

Uso de enzimas obtenidas mediante el cultivo sustentable de moho sobre desechos orgánicos sólidos para el aprovechamiento de materias agrícolas poco explotadas bajo un enfoque de cero desechos

Use of enzymes obtained through the sustainable cultivation of mold on solid organic waste for the utilization of underexploited agricultural materials under a zero-waste approach

 Manuel Carrillo Cárdenas*, Jazmín Hernández Hernández**, Anita Hernández Hernández***, María Isabel Hernández Hernández****

Artículo recibido: 28-10-24

Artículo aprobado: 24-11-24

Palabras clave:

enzimas, cultivo sustentable, desechos orgánicos, aprovechamiento agrícola, cero desechos.

Keywords:

enzymes, sustainable cultivation, organic waste, agricultural utilization, zero waste.

Cómo citar este artículo

Carrillo Cárdenas, M., Hernández Hernández, J., Hernández Hernández, A. y Hernández Hernández, M. I. (2024). Uso de enzimas obtenidas mediante el cultivo sustentable de moho sobre desechos orgánicos sólidos para el aprovechamiento de materias agrícolas poco explotadas bajo un enfoque de cero desechos. *Entretextos*, 16(40), 1-19. <https://doi.org/10.59057/iberoleon.20075316.202440755>.

Resumen

La explotación acelerada de los recursos naturales ha llevado a la humanidad a una situación preocupante, pues algunos de ellos están por agotarse irreversiblemente. Esto implica consecuencias devastadoras para la humanidad y para el planeta entero. Por ello, resulta urgente el desarrollo de métodos que permitan la obtención de sustancias de interés a partir de fuentes no explotadas aún, de preferencia aquellas consideradas como residuos o desechos. En este trabajo se presenta un método sencillo, de bajo costo, sustentable y fácilmente replicable que aprovecha residuos orgánicos para la producción de celulasas y pectinasas mediante el cultivo de moho por fermentación en estado sólido. Las enzimas obtenidas permiten la recuperación de algunas sustancias de interés desde desechos agrícolas. En particular, se presenta la recuperación de carotenoides contenidos en la cáscara de mango y la

* Profesor de tiempo completo de la Universidad Politécnica de Huejutla. Autor para correspondencia. Correo electrónico: mcarrillo@uphuejutla.edu.mx.

** Estudiante de la Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria de la Universidad Autónoma Chapingo. Correo electrónico: al24520256@chapingo.mx.

*** Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Politécnica de Huejutla. Correo electrónico: 1901010234_hernandez@uphuejutla.edu.mx.

**** Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Politécnica de Huejutla. Correo electrónico: 1901010223_hernandez@uphuejutla.edu.mx.

producción de azúcares fermentables a partir de la degradación de la fibra del fruto del chote. De este modo, se adopta una estrategia de cero desechos, en la que todo residuo es aprovechado. Se destaca el papel que tuvieron tres mujeres jóvenes en el desarrollo del proyecto, quienes actualmente son ingenieras agroindustriales y quienes, con esta participación, contribuyen a la paridad de género en el ámbito científico.

Abstract

The accelerated exploitation of natural resources has led the humanity towards a concerning situation, as some resources will be completely depleted soon. This will carry undesirable consequences not only for our species, but also for the whole planet. Therefore, the development of procedures that allow the recovery of useful substances from unexploited sources such as wastes has become an urgent issue. This paper presents a simple, low-cost, sustainable, and easily replicable method to produce cellulases and pectinases from mold cultures by means of solid-state fermentation. These enzymes can be used for the recovery of valuable compounds from agriculture wastes. Particularly, the recovery of carotenoids from mango peel and the production of fermentable sugars from chote fruit cellulose fibers are presented. By doing so, a zero-waste strategy is adopted, where every waste is seen as a potential raw material. The role of three young women, who are currently agroindustrial engineers, in the development of the project is highlighted, as this contributes to the gender parity in science.

Introducción

La agroindustria se encarga de la transformación de los productos del sector primario, especialmente de las actividades pecuarias, agrícolas y pesqueras, con lo que se obtienen alimentos, cosméticos, materiales y combustibles, entre otros productos. Esta industria aprovecha, por lo general, una parte específica de sus insumos, por lo que, inevitablemente, produce al final de sus procesos una gran cantidad de residuos orgánicos como cáscaras, semillas, paja, bagazo, plumas, piel y huesos de animales, cascarilla de cereales o cascarones de huevo, por mencionar algunos. Muchos de estos materiales contienen aún compuestos que pueden ser aprovechados, por lo que en realidad no deberían ser considerados como desechos. Son pocas las empresas que buscan aprovechar estos residuos, en parte porque es más económico desechosarlos y también porque, a menudo, los procesos que lleva a cabo la empresa habitualmente no están diseñados para aprovechar los compuestos que sus residuos contienen. Lamentablemente, esta manera de operar refleja una visión lineal de la economía, donde las materias primas se transforman y los residuos son simplemente desechados, al igual que los mismos productos después de cumplir su vida útil, siendo, en muchos casos, productos de un solo uso. Esta visión implica una presión excesiva sobre los recursos del planeta y también genera una cantidad innecesaria de desechos a los que se les debe dar un tratamiento o confinamiento adecuado para que no perjudiquen al ambiente.

Es por ello que urge dar un giro a la manera como los humanos producimos bienes y optar por una economía circular, que implica asegurarnos de que los productos generados en la industria se reincorporen a la cadena productiva una vez terminada su vida útil, ya sea mediante estrategias de reciclaje, o bien, mediante su reincorporación segura al medio ambiente. De manera similar, los residuos que se generen deben de tener un destino similar al ser aprovechados o reincorporados al entorno. Una visión que va más allá es la estrategia de cero desechos (Pietzsch *et al.*, 2017), que tiene como principio el emplear al máximo todos los componentes de las materias primas que usa la industria, de modo que se evite la generación de residuos en absoluto. De esta forma, no hay necesidad de darles un tratamiento y además se reduce la presión sobre los recursos aún no extraídos de su entorno original, pues la demanda de materias primas de algunas industrias se podría satisfacer con los residuos de otras. De muchos residuos de la agroindustria es posible obtener, ya sea directamente o mediante transformaciones químicas, adhesivos, colorantes, vitaminas, lubricantes, aromatizantes, aceites, repelentes de insectos, combustibles e incluso precursores para crear materiales como plásticos biodegradables (Singh *et al.*, 2021).

Muchas de las frutas o vegetales que muestran coloraciones entre amarillo y anaranjado, como calabazas, zanahorias, papaya, mango, entre otras, se lo deben a un grupo de compuestos conocidos como carotenoides. También otros alimentos de origen animal como la yema de los huevos o la carne de salmón los contienen en cantidades apreciables (Meléndez-Martínez *et al.*, 2021). Los carotenoides son un conjunto de sustancias liposolubles, entre los que se hallan el alfa-caroteno, el beta-caroteno, la luteína y la capsantina, algunos de los cuales funcionan como precursores de la vitamina A (Rivera-Madrid *et al.*, 2020). Se les considera precursores debido a que cuando las personas ingieren estos carotenoides como parte de su dieta, el organismo rompe la molécula obteniendo la vitamina A. Los carotenoides tienen además la capacidad de absorber radiación ultravioleta y neutralizar especies reactivas de oxígeno que causan daño oxidativo a las células, por lo que se les considera antioxidantes (Fiedor y Burda, 2014). Estas moléculas no sólo están presentes en la pulpa de las frutas, sino también en las cáscaras y otros tejidos de las plantas (Gebregziabher *et al.*, 2023), por lo que las empresas que utilizan estos frutos para preparar alimentos y bebidas cuentan con una reserva de carotenoides en las cáscaras, que pueden recuperarse para después ser adicionados a productos como cremas corporales, aceites comestibles o cualquier otro producto de naturaleza grasosa, pues son compuestos liposolubles.

