



Thermo-hydrolysis for the release of monomeric sugars in agricultural waste (*agrowaste thermo-hydrolysis*)

Termo-hidrólisis para la liberación de azúcares monoméricos en residuos agrícolas (*termo-hidrólisis de agroresiduos*)

Chávez García, M.¹, González Morales, S.², Benavides Mendoza, A.³, Charles Rodríguez, A. V.⁴, Cabrera de la Fuente, M.³, Martínez Vázquez, D. G.⁴, Robledo Olivo, A.^{4*}

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, ¹Maestría en Ciencias en Horticultura; ²CONACyT-UAAAN; ³Departamento de Horticultura; ⁴Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos; Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista. Saltillo, Coahuila, 25315. México.

Cite this paper/Como citar este artículo: Chávez García, M., González Morales, S., Benavides Mendoza, A., Charles Rodríguez, A. V., Cabrera de la Fuente, M., Martínez Vázquez, D. G., Robledo Olivo, A. (2020). Thermo-hydrolysis for release of monomeric sugars in agricultural waste (*agrowaste thermo-hydrolysis*). *Revista Bio Ciencias* 7, e946. doi: <https://doi.org/10.15741/revbio.07.e946>



ABSTRACT

The uncontrolled dumping of waste and surpluses generated such as plant residues in rural areas is considered as an important source of infection for crops. These agro-wastes are considered as rich in polymers of starch and lignocellulose, which are formed by simple sugars. This research worked with grape bagasse (merlot variety) and pomegranate (wonderful variety), using them as raw material for thermal hydrolysis. The variables evaluated were total sugars and reducing sugars in the unhydrolyzed bagasse, in the hydrolyzed slurries and in the hydrolyzed broth. The increase in sugar concentration after the different treatments was effectively achieved with grape residues (1.77 mg/mL), and for pomegranate (3.18 mg/

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: February 19th 2020.

Accepted/Aceptado: October 08th 2020.

Available on line/Publicado: October 19th 2020.

*Corresponding Author:

Armando Robledo Olivo. Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista. Saltillo, Coahuila, 25315. México. E-mail: armando.robledo@uaaan.edu.mx; armando.robledo@outlook.com

RESUMEN

El vertido incontrolado de desechos y excedentes generados como residuos vegetales en el medio rural son considerados como foco importante de infección para los cultivos. Estos agroresiduos se consideran ricos en polímeros de almidón y lignocelulosa, los cuales están formados por azúcares sencillos. Esta investigación trabajó con bagazo de uva (variedad merlot) y granada (variedad wonderful), empleándolas como materia prima para su hidrólisis térmica. Las variables evaluadas fueron azúcares totales y azúcares reductores en los bagazos sin hidrolizar, en los "slurry" hidrolizados y en el caldo hidrolizado. El incremento en la concentración de azúcares tras los diferentes tratamientos, se logró efectivamente con residuos de uva (1.77 mg/mL), y granada (3.18 mg/mL), tomando en cuenta los resultados previos a la hidrólisis térmica plasmadas en este trabajo (1.31 mg/mL para uva; 2.08 mg/mL para granada). De acuerdo con los resultados obtenidos, existe una relación de eficiencia en la extracción de azúcares monoméricos y el tamaño de partícula

mL), taking into account the results prior to thermal hydrolysis presented in this work (1.31 mg/mL for grapes; 2.08 mg/mL for pomegranate). According to the results obtained, there is an efficiency ratio between the extraction of monimeric sugars and the particles size used, while the processing time is a determining factor in this investigation. Therefore, the exposure time in a process of thermal hydrolysis and the particles size of the raw material are important factors to consider, which affect the release of glucose from lignocellulosic matter of grape and pomegranate residues.

KEY WORDS

Pressure, Temperature, Particles, Grape, Pomegranate.

Introduction

Throughout the years, agricultural processes have generated very important quantities of hardly degradable by-products or residues (Castro Granada, 2018) in the environment (vegetable, plastic or pesticide container residues, etc.), derived from the use and maintenance of agricultural exploitations (Saval, 2012).

