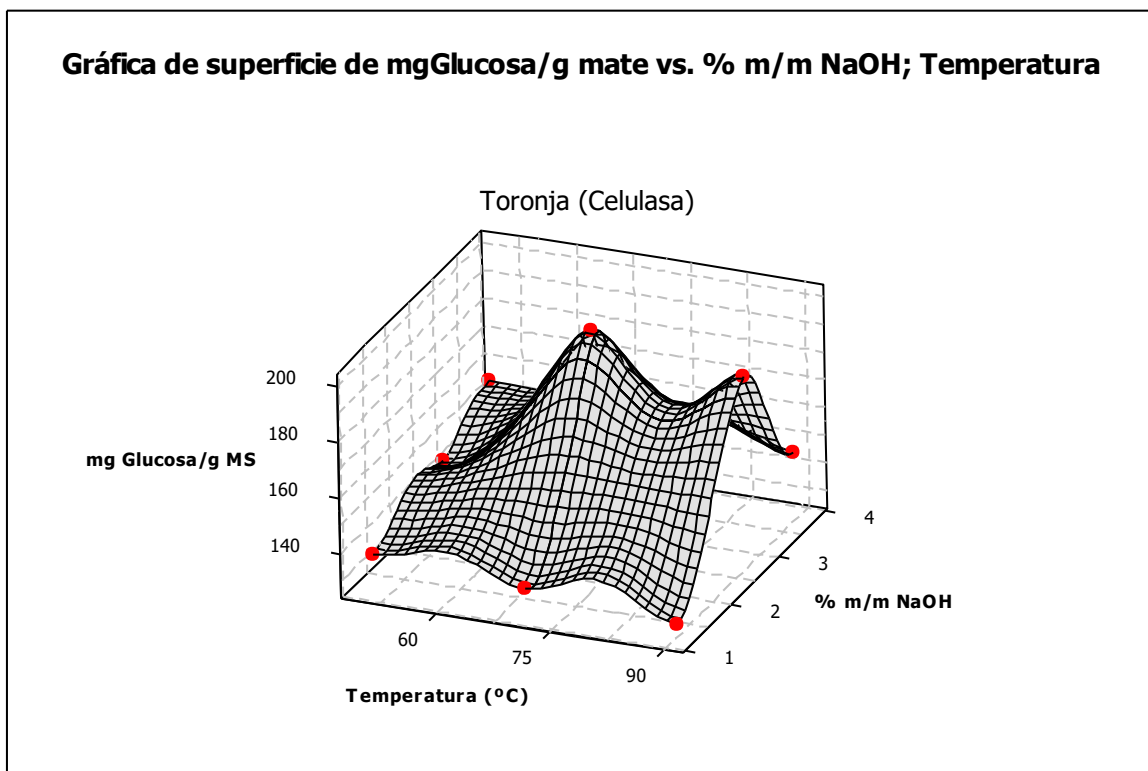
Tabla 14. Obtención de azúcares con celulasa en bagazo de toronja.

Celulasa			
Temperatura	% m/m NaOH	mg Azúcares reductores**/g materia seca	mg Glucosa/g materia seca
50	1,25	212,39	136
50	2,75	360,74	144
50	3,75	360,74	156
70	1,25	269,83	132
70	2,75	239,86	200

70	3,75	143,96	148
90	1,25	180,42	128
90	2,75	202,90	192
90	3,75	208,39	148

**Azúcares reductores (ART) + ácido galacturónico.

Figura 27. Glucosa obtenida a partir de bagazo de toronja utilizando celulasa.



MANDARINA

Tabla 15. Obtención de azúcares con pectinasa en bagazo de mandarina.