Por otro lado, el chote (*Parmeniera aculeata*), también conocido como cuajilote o pepino kat, es un fruto producido por un árbol que crece en zonas tropicales de América, distribuido de manera natural desde Honduras y El Salvador hasta la parte central de México (Pérez-Morales, 2020). Los frutos de este árbol tienen un jugo ligeramente azucarado y una pulpa fibrosa, similar al bagazo de la caña de azúcar. A pesar de que hace varias décadas, el consumo de este fruto era práctica común entre las poblaciones rurales, hoy

en día los frutos de este árbol se consumen muy poco y se usan principalmente como forraje, pues el árbol es plantado comúnmente en potreros para ofrecer sobra y alimento al ganado. En menor medida, este árbol se aprovecha con fines medicinales, como leña y para elaborar utensilios agrícolas (Pérez-Morales, 2020). Recientemente, se han explorado posibles aplicaciones biotecnológicas de esta especie, aprovechando el contenido de antioxidantes y de compuestos fenólicos del fruto (Santiago Ruiz *et al.*, 2021).

Los azúcares presentes en el jugo del fruto del chote: sacarosa, fructosa y glucosa (46.34, 33.20 y 20.49 % del total de azúcares, respectivamente) (Pérez-Morales, 2020), pueden en principio ser fermentados para obtener etanol, que dependiendo de su pureza puede usarse como desinfectante, como disolvente o como biocombustible. El contenido de azúcares reductores en el fruto del chote puede variar, pero se halla alrededor de 20 % (p/p) (Pérez-Morales, 2020). Si se desea aumentar la cantidad de azúcares fermentables en el fruto del chote, una alternativa atractiva es la hidrólisis del tejido fibroso del fruto, pues al componerse de polisacáridos como la celulosa y la hemicelulosa, puede degradarse para producir monosacáridos como la glucosa, que mediante fermentación se pueden convertir en etanol (Palacios-Hinestroza *et al.*, 2020).

En la naturaleza, la degradación de materia vegetal es una tarea en la que ciertos hongos están especializados, pues gracias a las enzimas que producen, son capaces de romper moléculas complejas que componen tejidos vegetales como cáscaras, hojas, tallos e incluso la madera, y así nutrirse de los productos obtenidos (Buckley, 2008). Los mohos son una clase de hongos que incluyen géneros como *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Penicillium*, los cuales son capaces de colonizar diversos entornos. Los restos orgánicos son un buen medio para el desarrollo de este tipo de organismos, pues son ricos en polisacáridos como el almidón, la celulosa y la pectina, a partir de los cuales se nutren los hongos. Debido al gran tamaño de esos polímeros, las especies de moho requieren de enzimas como las amilasas, celulasas y pectinasas, que son secretadas por los hongos para que actúen de manera extracelular sobre el sustrato que colonizan (El-Gendi *et al.*, 2022).

En este artículo se presenta la experiencia de tres mujeres jóvenes estudiantes de ingeniería agroindustrial, quienes, como parte de su proyecto final para la obtención de grado, desarrollaron un método sencillo, económico y sustentable para producir enzimas que permite la extracción verde de carotenoides desde las cáscaras de mango y la producción de azúcares fermentables a partir de la degradación de los tejidos fibrosos del fruto del chote. Dos de las estudiantes se autodenominan nahuas y son hablantes de náhuatl de la Huasteca. El método desarrollado por ellas destaca por prescindir de equipos especializados y de reactivos químicos peligrosos o de difícil disponibilidad, por lo que puede ser replicado en entornos donde se tengan limitaciones tecnológicas. Con los resultados que obtuvieron, las estudiantes hacen una valiosa aportación para avanzar hacia la obtención sustentable de materias primas, con lo que contribuyen, desde un entorno local, a atender problemas globales.

Metodología

Cultivo de moho mediante fermentación en estado sólido

Para cultivar los hongos que producen las enzimas que permiten la valorización de residuos agroindustriales se optó por emplear sustratos obtenidos a partir de desechos orgánicos. Esto para reducir los costos del método y para contribuir a la estrategia de cero desechos. Con el fin de identificar si el moho cultivado muestra un desarrollo preferencial en función de los componentes predominantes en los desechos orgánicos, se decidió llevar a cabo la fermentación en estado sólido sobre sustratos con diferente composición química. Se consideraron sustratos amiláceos (ricos en almidón) y también lignocelulósicos (ricos en celulosa, hemicelulosa y lignina). Estos residuos fueron restos de tortilla de maíz, restos de pan blanco de trigo, asientos de café y cáscaras de mango. Adicionalmente, se probó una muestra compuesta por una mezcla compleja de desechos orgánicos, esto con la intención de determinar si un sustrato con una variedad de componentes químicos facilita a los hongos el acceso a todos los nutrientes que requieren, con lo que se favorecería su desarrollo. Esta mezcla compleja se obtuvo recolectando los desperdicios vegetales de una cafetería. La Tabla 1 resume la caracterización de los cinco sustratos empleados.

Tabla 1. Sustratos empleados para el cultivo de hongos filamentosos productores de celulasas y pectinasas mediante fermentación en estado sólido.

Sustrato	Tipo de desecho	
Tortilla de maíz	amiláceo	
Pan blanco	amiláceo	
Asientos de café	lignocelulósico	
Cáscaras de mango	lignocelulósico	
Mezcla compleja de desechos	Componente	Porcentaje en peso seco (%)
	Cáscara de mango	20.6
	Restos de café molido	17.1
	Pan blanco de trigo	16.6
	Cáscara de tamarindo	15.0
	Tortilla de maíz	12.0
	Cáscara de liche	8.4
	Cáscara de plátano	2.5
	Vainas de chícharo	1.9
	Cáscara de mamey	1.5
	Cáscara de zanahoria	1.4
	Cáscara de manzana	0.9
	Cáscara de chayote	0.8
Cáscara de papaya	0.8	
Tallos de acelga	0.4	
Cáscara de pepino	0.3	

Fuente: Elaboración propia a partir de la mezcla compleja de desechos realizada.

Nota: Se detalla su composición.