Biotechnology allows for the bio-conversion of agro-industrial residues (Blanco, 2017) in products of commercial interest by means of processes of direct extraction or transformation by chemistry or microbiology (Moldes *et al.*, 2002). In Mexico, a great quantity of agro-industries generates organic residues with a great potential for use (Mejías-Brizuela *et al.*, 2016), such as the case of grape bagasse which is used for elaborating wines in different regions of the country. Grape crops represent 0.83 % of the national GDP with a production in 2018 of 444.45 thousand tons (SIAP, 2018), estimating a production of 415.43 thousand tons by 2024 (SAGARPA, 2017). Regarding worldwide grape production during the 2018/2019 period, 22.15 million tons were generated (Shahbandeh, 2019). For the case of pomegranate crops, 8,073.88 tons were generated in 2018 in the national territory (SIAP, 2018). Meanwhile around 3 million tons are annually produced worldwide (Financial-Tribune, 2016).

The origin of the issue lies in the dumping of waste and surpluses generated as vegetable residues in the rural

empleado, mientras que el tiempo de procesamiento es un factor determinante en esta investigación. Por lo tanto, el tiempo de exposición en un proceso de hidrólisis térmica y el tamaño de partícula de la materia prima, son factores importantes por considerar, que afectan la liberación de glucosas de la materia lignocelulósica de residuos de uva y granada.

PALABRAS CLAVE

Presión, Temperatura, Partículas, Uva, Granada.

Introducción

A lo largo de los años, los procesos agrícolas han generado cantidades muy importantes de subproductos o residuos de difícil degradación (Castro Granada, 2018) en el ambiente (residuos vegetales, residuos plásticos, residuos de envases de plaguicidas, etc.), derivados del uso y mantenimiento de las explotaciones agrícolas (Saval, 2012).

La biotecnología permite la bio-conversión de residuos agroindustriales (Blanco, 2017) en productos de interés comercial mediante procesos de extracción directos o de transformación por química o microbiológica (Moldes *et al.*, 2002). En México existe gran cantidad de agroindustrias, que generan residuos orgánicos con un gran potencial de aprovechamiento (Mejías-Brizuela *et al.*, 2016), tal es el caso del bagazo de la uva que se utiliza para la elaboración de vinos en diferentes puntos del país. El cultivo de la uva representa el 0.83 % del GDP nacional con una producción en el 2018 de 444.45 miles de toneladas (SIAP, 2018), estimándose que para el 2024 serán 415.43 miles de toneladas (SAGARPA, 2017). En cuanto a la producción mundial de uva durante el periodo 2018/2019 se generaron 22.15 millones de toneladas (Shahbandeh, 2019). Para el caso del cultivo del granado, se generaron 8,073.88 toneladas del cultivo durante el 2018 en territorio nacional (SIAP, 2018). Mientras que a nivel global se producen alrededor de 3 millones de toneladas anuales (Financial-Tribune, 2016).

El origen del problema radica en el vertido de los desechos y excedentes generados como residuos vegetales en el medio rural, que ocasiona problemas creando un foco importante de infección para los cultivos, así como contaminación mediante la quema. En este panorama, se busca el aprovechamiento de carbohidratos complejos que

environment, causing problems by creating an important focal point of infection for the crops, as well as pollution during the burning. In this context, the use of complex carbohydrates making up the cell structure of the mentioned residues, such as cellulose and hemicellulose was investigated. In order to manage the use of these complex carbohydrates, they firstly have to be simplified in monomeric sugars, thus creating enriched broths for vegetables cultivation, and, by means of fermentation processes, they can generate diverse products of interest on the market (Mestries, 2015).