Pectinasa			
Temperatura	% m/m NaOH	mg Azúcares reductores**/g materia seca	mg Glucosa/g materia seca
50	1,25	543,20	196
50	2,75	654,19	232
50	3,75	882,70	270
70	1,25	745,59	241
70	2,75	763,00	256
70	3,75	634,60	238
90	1,25	854,41	269
90	2,75	745,59	244
90	3,75	739,06	236

**Azúcares reductores (ART) + ácido galacturónico.

Figura 28. Glucosa obtenida a partir de bagazo de mandarina utilizando pectinasa

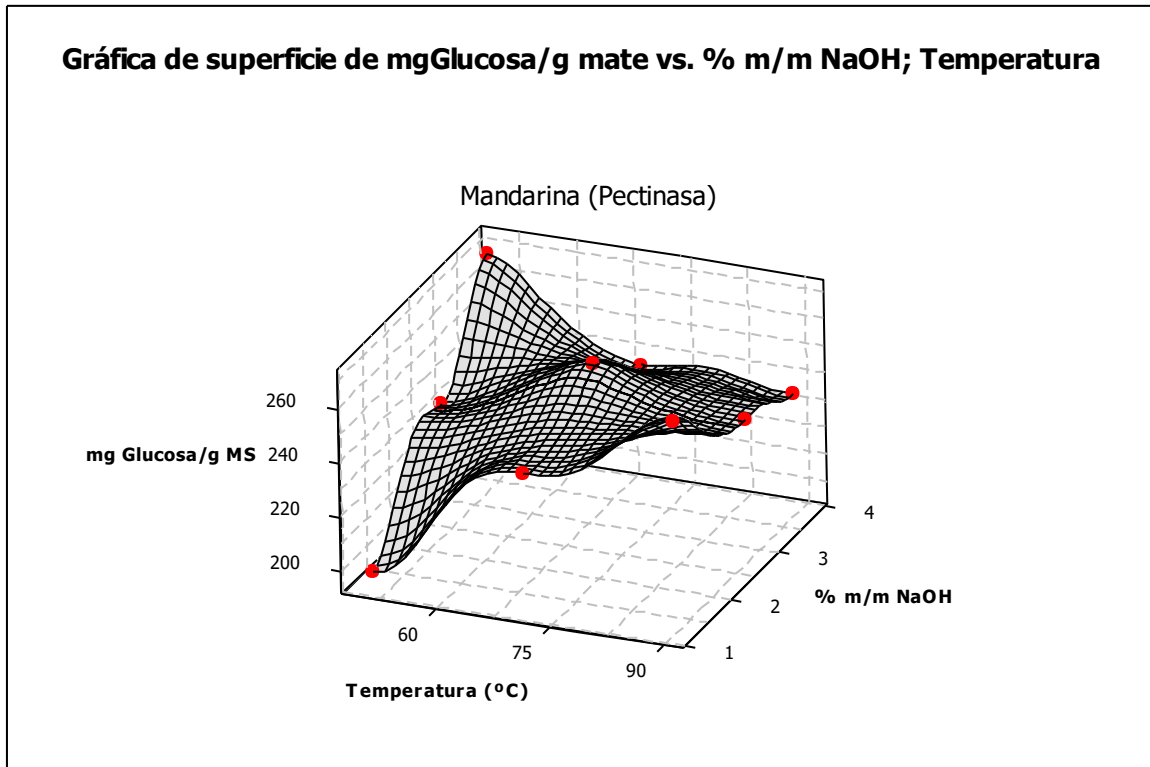


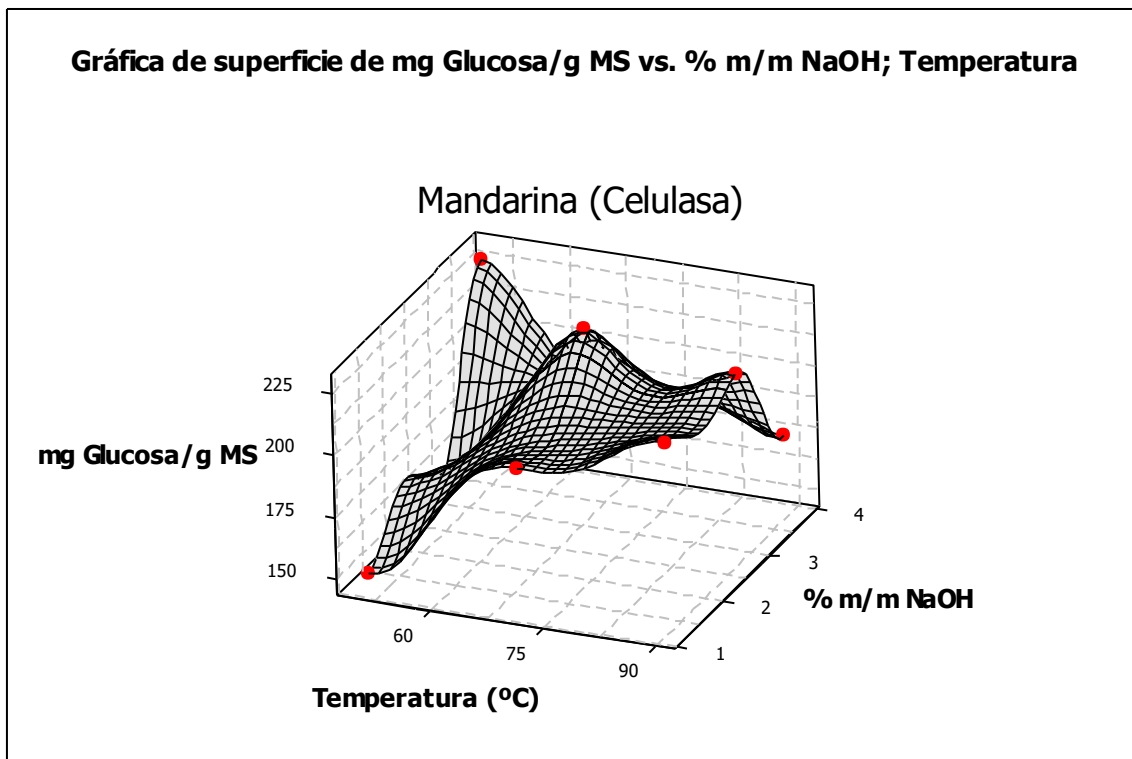
Tabla 16. Obtención de azúcares con celulasa en bagazo de mandarina.

Celulasa			
Temperatura	% m/m NaOH	mg Azucares reductores**/g materia seca	mg Glucosa/g materia seca
50	1,25	408,27	148
50	2,75	443,09	152
50	3,75	443,09	228
70	1,25	451,80	200
70	2,75	538,85	228
70	3,75	484,44	168

90	1,25	536,67	220
90	2,75	506,20	220
90	3,75	467,03	176

**Azúcares reductores (ART) + ácido galacturónico.

Figura 29. Glucosa obtenida a partir de bagazo de mandarina utilizando celulasa.



REFERENCIAS

- Ahmed SA, Mostafa FA. 2013. Utilization of orange bagasse and molokhia stalk for production of pectinase enzyme. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. Vol. 30, 449-456.
- Akhtar MS, Saleem M, Akhtar MW. 2001. Saccharification of lignocellulosic materials by the cellulases of *Bacillus subtilis*. *Int J Agr Biol*, 3:199–202.
- Álvarez, C., 2009. Biocombustibles: desarrollo histórico- tecnológico, mercados actuales y comercio internacional. *Economía Informa*, Vol. 359, 63-89.
- Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Negro MJ. 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource Technology*, 101:4851-61.
- Anastas, P. T.; Warner, J. C. 1998. *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, p.30.