Todos los sustratos se deshidrataron por completo en un deshidratador solar por diez horas (temperatura promedio de 61 °C y máxima de 72 °C) y se trituraron en seco empleando una licuadora hasta tener partículas de aproximadamente 2 mm. Después del triturado cada sustrato se tamizó con una malla de 2.5 mm. Para humedecer los sustratos se probaron disoluciones acuosas con tres valores de pH diferentes: uno moderadamente ácido (4.1), uno cercano a la neutralidad (5.9) y uno moderadamente alcalino (9.9). Para el valor de pH intermedio se empleó agua destilada. Las disoluciones ácida y alcalina se obtuvieron añadiendo respectivamente y poco a poco al agua destilada vinagre blanco comercial de alcohol de caña (acidez titulable del 4.7 % determinado experimentalmente mediante valoración con disolución de hidróxido de sodio 0.1 N) y bicarbonato de sodio comercial hasta alcanzar los valores reportados. De cada sustrato se pesó por triplicado una cantidad de 10.0 ± 1.0 g en sendas cajas Petri de vidrio y se humedecieron con agua destilada aplicada con un aspersor hasta alcanzar en cada caja una humedad de 30 ± 5 % (p/p), verificando que en ningún caso se observara la presencia de agua libre (Pandey y Negi, 2020). Este procedimiento se repitió para humedecer el mismo número de muestras tanto con la disolución moderadamente ácida como con la moderadamente alcalina. Los ensayos de fermentación en estado sólido consideraron cinco tipos de sustrato y tres valores de pH, teniendo en total 15 combinaciones posibles. A cada caja Petri se le colocó su tapa y todas ellas se incubaron en la oscuridad a una temperatura de 25.0 °C por diez días. Completado ese periodo se destaparon las cajas Petri y se registraron las características del moho desarrollado en cada caso.

Producción de enzimas

Luego de identificar que la variante de la fermentación en estado sólido que más favorece el desarrollo de moho resultó ser el sustrato compuesto por la mezcla de residuos con un pH = 5.9, se procedió a la producción de celulasas y pectinasas a mayor escala con esas condiciones. Para ello, se empleó la mezcla compleja de desechos orgánicos y agua destilada (pH = 5.9). Se colocaron 75 g de la mezcla de desechos orgánicos (Tabla 1) en un recipiente de plástico de 25 cm x 14 cm y 3 cm de altura con tapa hermética. Esa cantidad de sustrato se distribuyó de manera uniforme en todo el recipiente, obteniendo una capa de aproximadamente 0.5 cm de espesor. Se añadieron 35 g de agua destilada con un aspersor de modo que se obtuviera una humedad del 31.8 % (p/p), que fue verificada registrando el aumento en el peso del reactor al adicionar el agua. Se comprobó que después de humedecer el sustrato no se observara agua libre, sino que toda fuera absorbida por el sustrato. Se colocó la tapa del recipiente y se dejó incubar por quince días en la oscuridad a una temperatura de 28 °C.

Transcurrido el periodo de incubación, se abrió el recipiente, se registraron las características morfológicas macroscópicas del moho desarrollado y se tomaron muestras para su observación al microscopio (marca VE-B2 Velab).

Para coleccionar las enzimas extracelulares producidas por el mofo se siguió un procedimiento modificado de Marín *et al.* (2019). Para ello se añadieron 390 mL de agua destilada al recipiente donde se cultivó el mofo (relación sustrato-extractante de 1:3), se homogenizó con una varilla de vidrio perturbando completamente el sustrato sólido y se dejó reposar por 24 horas. Transcurrido este tiempo se filtró la mezcla con papel filtro, obteniendo una disolución de las enzimas de interés. Este líquido se almacenó a 4 °C hasta su empleo en los ensayos de degradación de tejidos vegetales.

Recuperación de carotenoides desde cáscaras de mango

Se obtuvieron cáscaras de mango (*Mangifera indica*) frescas, las cuales se secaron en un deshidratador solar por 8 horas a una temperatura promedio de 68 °C y una máxima de 76 °C. Ya secas, las cáscaras se trituraron mecánicamente en una licuadora hasta obtener partículas de aproximadamente 2 mm. Se almacenaron en un recipiente cerrado herméticamente para su conservación hasta el momento de emplearse.

Para evaluar cuantitativamente la eficiencia de las enzimas producidas por el mofo cultivado, en cuanto a la liberación de carotenoides desde las cáscaras de mango, se llevaron a cabo ensayos de degradación por triplicado (de Souza y Kawaguti, 2021). En recipientes de vidrio de 100 mL de capacidad se depositaron 20 g de cáscaras de mango trituradas y se añadieron 75 mL de agua destilada. A un conjunto de recipientes se les añadieron 15 mL adicionales de agua para completar un volumen final de 90 mL de agua (grupo control) y al otro conjunto se le añadieron 15 mL de la disolución de enzimas obtenida anteriormente. Los sistemas se mantuvieron en agitación constante por 24 horas para permitir actuar a las enzimas sobre el tejido vegetal. Transcurrido ese tiempo, se filtraron las mezclas con papel filtro, se registraron las características del sólido antes de descartarlo. Se llevó a cabo una extracción líquido-líquido de cada uno de los filtrados, empleando para cada uno tres porciones de 30 mL de aceite de coco comestible recalentado a 40 °C (Yara-Varón *et al.*, 2017). Las porciones oleosas de cada ensayo se combinaron para recuperar un volumen de aproximadamente 80 mL. Se seleccionó una de las muestras que presentó una coloración más intensa y se obtuvo su espectro UV-vis en el intervalo de longitud de onda (λ) de 320 a 480 nm con un espectrofotómetro VE-5000V (marca Velab) empleando aceite de coco como blanco.

Se midió la absorbancia ($\lambda = 410$ nm) de todas las fases oleosas para obtener una comparación relativa del contenido de carotenoides en cada muestra.

Para evaluar la posibilidad de emplear este método para transferir carotenoides a productos agroindustriales se repitió el procedimiento de degradación de las cáscaras de mango con el extracto de enzimas como se describió, pero empleando un quinto de las

cantidades mencionadas y usando en esta ocasión un bálsamo labial y una mantequilla como fases oleosas durante la extracción líquido-líquido (Yara-Varón *et al.*, 2017). Tanto los productos oleosos como el filtrado acuoso proveniente de los ensayos de degradación de las cáscaras de mango fueron precalentados a 60 °C en baño de agua al momento de llevar a cabo la extracción, que se realizó con una sola porción de aproximadamente 20 mL para efectuarla más rápido y evitar que la grasa solidificara. Una vez recuperadas las fases oleosas, se vertieron en recipientes limpios y se dejaron enfriar para que solidificasen.

Inmovilización de enzimas sobre biocarbón

Para el tratamiento de las fibras de chote se decidió emplear enzimas producidas a través del cultivo de moho mediante fermentación en estado sólido, pero inmovilizadas sobre partículas de biocarbón. Esto como una alternativa para recuperar las enzimas que intervienen en el proceso y poder usarlas en más de un lote. El carbón sobre el que se inmovilizaron las enzimas fue producido mediante la pirólisis de restos de granos de café molido de un tamaño de partícula de aproximadamente 1.0 cm. Se colectaron restos de café usado y se secaron por completo al sol. 200 g de este material fueron pirolizados en un horno de tambor doble a una temperatura de más de 500 °C. El biocarbón obtenido se lavó con agua destilada y se secó nuevamente al sol.

Como agente de unión entre el soporte sólido y las enzimas se empleó alginato, el cual se obtuvo a partir de algas pluricelulares (Yadav y Ahmadi, 2019) colectadas en un cuerpo de agua fresca. Las algas se dejaron secar por completo al sol y se trituraron con un mortero. Se tomaron 50 g de este material y se le añadieron 250 mL de ácido clorhídrico al 10 % (m/v) para extraer el alginato. Después de 24 horas se filtró la mezcla y el filtrado se neutralizó con hidróxido de sodio sólido hasta obtener un pH de 7.0 ± 0.5 . El líquido se filtró para eliminar los sólidos formados y se acidificó nuevamente con ácido clorhídrico al 10 % hasta obtener un pH = 4.0 ± 0.5 .