The pretreatment of the residues consists in fractioning the biomass into their main component (cellulose, hemicellulose and lignin) to make the subsequent enzymatic and microbial degradation easier. The hydrolysis, or breakup of the molecules in an aqueous medium (Sun *et al.*, 2016) has the purpose of transforming glucose polymers (starch and cellulose) into simple sugars (Álvarez *et al.*, 2016). The most used physicochemical strategies are liquid hot water (LHW), steam explosion, wet oxidation, sulfite pretreatment to overcome recalcitrance of lignocellulose (SPORL), ammonia pretreatment and microwave pretreatment (Kumar & Sharma, 2017). The LHW pretreatment is performed only with water and without catalyzers nor additional chemical products, which is advantageous since it is eco-friendly. Water is heated up at high temperature, while a pressure high enough to maintain water in its liquid state is applied. This process causes alterations in the lignocellulose structure.

The objective of this work was to analyze the possibility of using hydrothermal hydrolysis for breaking up vegetable polymers and for increasing monomeric sugars availability for its use in diverse industries of the biotechnological field.

Material and Methods

The present research work was performed at the department of Food Sciences and Technologies, in the laboratory of Fermentations of the Antonio Narro Agrarian Autonomous University. This research study consists of two stages, in the first one, a drying pretreatment was performed on raw material and its physicochemical characterization was achieved. Raw material was classified by particles size and total sugars and reducing sugars concentrations and antioxidant capacity were determined. The second stage consists of performing thermal hydrolysis on grape bagasse

forman la estructuración celular de mencionados residuos, como celulosas y hemicelulosas. Para lograr la utilización de estos carbohidratos complejos, primero deben ser simplificados en azúcares monoméricos y así crear caldos de cultivo enriquecidos, y por medio de procesos de fermentación generar diversos productos de interés en el mercado (Mestries, 2015).

El pretratamiento consiste en el fraccionamiento de la biomasa en sus componentes principales (celulosa, hemicelulosa y lignina) para facilitar el posterior ataque enzimático y microbiano. La hidrólisis, o ruptura de las moléculas en medio acuoso (Sun *et al.*, 2016), tiene como finalidad la transformación de los polímeros de glucosa (almidón y celulosa) en azúcares sencillos (Álvarez *et al.*, 2016). Las estrategias fisicoquímicas más utilizadas son el agua caliente líquida (LHW), la explosión de vapor, oxidación húmeda, pretratamiento con sulfito (SPORL), pretratamiento con amoníaco y el pretratamiento con microondas (Kumar & Sharma, 2017). El pretratamiento LHW se lleva a cabo solo con agua y sin catalizadores ni productos químicos adicionales, lo que es ventajoso, considerando lo amigable con el ambiente. El agua se calienta a temperaturas elevadas mientras se aplica una presión lo suficientemente alta como para mantener el agua en estado líquido. Este proceso provoca alteraciones en la estructura de la lignocelulosa.

El objetivo de este trabajo fue analizar la posibilidad de utilizar la hidrólisis hidrotérmica para la ruptura de los polímeros vegetales y el incremento en la disponibilidad de azúcares monoméricos para su utilización en diversas industrias del ramo biotecnológico.

Material y Métodos

El presente trabajo se llevó a cabo en el departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, en el laboratorio de Fermentaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Esta investigación constó de dos etapas, en la primera se realizó un pretratamiento a la materia prima de secado y caracterización física y bioquímica. Se clasificó por tamaño de partícula y se determinó la concentración de azúcares totales, azúcares reductores y capacidad antioxidante en la materia prima. La segunda etapa consistió en la realización de termo-hidrólisis al bagazo de uva (variedad merlot) y granada (variedad wonderful) para la liberación de azúcares monoméricos en el "slurry" (bagazo de uva hidrolizado) y

(merlot variety) and pomegranate (wonderful variety) for releasing monomeric sugars in "slurry" (hydrolyzed grape bagasse) and in the broth obtained from it. Three factors were evaluated in three levels each. These factors were: time (5, 10, 15 minutes), pressure (10, 15 and 20 psi) and particles size (0.85-1.00, 1.40-1.70 and 2.36-2.80 mm in diameter). The selection of factors was determined by considering diverse previous studies (Dos Santos Rocha *et al.*, 2017; Kumar & Sharma, 2017; Moure *et al.*, 2017) and by adjusting the levels for the study of the materials of the present experiment.