- Badui DS. 2006. *Química de los alimentos*. Pearson educación. México.
- Balat M, Balat H, Oz C. 2008. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34:551-73.
- Banerjee S, Sen R, Pandey RA, Chakrabarti T, Satpute D, Giri BS. 2009. Evaluation of wet air oxidation as a pretreatment strategy for bioethanol production from rice husk and process optimization. *Biomass and Bioenergy*, 33:1680-6.
- Beall DS, Ohta K, Ingram LO. 1991. Parametric studies of ethanol production from xylose and other sugars by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 38, 296-303.
- Ben-Shalom N. 1986. Hindrance of hemicellulose and cellulose hydrolysis by pectic substances. *J. Food Sci.* 51, 720–721,730.
- BNDES (Banco Nacional de Desenvolvimento Económico y Social) (2008) *Bioetanol de caña de azúcar: energía para el desarrollo sostenible*, 320 p.
- Bornik M., Kroh L. D-Galacturonic acid as a highly reactive compound in nonenzymatic browning. Formation of browning active degradation products. *Journal of agricultural and food chemistry*. Vol. 61,3494-3500.
- Cardona CA, Quintero JA, Paz IC. 2009. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. *Bioresource Technology*, 101(13).
- Carreón R, Sabido R, Centeno L, Leal R, Martínez J, Fernández S. 2009. Etanol carburante. *Biocombustibles* 13(3), 79-102.
- Castro A. 2017. Extracción del material péctico presente en residuos agroindustriales cítricos mediante un reactor termo-mecano-químico. Tesis, Facultad de Química.
- Ciriminna R, Chavarría-Hernández N, Pagliaro M. 2015. Pectin: A new perspective from the biorefinery standpoint. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. Vol 9, 368-377.
- Cheftel JC. 1980. *Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos*, vol. 1. Zaragoza. Acribia.