Se tomaron 70 mL de esta disolución de alginato, se le añadieron 70 mL de la disolución de enzimas provenientes del cultivo de moho y se añadieron 50 g de biocarbón de granos de café. Por último se agregaron 10 g de cloruro de calcio para producir *in situ* un gel de alginato de calcio que funcione como puente entre el biocarbón y las enzimas (Datta *et al.*, 2013). La mezcla se filtró y el carbón recuperado, ya con las enzimas inmovilizadas en su superficie, se lavó varias veces con agua destilada. La actividad de las enzimas inmovilizadas se comprobó en ensayos cualitativos empleando el reactivo de Benedict y carboximetilcelulosa como sustrato (Hernández-López *et al.*, 2020).

Obtención de etanol a partir de la hidrólisis de la fibra de chote

Se seleccionaron frutos de chote de aproximadamente 15 cm de largo y con una coloración completamente verde. Los frutos se lavaron con abundante agua, se cortaron en rodajas de aproximadamente 1.5 cm de ancho hasta completar una masa de 500 g. La mitad de esta cantidad se reservó y la otra mitad se sometió a un proceso de cocción en agua a 97 ± 2 °C durante 10 minutos para hidrolizar parcialmente las fibras de celulosa y demás polisacáridos que componen el fruto. Las porciones de chote crudo y hervido se trituraron por separado en una licuadora.

En recipientes de 500 mL de capacidad se colocaron 50 g de fibras de chote molidas. Se colocaron en recipientes separados fibras de chote crudo y las de fruto cocido. Se prepararon suficientes muestras para tener triplicados de controles de las fibras crudas y cocidas sin biocarbón y muestras de las fibras crudas y cocidas mezcladas con 10 g de biocarbón con enzimas inmovilizadas. Se añadió a cada recipiente 200 mL de agua destilada y se dejaron a una temperatura de 25 °C por seis días, después de lo cual se filtró el líquido con malla metálica con un tamaño de poro de 2 mm y el sólido se descartó. El líquido recuperado de cada ensayo se transfirió a un recipiente limpio y desinfectado de 500 mL de capacidad para llevar a cabo la fermentación de los azúcares que se hayan producido. Para ello se añadió a cada sistema una porción de 50 mL de una suspensión de levadura usada en panificación previamente activada con agua a 50 °C en una relación 1:4 (m/m)¹.

Se homogenizó el contenido de cada recipiente y se les colocaron tapas provistas de una trampa de aire para evitar la entrada de oxígeno al interior. Para maximizar la transformación de azúcares en alcohol, los sistemas se dejaron fermentar por 14 días, después de lo cual se estimó la cantidad de alcohol producido empleando un densímetro de triple escala (Brewmaster)².

Resultados

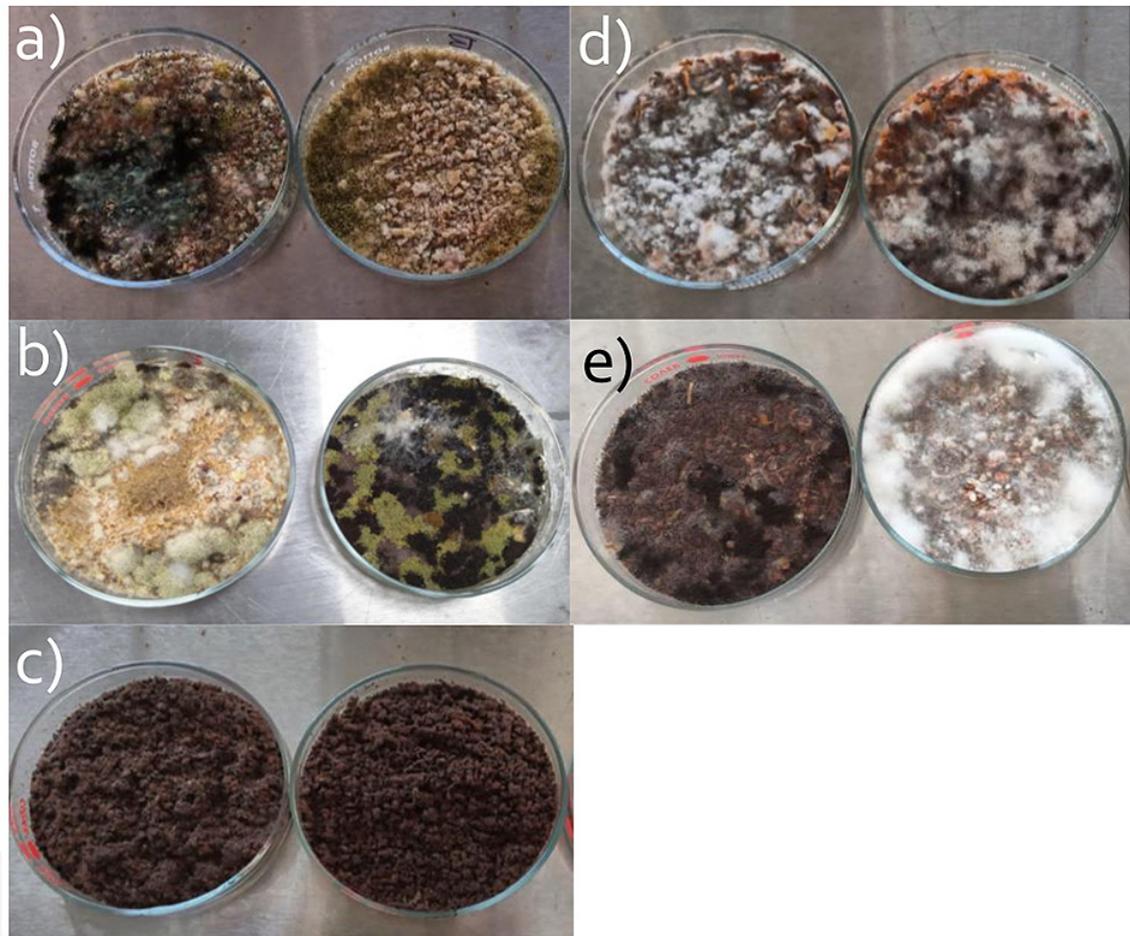
Cultivo de moho en diferentes sustratos y condiciones de pH

En todos los sustratos con un pH de 6.9 se observó, en mayor o en menor medida, el desarrollo de moho (Figura 1), aunque la variabilidad en sus características morfológicas y el grado de desarrollo fue diferente en cada caso. Esto refleja lo que señalan Chilakamarry *et al.* (2022) en cuanto a la variabilidad en los resultados cuando se emplea esta técnica.

¹ No se cuenta con la concentración de levadura expresada como ufc/mL, ya que se registró el peso de la levadura y del agua en la que se suspendió. Su relación fue de 1:4.

² No se realizaron mediciones de grados Brix.