Obtaining and pre-processing raw material

Grape (merlot variety) and pomegranate (wonderful variety) residues were obtained in the regions of Parras and Cuatro Ciénegas, Coahuila, respectively. Since these residues were perishable, a dehydration pretreatment was performed on them in a convection drying stove (Biobase Biodustry BOV-T70C) at 60 °C for 24 hours. Grape and pomegranate dry residues were ground and classified by means of Montinox sieves (Mexico) of three sizes, #8 mesh (2.36 mm), #12 mesh (1.40 mm) and #20 mesh (0.85 mm). One gram of each vegetable sample was weighted, placed in 40 mL of distilled water and stirred for 20 min. Then the mixture was filtered and collected in glasses with ice, which was used for further analysis, considered as the filtered sample.

Determining total sugars

For quantifying total sugars (Dubois *et al.*, 1956) in the extract, 500 µL of the filtered sample was placed in a tube with 500 µL of 5 % phenol (Fermont, Mexico) and it was placed in an ice water bath for 5 minutes. With the tubes inside of the ice water bath, 1000 µL sulfuric acid (Jalmek, Mexico) were slowly added on the walls of the tubes and the mixture was let rest for 15 minutes. To stop the reaction, tubes were softly stirred and brought in a hot water bath at 50 °C for 5 minutes. Then, they were let cool at room temperature for 5 minutes. Absorbances were read in a BIOBASE EL-10 A ELISA microplate reader at 470 nm. Calibration curve was performed by using 0.1 % glucose (Jalmek, Mexico).

Quantifying reducing sugars

For determining reducing sugars (Miller, 1959), 1000 µL of the filtered mixture were added to 1000 µL of the DNS (3,5-Dinitrosalicylic acid) prepared and the mixture was placed in a water bath (Thermo Scientific), at 50 °C

el caldo obtenidos de ésta. Se evaluaron 3 factores en tres niveles cada uno. Los factores fueron: tiempo (5, 10, 15 minutos), presión (10, 15 y 20 psi) y tamaño de partícula (0.85-1.00, 1.40-1.70 y 2.36-2.80 mm de diámetro). La selección de los factores fue determinada tomando en cuenta diversos estudios previos (Dos Santos Rocha *et al.*, 2017; Kumar & Sharma, 2017; Moure *et al.*, 2017) ajustando los niveles para el estudio de los materiales del presente experimento.

Obtención y pretratamiento de la materia prima

Se obtuvieron los residuos de uva (variedad merlot) y granada (variedad wonderful) en las regiones de Parras y Cuatro Ciénegas, Coahuila respectivamente. Debido a que estos residuos son perecederos, se les realizó un pretratamiento de deshidratación en una estufa de secado por convección (Biobase Biodustry BOV-T70C) a 60 °C por 24 horas. Se molieron los residuos secos de uva y granada en una licuadora convencional, y se clasificaron utilizando tamices Montinox (México) de tres tamaños, malla #8 (2.36 mm), malla #12 (1.40 mm) y malla #20 (0.85 mm). Se pesó 1 g de cada muestra vegetal, se colocó en 40 mL de agua destilada y se agitó por 20 min. Posteriormente se filtró y se recibió el filtrado en vasos con hielo, el cual fue utilizado para los posteriores análisis, considerada como muestra filtrada.

Determinación de azúcares totales

Para la cuantificación de azúcares totales (Dubois *et al.*, 1956) en el extracto, se colocaron 500 µL de la muestra filtrada en un tubo, 500 µL de fenol (Fermont, México) al 5 % y se colocó a baño de agua con hielo por 5 minutos. Con los tubos dentro del baño con hielo, se añadió lentamente y por las paredes 1000 µL de ácido sulfúrico (Jalmek, México) y se dejó reposar por 15 minutos. Para detener la reacción, se agitó suavemente y se llevó a baño caliente a 50 °C por 5 minutos. Se dejó a enfriar a temperatura ambiente por 5 minutos. Se leyeron absorbancias en lector de microplacas BIOBASE EL-10 A ELISA a 470 nm. La curva de calibración se realizó utilizando glucosa (Jalmek, México) al 0.1 %.