- Converati A, Perego P, Lodi A, Parisi F, Del Borghi MA. 1985. Kinetic Study of *Saccharomyces* Strains: Performance at High Sugar Concentrations. *Biotechnology and Bioengineering*, 27, 1108 - 1114.
- Corredor DY. 2009. Evaluation and Characterization of Forage Sorghum as Feedstock for Fermentable sugar production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 158 (1), 174-179.
- Cuervo L, Folch J, Quiroz R. 2009. Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *Biotecnología*. Vol. 13(3), 11-25.
- Cunningham JG. 2007. *Textbook of veterinary physiology*. 4th Ed. Philadelphia, PA: Saunders.
- Da Silva ASA, Inoue H, Endo T, Yano S, Bon EPS. 2010. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Bioresource Technology*, Vol. 101, 7402-7409.
- Durán Q, Arroyo F, García A, Garrido F. 2005. Evolución del crecimiento en salmuera, a bajas temperaturas y diferentes acidulantes, de levaduras aisladas de aceitunas de mesa. *Grasas y aceites*. Vol. 56, 9-15.
- Demirbas A. 2005. Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. *Energy Sources*. Vol. 27, 327-333.
- de Vries RP, Visser J. 2001. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* Vol. 65 (4), 497-552.
- Echeverria E, Burns JK, Wicker L. 1988. Effect of cell wall hydrolysis on brix in citrus fruit. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* Vol. 101, 150-154.
- Eigner WD, Huber A, Schurz J. 1985. The Reaction System Cellulose-Cellulase. *Cellulose Chemical Technology*. Vol. 19, 579-589.
- Fajardo, A. 2016. Derivatización de residuos lignocelulósicos para la obtención de nuevos materiales del tipo éster a base de anhídridos, sustentados a la producción de alcoholes. Tesis, Facultad de Química.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2006. *Livestock's Long Shadow: Environmental Issues and Options*. Rome, Italy.
- Ferreira S, Durate AP, Ribeiro MHL, Queiroz JA, Domingues FC. 2009. Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of *Cistus ladanifer* and *Cytisus striatus* for bioethanol production. *Biochemical Engineering Journal*. Vol. 45, 192-200.
- Galbe M, Zacchi, G. 2007. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* Vol. 108, 41-65.
- Galbe M, Zacchi G. 2002. A review of the production of ethanol from softwood. *Appl Microbiol Biotechnol.* Vol. 59, 618-628.
- Garcia-Peña I, Parameswaran P, Kang DW, Canul-Chan M, Krajmalnik-Brown R. 2011. Anaerobic digestion and co-digestion processes of vegetable and fruit residues, process and microbial ecology. *Bioresource Technology*.
- Grohmann K, Baldwin EA, 1992. Hydrolysis of orange peel with pectinase and cellulase enzymes. *Biotechnol. Lett.* Vol. 14, 1169-1174.