Figura 1. Desarrollo de moho después de incubar por diez días sobre a) restos de tortilla de maíz, b) restos de pan blanco de trigo, c) asientos de café, d) cáscaras de mango y e) una mezcla compleja de residuos orgánicos.



Fuente: Elaboración propia.

El sustrato sobre el que se observó una mayor proliferación de moho fue el pan blanco de trigo. Este sustrato, al igual que los restos de tortilla de maíz, se compone principalmente de almidón, aunque en el caso de la tortilla, el almidón pasó por un proceso de nixtamalización, lo que puede inhibir el desarrollo de moho. En ambos sustratos se observa una buena diversidad de especies de moho y de estado de desarrollo. Otro sustrato sobre el que se favoreció el desarrollo de moho fueron las cáscaras de mango, ricas en celulosa y pectina, aunque no se observa mucha variabilidad en cuanto a la apariencia de las especies desarrolladas. Los granos de café molidos, compuestos por una buena proporción de celulosa, mostraron el desarrollo de un tipo de moho color café oscuro, muy similar al de los granos de café. De todos los sustratos, fue el que generó la mayor homogeneidad en el desarrollo de hongos, pues únicamente se observa este color sobre todo el sustrato. A pesar de ello, el moho colonizó prácticamente toda la superficie del sustrato, lo que

no ocurrió en todos los casos con los demás sustratos. Los dos principales componentes de la mezcla de residuos orgánicos son justamente cáscaras de mango y granos de café molidos. La mezcla de estos dos principales componentes, más la presencia de otro tipo de desechos, hacen que esta mezcla ofrezca una variedad de sustancias a partir de las cuales las especies de moho se pueden nutrir. Sobre este sustrato hubo mayor variabilidad en la apariencia del moho desarrollado en las tres réplicas, por lo que se decidió continuar con el resto de los experimentos de producción de enzimas con esta mezcla de desechos, con la intención de se lograra el desarrollo de una mayor variedad de especies de moho, con lo que también aumentaría la variabilidad de las enzimas que produzcan.

También se decidió emplear en adelante agua destilada para humedecer el sustrato empleado para el cultivo de moho, pues tanto la adición de vinagre como de bicarbonato al agua con el que se humedecen los sustratos para el cultivo de moho inhibieron el desarrollo de los hongos. En algunos casos esta inhibición fue tal, que después del tiempo de incubación no se observó a simple vista rastro alguno de moho sobre sustratos como la tortilla de maíz. De los dos agentes, el bicarbonato de sodio tuvo un efecto de inhibición mayor en comparación con el ácido acético, logrando inhibir por completo en varias muestras el desarrollo de moho después del tiempo de incubación, al menos a simple vista. El haber encontrado un pH cercano a la neutralidad como el más adecuado para el desarrollo de los hongos resulta conveniente, pues además de no requerir ninguna sustancia para ajustar el pH del medio, Boondaeng *et al.* (2024) reportaron que la producción de celulasas por parte de *Aspergillus niger* cultivado mediante fermentación en estado sólido resulta óptima a valores de pH de entre 5.0 y 7.0. La producción de pectinasas por hongos de los géneros *Aspergillus* y *Trichoderma* se optimiza a valores cerca de la neutralidad o ligeramente ácidos (Singh *et al.*, 2024), pero no se encontraron registros de que valores alcalinos o ligeramente alcalinos propicien o inhiban el desarrollo de moho ni la producción de enzimas, por lo que se decidió probar un pH alcalino en estos experimentos. Los resultados obtenidos nos confirmaron que un medio alcalino no es conveniente para la producción de enzimas mediante el cultivo de moho.

En el cultivo empleado para la producción de una cantidad mayor de enzimas para ser usadas posteriormente en los experimentos de recuperación de compuestos de interés desde tejidos vegetales mostró una diversidad en la apariencia de los mohos desarrollados. Usando como referencia una guía para la identificación de especies de moho (Evviva Sciences, 2019), se identificaron entre los organismos desarrollados en el medio de cultivo a partir de sus características macroscópicas (Figura 2) hongos pertenecientes a los géneros *Trichoderma* y *Aspergillus*³, lo que resulta conveniente para los fines del proyecto, pues son géneros conocidos por producir una diversidad de enzimas, entre ellas, celulasas (Mrudula y Murugammal, 2011; Katoch *et al.*, 2014) y pectinasas (Singh *et al.*, 2024) extracelulares.

³En general, quizá debido a su estado, no se lograron obtener imágenes claras con el microscopio; sin embargo, se usaron guías fotográficas para identificar a los hongos a partir de sus características macroscópicas.

Figura 2. Apariencia macroscópica del moho cultivado mediante fermentación en estado sólido sobre mezcla de desechos orgánicos.



Fuente: Elaboración propia.

Nota: Se identificaron especies de los géneros *Trichoderma* y *Aspergillus*.

Recuperación de carotenoides desde las cáscaras de mango

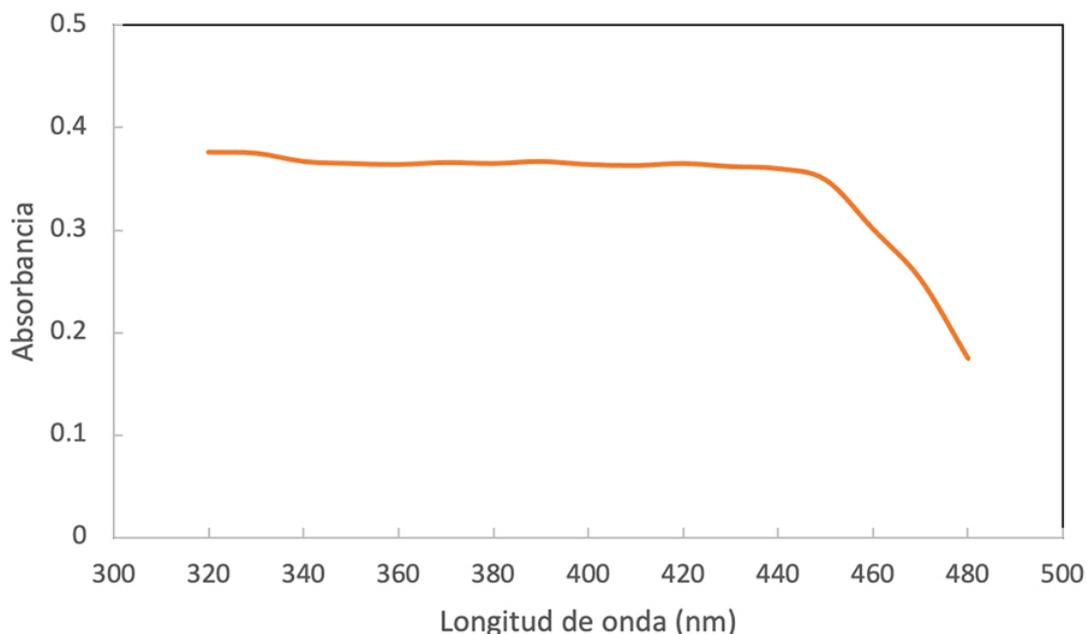
Después de tratar por 24 horas a las cáscaras de mango con el extracto de enzimas producidas por los hongos, resultó notable su consistencia en comparación con aquellas cáscaras que se mantuvieron sumergidas únicamente en agua. La consistencia de las que se pusieron en contacto con las enzimas resultó blanda y fue posible desintegrarlas presionándolas con los dedos, lo que no fue posible con aquellas cáscaras que estuvieron en contacto sólo con agua, que resultaron más firmes. Esto es indicio que las enzimas degradaron, al menos en parte, las estructuras que le dan firmeza a las cáscaras de mango, lo que en principio daría lugar a la liberación de los compuestos asociados a ellas, como los carotenoides. Vilas-Franquesa *et al.* (2024) reportaron que, al someter cáscaras de mango a tratamientos con variantes de mezclas de enzimas como pectinasas, glucanasas y endoglucanasas, se logró solubilizar dentro de las primeras dos horas de contacto los componentes de la pared celular, obteniendo concentraciones de material disuelto del doble en comparación con un control sin enzimas. Tiempos de contacto más prolongados no se tradujeron en concentraciones más altas de material disuelto.