Cuantificación de azúcares reductores

Para la determinación de azúcares reductores (Miller, 1959), se adicionaron 1000 µL de la muestra filtrada, 1000 µL del DNS preparado y se llevó a baño María (Thermo Scientific), a 50 °C por 5 minutos. Se adiciono 5 mL de agua destilada, se dejó reposar por 5 minutos a temperatura ambiente. Se leyeron absorbancias en lector de microplacas BIOBASE EL-10 A ELISA a 520

for 5 minutes. 5 mL of distilled water were added, it was let rest for 5 minutes at room temperature. Absorbances were read in a BIOBASE EL-10 A ELISA microplate reader at 520 nm. Calibration curve was performed by using 0.1 % glucose (Jalmek, Mexico). For preparing DNS reactive, 10 mL distilled water were heated at 50 °C in a water bath (Thermo Scientific), stirring and 3,5-Dinitrosalicic acid (Sigma-Aldrich, U.S.A.), sodium hydroxide (Jalmek, Mexico), sodium and potassium tartrate (Jalmek, Mexico), phenol (Fermont, Mexico) and sodium sulphate (Fermont, Mexico) were added in this order, it was diluted to 100 mL with distilled water, for conservation it was kept in dark and refrigerated.

Analyzing antioxidant compounds

For determining antioxidant compounds (Molyneux, 2004), 100 mg of sample were weighted and 1.5 mL methanol (Hycel, Mexico) were added in a 2 mL conic tube. The mixture was stirred in vortex for 20 seconds, sonicated for 5 minutes and then centrifuged at 12,000 rpm for 10 minutes. The supernatant was extracted and filtered with nylon syringe filter with pore size of 0.45 µm for further analysis. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH; Sigma-Aldrich, U.S.A.) was prepared at a concentration of 60 % w/v. The vegetable material sample and the DPPH radical were placed in a 50:50 ratio. Absorbances were read in a BIOBASE EL-10 A ELISA microplate reader at 540 nm.

Optimizing the thermal hydrolysis process

Optimization process was performed according to a fractional factorial design with orthogonal arrays, by using Minitab 17.1.0 software. Three factors were selected (time, pressure and particles size) and an orthogonal matrix was established with three levels of variation per factor (Table 1).

Thermal hydrolysis process

For the hydrolysis, 2 g of sample were used of each size of vegetable material and were placed in fiber filter bags (Ankom Technology F57), with pore size of 0.25 µm, with 500 mL distilled water. Then, the bags were placed inside a Molded Aluminum Pressure Reactor. Samples were classified as "slurry" referring to grape bagasse after the hydrolysis treatment; and the liquid fraction derived from the hydrolysis treatment was called hydrolyzed broth. Total sugars were determined in these two fractions. After obtaining results of each of the samples, they were compared and a factorial design analysis was performed

nm. Para la curva de calibración se utilizó glucosa (Jalmek, México) al 0.1 %. Para la preparación del reactivo DNS, se calentaron 10 mL de agua destilada a 50 °C en un baño María (Thermo Scientific), con agitación se agregó el ácido 3,5-dinitrosalicílico (Sigma-Aldrich, U.S.A.), hidróxido de sodio (Jalmek, México), tartrato de sodio y potasio (Jalmek, México), fenol (Fermont, México) y sulfito de sodio (Fermont, México) en ese orden, se aforó con agua destilada a 100 mL, para la conservación se mantuvo en oscuridad y en refrigeración.