- Grohmann K, Baldwin EA, Buslig BS, Ingram LO. 1994. Fermentation of galacturonic acid and other sugars in orange peel hydrolysates by the ethanol genic strain of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* Vol. 16, 281-286.
- Grohmann K, Baldwin EA, Buslig BS, 1994. Production of ethanol from enzymatically hydrolyzed orange peel by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* Vol 45/46, 315-327.
- Grohmann K, Cameron RG, Buslig BS, 1995. Fermentation of sugars in orange peel hydrolysates to ethanol by recombinant *Escherichia coli* K011. *Appl. Biochem. Biotechnol.* Vol. 51/52, 423-435.
- Hamelinck CN, Hooijdonk GV, Faaij APC. 2005. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy.* Vol. 28, 384-410.
- Hernández-Meléndez O, Bárzana E, Arriaga S, Hernández-Luna M, Revah S. 2008. Fungal removal of gaseous hexane in biofilters packed with poly(ethylene carbonate) pine sawdust or peat composites. *Biotechnology and Bioengineering.* Vol. 100, 864-871.
- Igartuburu JM, Pando E, Rodríguez F. 1997. Métodos de análisis de fibra dietética en alimentos. *Información tecnológica.* Vol. 8 No.1. 41-49.
- James CS. 1999. *Analytical Chemistry of Foods.* Second Edition, ASPEN Publishers. New York.
- Jayani RS, Saxena SY, Gupta R. 2005. Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Proc. Biochem.* Vol. 40, 2931-2944.
- Kirk RS, Sawyer R y Egan H. 1996. *Composición y Análisis de Alimentos de Pearson.* Segunda edición. Editorial CECSA. México.
- Klinke HB, Thomsen AB, Ahring BK. 2004. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 66, 10-26.
- Lee D, Owens VN, Boe A, Jeranyama P. 2007 *Composition of herbaceous biomass feedstocks.* South Dakota State University Publication, SGINC1-07, Brookings, SD.
- Lee JW, Gwak KS, Park JY, Park MJ, Choi, DH, Kwon M, Choi IG. 2007. Biological pretreatment of softwood *Pinus densiflora* by three whiterot fungi. *J Microbiol.* Vol. 45, 485-491.
- Li Y, Ruan R, Chen PL, Liu Z, Pan X, Lin X. 2004. Enzymatic hydrolysis of corn stover pretreated by combined dilute alkaline treatment and homogenization. *Trans ASAE.* Vol. 47, 821-825.
- Lyons TR. 2004. Ethanol around the world: rapid growth in policies, technology and production. In: Jacques KA, Lyons TP, Kelsall DR. (Eds.), *The Alcohol Textbook*, fourth ed. Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp. 1-8.
- Mandels M, Andreotti R, Roche C. 1976. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* Vol. 6, 17.
- Marshall MR, Graumlich TR, Braddock RJ, Messersmith M. 1985. A comparison of enzymatic and lime treatments for extraction of alcohol soluble solids from citrus peel. *J. Food Sci.* Vol. 50, 1211-1212.

- Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee YY, Holtzappple M. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *BioresourceTechnology*. Vol. 96, 673-686.
- Méndez O, Snell R., Alcaraz V., González V., Pelayo C. 2009. Anaerobic treatment of Tequila vinasses in a CSTR-type digester. Springer Science. Vol. 21, 357-363.
- Nelson D, Cox M. 2014. *Lehninger: Principios de Bioquímica*. Ediciones Omega. S.L.
- Neves MA, Kimura T, Shimizu N, Nakajima M. 2007. State of the art and future trends of bioethanol production, dynamic biochemistry, process biotechnology and molecular biology. Global ScienceBooks.
- Nielsen S. 1998; *Food Analysis Second Edition*; An Aspen Publication, Gaithersburg, Maryland.
- Nishio N, Nagai S, 1979. Production of macerating enzymes of mandarin orange peel by fungal cultures. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 6, 371-378.
- Nollet L. 1996. *Handbook of Food Analysis*; M. Dekker, New York, USA.
- Ohta K, Alterthum F, Ingram L. 1990. Effect of environmental conditions on xylose fermentation by recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 56, 463-465.
- Oliva JM, Negro MJ, Manzanares P, Ballesteros I, Chamorro MA, Sáez F, Ballesteros M, Moreno AD. 2017. A sequential steam explosion and reactive extrusion pretreatment for lignocellulosic biomass conversion within a fermentation-based biorefinery perspective. *Fermentation.* Vol. 3 (2).
- Olson, L. et al., 2005. Bioethanol production from lignocellulosic material. In *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility*. New York, USA: Marcel Dekker, pp. 957-993.
- Pandey A, Soccol CR, Nigam P, Soccol VT. 2000. Biotechnological potential of agroindustrial residues. I: sugarcane baggase. *Bioresource Technology*, 74.
- Prasad S, Singh A, Joshi HC. 2007. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resources, Conservation and Recycling*, 50:1-39.
- Rojas E. 1994. La fibradietética. En: Rojas Hidalgo Ed. *Los carbohidratosen nutrición humana*. Madrid: Grupo Aula Médica.
- Rubio M. 2015. Valorización de lirio acuático (*EichhorniaCrassipes*): pretratamiento del material lignocelulósico, estudios de digestibilidad y obtención de enzimas hidrolíticas a partir de compost. Tesis Facultad de Química, UNAM.
- Saha BC, Cotta MA. 2007. Enzymatic hydrolysis and fermentation of lime pretreated wheat straw to ethanol. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* Vol. 82, 913-919.
- Sánchez ÓJ, Cardona CA. 2008. Trends in biotechnological production of fuel etanol from different feedstocks. *BioresourceTechnology*. Vol. 99, 5270-5295.