Después de efectuar las extracciones líquido-líquido del medio acuoso donde se degradaron las cáscaras de mango, resultó notable que el aceite de coco adquirió una coloración

amarillenta, indicio de que contiene compuestos coloridos liposolubles. Es de suponerse que se trata de carotenoides, pues ese es su color característico. Precisamente se seleccionó al aceite de coco como fase oleosa para el proceso de extracción líquido-líquido, pues su falta de coloración hace posible la detección visual de los carotenoides.

El espectro de absorción en la región del UV-visible de este líquido teñido con carotenoides mostró una meseta por debajo de los 450 nm y un descenso abrupto de la absorbancia al superar este valor de longitud de onda (Figura 3). La presencia de una meseta en lugar de picos definidos no es algo extraño, pues se espera que se hayan extraído diversos compuestos agrupados bajo el término de carotenoides, cada uno con su propio espectro. La superposición de todos sus espectros genera el espectro obtenido. Kopec *et al.* (2012) discuten detalladamente la forma de los espectros en la región por debajo de 500 nm que generan las mezclas de carotenoides, mencionando que, aunque se suelen observar tres picos entre los 400 y 500 nm, los espectros pueden alterarse debido a interacciones con el disolvente, proteínas y lípidos, por lo que es difícil reconocer a cada carotenoide de manera individual con esta técnica. A pesar de ello, el espectro de la Figura 3 garantiza que la cuantificación de carotenoides extraídos de la cáscara de mango es posible a partir de la absorbancia registrada a 410 nm.

Figura 3. Espectro UV-vis de los carotenoides recuperados desde las cáscaras de mango.



Fuente: Elaboración propia.

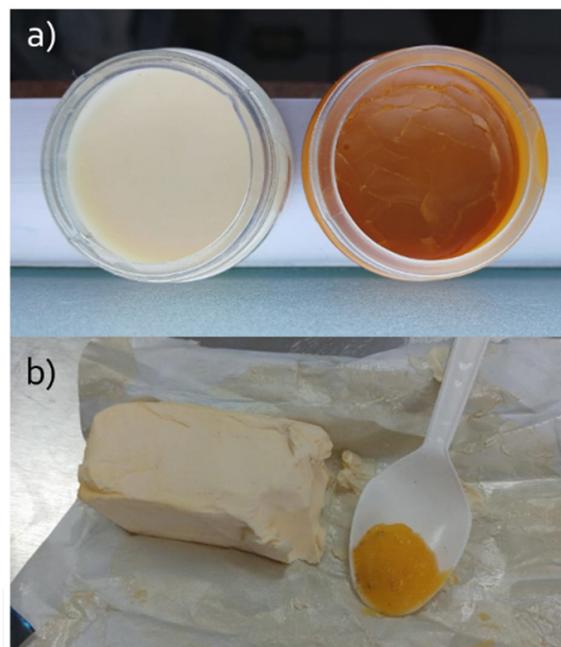
Nota: La absorbancia ($\lambda=410$ nm) de la fase oleosa de la extracción líquido-líquido, cuando las cáscaras de mango se expusieron por 24 horas únicamente a agua destilada, resulta apenas de 60 % de la que se obtiene de un tratamiento de las cáscaras de mango con las enzimas obtenidas en este estudio (Tabla 2). Aunque no se puede obtener un valor nominal de la concentración de carotenoides en la fase oleosa, pues no se empleó ningún estándar de estos compuestos, la comparación directa de los valores de absorbancia (Tabla 2) permite afirmar que las enzimas obtenidas a partir del moho cultivado sí logran aumentar la eficiencia de la liberación de carotenoides desde las cáscaras de mango y, por consiguiente, su posible recuperación para fines comerciales.

Tabla 2. Absorbancia de las muestras de aceite usadas en la extracción de carotenoides.

Tratamiento de las cáscaras de mango	A ($\lambda = 410 \text{ nm}$)
Con agua destilada	0.257 ± 0.051
Con extracto de enzimas	0.430 ± 0.003

Fuente: Elaboración propia.

Los dos productos seleccionados en este estudio para ser adicionados con carotenoides provenientes de las cáscaras de mango y recuperados con el método aquí presentado adquirieron, después del tratamiento, una notable coloración anaranjada que indica que lograron incorporar los carotenoides (Figura 4). Esto demuestra que el proceso aquí propuesto tiene el potencial de ser usado en la industria de los cosméticos o de los alimentos para dotar a los productos con este tipo de compuestos, aprovechando así un recurso considerado como desecho. Ya ha sido demostrada la efectividad como antioxidantes de los carotenoides provenientes de la cáscara de mango cuando se añade el aceite comestible de girasol (Sánchez-Camargo *et al.*, 2019), sin embargo, en ese estudio los antioxidantes se recuperaron mediante el uso de fluidos supercríticos, lo que eleva el costo y el impacto ambiental del método. Aún habría que realizar estudios al método aquí propuesto para garantizar la inocuidad de la fracción oleosa enriquecida con carotenoides, pues a pesar de que se espera que los hongos o sus esporas no lleguen a transferirse hasta esta fase, la confirmación de este aspecto está fuera de los alcances de este estudio.

Figura 4. Productos agroindustriales adicionados con los carotenoides recuperados de la cáscara de mango.

Fuente: Elaboración propia.

Nota: a) bálsamo labial y b) mantequilla comercial. En ambos casos la muestra con una coloración más tenue es el producto original y la de coloración intensa es el producto adicionado.

Actividad de las enzimas inmovilizadas sobre biocarbón

Las pruebas de actividad enzimática realizadas con el reactivo de Benedict a las enzimas inmovilizadas sobre biocarbón dieron resultados positivos cuando se empleó carboximetilcelulosa (CMC) como sustrato al observar un cambio en la coloración azul del medio a uno verdoso⁴. Esto indica que se logró una conversión, al menos parcial, de la CMC en azúcares libres, por lo que el biocarbón posee en su superficie celulasas activas producidas por los hongos filamentosos cultivados. El resultado negativo de un control de una muestra de CMC que no fue tratada con biocarbón (no hubo cambio en la coloración azul del medio) confirma que la producción de azúcares reductoras es producto de la acción de las enzimas inmovilizadas sobre este sustrato.

Fermentación de azúcares producidos a partir del fruto del chote

Los resultados de la producción de etanol a partir de la fermentación de los azúcares provenientes del fruto del chote permiten asegurar que las celulasas inmovilizadas sobre el biocarbón sí tuvieron un efecto en la producción de azúcares fermentables, pues en la muestra de chote crudo que fue tratada con enzimas mostró al final del proceso un porcentaje de etanol del doble respecto a la muestra que no se trató con enzimas (Tabla 3). Desgraciadamente, por cuestiones técnicas, la muestra de chote hervido tratado con enzimas no pudo ser usada para la cuantificación de etanol, pero el valor de la muestra de chote hervido sin el tratamiento de enzimas muestra un porcentaje mayor de etanol que aquella muestra que no se hirvió. Esto sugiere que la cocción de las fibras de chote hidroliza, al menos en parte, las cadenas de celulosa y hemicelulosa, con lo que, en principio, se facilitaría la acción de las celulasas para degradarlas y generar más azúcares fermentables. El resultado obtenido concuerda con el hecho de que el tratamiento térmico de las fibras de celulosa y hemicelulosa se considera como un pretratamiento que facilita la sacarificación de este tipo de materiales (Wang *et al.*, 2024).

Tabla 3. Producción de etanol a partir de los azúcares provenientes del fruto del chote.

Tratamiento	Contenido de etanol (%)	
	Fibras de chote crudo	Fibras de chote hervido
Sin enzimas	0.262	0.524
Con enzimas	0.524	Muestra contaminada

Fuente: Elaboración propia.

Aunque las concentraciones de etanol registradas resultan pequeñas, se demuestra que el tratamiento de las fibras de chote con las enzimas producidas mediante el cultivo de moho sí favorece la degradación de los polisacáridos presentes en el fruto. Hasta

⁴ No se cuenta con imágenes de estos resultados, ya que sólo se registraron en la bitácora las observaciones realizadas.

donde sabemos, no se ha reportado la sacarificación de las fibras de chote empleando enzimas inmovilizadas sobre un sustrato obtenido a partir de residuos agroindustriales. El chote es una especie que, aunque no se aprovecha comercialmente, últimamente ha recibido atención para que sea usada en la preparación de alimentos (Castillo-Ruiz *et al.*, 2022) y en la obtención de compuestos bioactivos (Santiago Ruiz *et al.*, 2021). Sin embargo, su potencial uso como fuente de bioetanol lignocelulósico ha sido poco evaluado.

Este estudio ilustra la relativa facilidad con la que un recurso lignocelulósico abundante en las regiones tropicales del continente americano y desaprovechado actualmente se convierte en una fuente potencial de azúcares fermentables mediante un tratamiento de bajo costo a partir del tratamiento con enzimas obtenidas de hongos filamentosos, cuyo cultivo no requiere de equipo especializado y que aprovecha residuos agrícolas.

Conclusiones reflexivas

Este trabajo presenta un método de bajo costo, sencillo y que no requiere equipos ni reactivos especializados para la producción sustentable de pectinasas y celulasas aprovechando desechos agrícolas y alimenticios como cáscaras de frutas, granos de café y restos de pan o tortillas para ser usados como sustrato de especies de moho que las producen. También se demuestran dos aplicaciones directas de estas enzimas en la valorización de dos materias en gran medida desaprovechadas: las cáscaras de mango y el fruto del chote. De la primera se obtienen carotenoides que resultan de interés en la industria cosmética y de los alimentos, mientras que de la segunda se obtienen azúcares fermentables que pueden transformarse en un biocombustible. En ambos casos se logra, por acción de las enzimas obtenidas a bajo costo y desde un enfoque de cero desechos, recuperar sustancias de interés comercial que pueden ser aprovechadas. Adicionalmente, hay que resaltar que el soporte sólido sobre el que se inmovilizaron las enzimas puestas a prueba proviene también de un desecho agroindustrial: los granos de café gastados transformados en biocarbón. Si bien este estudio muestra apenas el potencial que puede tener esta técnica y algunos aspectos quedan fuera de su alcance o deben de estudiarse con más detalle, se demuestra la relativa facilidad para valorizar recursos disponibles poco aprovechados mediante técnicas reproducibles en entornos donde la infraestructura y el acceso a equipo y reactivos especializados son limitados. Con ello se enfatiza la gran oportunidad que la humanidad tiene para fomentar, mediante técnicas sencillas y económicas, la economía circular, la cual se ha vuelto urgente adoptar, pues de otro modo la explotación acelerada de los recursos naturales que se observa actualmente llevará a su agotamiento y, con ello, al colapso del planeta.

Como reflexión sobre este trabajo, producto de tres mujeres jóvenes originarias de la Huasteca estudiantes de nivel superior, dos de las cuales se identifican como pertenecientes al pueblo nahua de la Huasteca, vale la pena destacar cómo la participación de

estas mujeres contribuye a acercarnos más a una paridad real en cuanto al protagonismo de las mujeres en el desarrollo de la ciencia y en ofrecer soluciones a los problemas que nos aquejan como humanidad.

En un ilustrador estudio que permite acercarnos a las experiencias de mujeres jóvenes al cursar estudios de nivel superior en el área de las ciencias y la ingeniería, Segura Salazar *et al.* (2022) exponen que entre las motivaciones que identificaron en esas mujeres para cursar estudios universitarios se hallan: 1) el poder aportar algo a sus comunidades de origen, 2) el beneficiar a su familia y 3) el deseo de ampliar su formación académica como un paso para continuar con un desarrollo personal. La experiencia de este proyecto no se halla muy alejada de estas observaciones, pues las tres estudiantes se involucraron con una inquietud y un interés auténtico por contribuir a mejorar las condiciones de vida de quienes habitamos este planeta. Una de ellas se halla actualmente inscrita en un programa de posgrado, lo que seguirá aportando a la paridad entre mujeres y hombres en cuanto a su participación en la ciencia. Con el desarrollo de este proyecto, las ahora ingenieras contribuyeron a su desarrollo personal, pero a la par, aportaron al desarrollo de las soluciones que la humanidad y nuestro planeta necesitan de manera urgente.

Referencias

- Boondaeng, A., Keabpimai, J., Trakunjae, C., Vaithanomsat, P. y Srichola, P., Niyomvong, N. (2024). Cellulase production under solid-state fermentation by *Aspergillus* sp. IN5: Parameter optimization and application. *Heliyon*, 10, e26601. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e26601>.
- Buckley, M. (2008). *The fungal kingdom: Diverse and essential roles in earth's ecosystem*. American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/aamcol.2nov.2007>.
- Castillo-Ruiz, R., Castillo-Archilla, J. A., Alemán-Castillo, S. E., Castillo-Ruiz, O. y Trejo-Díaz, G. N. (2022). Alternativas para el aprovechamiento del cuajilote (*Parmentiera edulis*): Una especie agroindustrial subutilizada. *CienciaUAT*. <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v17i1.1635>.
- Chilakamarry, C. R., Mimi Sakinah, A. M., Zularisam, A. W., Sirohi, R., Khilji, I. A., Ahmad, N. y Pandey, A. (2022). Advances in solid-state fermentation for bioconversion of agricultural wastes to value-added products: Opportunities and challenges. *Bioresource Technology*, 343, 126065. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126065>.
- Datta, S., Christena, L. R. y Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3(1), 1-9. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>.
- De Souza, T. S. P. y Kawaguti, H. Y. (2021). Cellulases, hemicellulases, and pectinases: applications in the food and beverage industry. *Food Bioprocess Technology*, 14, 1446-1477. <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02678-z>.
- El-Gendi, H., Saleh, A. K., Badierah, R., Redwan, E. M., El-Maradny, Y. A. y El-Fakharany, E. M. (2022). A comprehensive insight into fungal enzymes: structure, classification, and their role in mankind's challenges. *Journal of Fungi*, 8, 23. <https://doi.org/10.3390/jof8010023>.