- Sánchez R, Balderas P, Roa G, Ureña F, Orozco J, Lugo V, Flores N, Barrera C, Cajero P. 2014. Characterization of lignocellulosic fruit waste as an alternative feedstock for bioethanol production. *BioResources*. Vol. 9(2), 1873-1885.
- Sun Y, Cheng J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *BioresourceTechnology*. Vol. 83, 1-11.
- Tadao K, Yosito S. 1967. Degradation of L-ascorbic acid and mechanism of nonenzymic browning reaction. *Agricultural and Biological Chemistry*. Vol. 31(2), 170-184, DOI: 10.1080/00021369.1967.10858792.
- Talebnia F, Karakashev D, Angelidaki I. 2010. Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *BioresourceTechnology*. Vol. 101 (13), 4744-4753.
- Ting SV, Deszyck EJ. 1961. The carbohydrates in the peel of oranges and grapefruit. *J. FoodSci*. Vol. 26, 146-152.
- Ting SV. 1983. Citrus fruits, en *Handbook of Tropical Foods*. Ed. H.T. Chan, Jr. Marcel Dekker, Nueva York.
- Van Maris A, Abbott D, Bellissimi E, van den Brink J, Kuyper M, Luttik M, Wisselink H, Scheffers W, van Dijken J, Pronk J. 2006. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie Van Leeuwenhoek*. Vol. 90, 391-418.
- Wald S, Wilke CR, Blanch HW, 1984. Kinetics of the Enzymatic Hidrolysis of Cellulose, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol XXVI, 221-230.
- Wilkins, MR, Widmer WW, Cameron RG, Grohmann KG. 2005. Effect of seasonal variation on enzymatic hydrolysis of Valencia orange peel waste. *Proc. Fla. Hort. Soc*. Vol. 118, 419-422.
- Wyman CE, Dale BE, Elander RT, Holtzapple M, Ladisch MR, Lee YY. 2005. Comparative sugar recovery data from laboratory scale application of leading pretreatment technologies to corn stover. *BioresourceTechnology*, Vol. 96, 2026-2032.
- Zhao X, Cheng K, Liu D. 2009. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 82, 815-27.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations 2016. [En línea] (Actualizado al 1 de marzo de 2016).

Disponible en:

<http://www.fao.org/docrep/field/003/ab489s/ab489s04.html>

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2016. [En línea] (Actualizado al 1 de marzo de 2016).

- Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación. 2016. [En línea] (Actualizado al 1 de marzo de 2016).

Disponible en:

http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercado/SIST_PROD_CITRICOS.pdf[Último acceso el 29 de marzo de 2016].

Disponible en:

<http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>[Último acceso el 29 de marzo de 2016].

- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación. 2016. [En línea] (Actualizado al 24 de octubre de 2017).

Disponible en:

http://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2016/Atlas-Agroalimentario-2016 Servicio de Información Agroalimentaria y pesquera 2017. [En línea] (Último acceso 24 de octubre de 2017).

- U.S Department of Energy Genome Programs image gallery. 2016. [En línea] (Actualizado 21 diciembre de 2016).

Disponible en:

<http://genomics.energy.gov/>[Último acceso 21 de diciembre de 2016.