- Evviva Sciences. (2019). *Mold identification guide*.
- Fiedor, J., y Burda, K. (2014). Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*, 6(2), 466-488. <https://doi.org/10.3390/nu6020466>.
- Gebregziabher, B. S., Gebremeskel, H., Debesa, B., Ayalneh, D., Mitiku, T., Wendwessen, T., Habtemariam, E., Nur, S. y Getachew, T. (2023). Carotenoids: Dietary sources, health functions, biofortification, marketing trend and affecting factors – A review. *Journal of Agriculture and Food Research*, 14, 2666-1543. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100834>.
- Hernández-López, A., Sanchez Felix, D. A., Sierra, Z. Z., Bravo, I. G., Dinkova, T. D. y Avila-Alejandre, A. X. (2020). Quantification of reducing sugars based on the qualitative technique of Benedict. *ACS Omega*, 5(50), 32403-32410. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c04467>.
- Katoch, M., Singh, G. y Vishwakarma R. A. (2014). Molecular Mechanism of Cellulase Production Systems in Trichoderma. En V. K. Gupta, M. Schmoll, A. Herrera-Estrella, R. S. Upadhyay, I. Druzhinina y M. G. Tuohy (Eds.), *Biotechnology and Biology of Trichoderma* (pp. 319-324). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00022-9>.
- Kopec, R. E., Cooperstone, J. L., Cichon, M. J. y Schwartz, S. J. (2012). Analysis methods of carotenoids. En Z. Xu y L. R. Howard (Ed.), *Analysis of Antioxidant Rich Phytochemicals* (pp. 105-148). John Wiley & Sons.
- Marín, M., Sánchez, A. y Artola, A. (2019). Production and recovery of cellulases through solid-state fermentation of selected lignocellulosic wastes. *Journal of Cleaner Production*, 209, 937-946. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.10.264>.
- Meléndez-Martínez, A. J., Mandić, A. I., Bantis, F., Böhm, V., Borge, G. I. A., Brnčić, M., ... O'Brien, N. (2021). A comprehensive review on carotenoids in foods and feeds: Status quo, applications, patents, and research needs. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(8), 1999-2049. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1867959>.
- Mrudula, S. y Murugammal, R. (2011). Production of cellulase by *Aspergillus niger* under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(3), 1119-1127.
- Palacios-Hinestroza, H., del Real-Olvera, J., Gurubel-Tun, K. J. y Sulbarán-Rangel, B. (2020). Biocombustibles a partir de la biomasa lignocelulósica. En F. Navarrete-Báez (Coord.), *La eficiencia de las energías renovables en México* (pp. 51-59). Universidad del Valle de Atemajac.
- Pandey, A. K. y Negi, S. (2020). Enhanced cellulase recovery in SSF from *Rhizopus oryzae* SN5 and immobilization for multi-batch saccharification of carboxymethylcellulose. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 26, 101656. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101656>.
- Pérez-Morales, S. (2020). Caracterización química y nutricional del fruto de chote (*Parmentiera aculeata*) [Tesis de maestría, Colegio de Postgraduados]. Repositorio institucional. http://colposdigital.colpos.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/10521/4976/Perez_Morales_S_MC_RGP_Ganaderia_2020.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- Pietsch, N., Duarte Ribeiro, J. L. y de Medeiros, J. F. (2017). Benefits, challenges and critical factors of success of Zero Waste: A systematic literature review. *Waste Management*, 67, 324-353. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.05.004>.
- Rivera-Madrid, R., Carballo-Uicab, V. M., Cárdenas-Conejo, Y., Aguilar-Espinosa, M. y Ramamoorthy Siva, R. (2020). 1 - Overview of carotenoids and beneficial effects on human health. En C. M. Galanakis (Ed.), *Carotenoids: Properties, Processing and Applications* (pp. 1-40). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817067-0.00001-4>.
- Sánchez-Camargo, A. P., Gutiérrez, L. F., Vargas, S. M., Martínez-Correa, H. A., Parada-Alfonso, F. y Narváez-Cuenca, C. E. (2019). Valorization of mango peel: Proximate composition, supercritical fluid extraction of carotenoids, and application as an antioxidant additive for an edible oil. *The Journal of Supercritical Fluids*, 152, 104574. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.104574>.

- Santiago Ruiz, C., Nuricumbo Lievano, V. N., Chapa Barrios, M. G., Vela Gutiérrez, G. y Velázquez, A. (2021). Antimicrobial activity, phenolic and antioxidant content of extracts from cuajilote (*Parmentiera aculeata* Kunth) fruits at different degrees of ripening. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 65(2), 161-169. <http://dx.doi.org/10.29356/jmcs.v65i2.1270>.
- Segura Salazar, C. M., Soto Espinoza, Y., Castillejos López, W. y Badillo Guzmán, J. (2022). Mujeres indígenas: Experiencias y sentidos en torno a la universidad. *Diálogos sobre Educación*, 13(25), 1-17. <https://doi.org/10.32870/dse.v0i25.1134>.
- Singh, R., Das, R., Sangwan, S., Rohatgi, B., Khanam, R., Kulsum P. S., Das, S., Lyngdoh, Y.A., Langyan, S., Shukla, A., Shrivastava, M. y Misra, S. (2021). Utilisation of agro-industrial waste for sustainable green production: A review. *Environmental Sustainability*, 4, 619-636. <https://doi.org/10.1007/s42398-021-00200-x>.
- Singh, B., Soni, S. K., Mathur, P. y Garg, N. (2024). Microbial multienzyme viz., pectinase, cellulase and amylase production using fruit and vegetable waste as substrate. A review. *Applied Microbiology*, 4(3), 1232-1246. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol4030084>.
- Vilas-Franquesa, A., Fryganas, C., Casertano, M., Nontemurro, M. y Fogliano, V. (2024). Upcycling mango peels into a functional ingredient by combining fermentation and enzymatic-assisted extraction. *Food Chemistry*, 434, 137515. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137515>.
- Wang, K., Shen, Z., Wang, X., Li, Z. y Cheng, S. (2024). Advances in enhancing the enzymatic saccharification process of lignocellulosic biomasses for bioethanol production. *Biomass and Bioenergy*, 191, 107450. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2024.107450>.
- Yadav, M. y Ahmadi, Y. (2019). Alginates: Source, chemistry and properties. En M. S. Hasnain y A. K. Nayak (Ed.), *Alginates. Versatile polymers in biomedical applications and therapeutics*. Apple Academic Press.
- Yara-Varón, E., Li, Y., Balcells, M., Canela-Garayona, R., Fabiano-Tixier, A-S. y Chemat, F. (2017). Vegetable oils as alternative solvents for green oleo-extraction, purification and formulation of food and natural products. *Molecules*, 22(9), 1474. <https://doi.org/10.3390/molecules22091474>.