Análisis de compuestos antioxidantes

Para la determinación de compuestos antioxidantes (Molyneux, 2004), se pesaron 100 mg de muestra y se colocaron 1.5 mL de metanol (Hycel, México) en un tubo cónico de 2 mL. Se agitó en vórtex por 20 segundos, se sonicó por 5 min y posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos. Se extrajo el sobrenadante y se filtró con pirinolas de nilón de poro 0.45 micrómetros para su posterior análisis. Se preparó el 2,2-difenil-1-picrilhidrasil (DPPH; Sigma-Aldrich, U.S.A.) a una concentración de 60 % p/v. Se colocó la muestra de material vegetal y el radical DPPH en una relación 50:50. Se leyeron absorbancias en lector de microplacas BIOBASE EL-10 A ELISA a 540 nm.

Optimización del proceso de hidrólisis térmica

El proceso de optimización se realizó mediante un diseño factorial fraccionado con arreglos ortogonales, mediante el software Minitab 17.1.0. Se seleccionaron tres factores (tiempo, presión y tamaño de partícula) y se estableció una matriz ortogonal L-9 con tres niveles de variación por factor (Tabla 1).

Proceso de hidrólisis térmica

Para la hidrólisis se utilizaron 2 g de muestra de cada tamaño de material vegetal y se colocaron en bolsas Filtro para fibra (Ankom Technology F57), de porosidad 0.25 micras, junto con 500 mL de agua destilada. Posteriormente se colocaron las bolsas dentro de un reactor de presión de aluminio vaciado. Las muestras fueron clasificadas en "slurry", haciendo referencia al bagazo de uva después del tratamiento de hidrólisis; y la fracción líquida derivada del tratamiento de hidrólisis, denominada caldo hidrolizado. A estas dos fracciones se les determinó azúcares totales. Después de haber obtenido los resultados de cada una de las muestras, se compararon y se hizo un análisis del diseño factorial, mediante el software estadístico Minitab (versión 17.1.0) para poder seleccionar los mejores valores.

Table 1.
Taguchi L-9 design with three factors in three levels.

Tabla 1.
Diseño Taguchi L-9 de tres factores en tres niveles.

Treatment	Time (min)	Pressure (psig)*	Size (mesh)
T1	5	10	8
T2	5	15	12
T3	5	20	20
T4	10	10	12
T5	10	15	20
T6	10	20	8
T7	15	10	20
T8	15	15	8
T9	15	20	12

*Hydrolysis temperatures were 115, 120 and 125°C, corresponding to pressures of 10, 15 and 20 psig respectively.

*Las temperaturas de hidrólisis fueron de 115, 120 y 125 °C, que corresponden a presiones de 10, 15 y 20 psig respectivamente.

using Minitab (17.1.0 version) statistical software to be able to select the best values.

Statistical analysis

For processing data, Minitab (17.1.0 version) statistical software package was used. An analysis of variance (ANOVA) and a Tukey's mean comparison test were performed ($p \leq 0.05$). Results were represented as mean \pm standard deviation.

Results and Discussion

The initial analysis of total and reducing sugars in the raw material, for both grape and pomegranate, showed that the highest concentration of total sugars in grape bagasse. Classified by particles size, was obtained with a size ranging from 1.40 to 1.70 mm with 2.682 mg/ml (Table 2). The highest concentration of reducing sugars in grape bagasse was obtained with a diameter of particles ranging from 0.85 to 1.00 mm (1.333 mg/mL). Regarding the antioxidant activity (AOx) represented by the DPPH content, the highest concentration was obtained with diameter of particles ranging from 2.36 to 2.80 mm (2.43 mg/mL).

Análisis estadístico

Para el procesamiento de los datos se utilizó el paquete Estadístico Minitab 17.1.0. Se realizó un análisis de varianza de medias (ANOVA) y prueba de comparación de medias Tukey ($p \leq 0.05$). Los resultados muestran los valores promedio con la desviación estándar obtenida.

Resultados y Discusión

El análisis inicial de azúcares totales y reductores en la materia prima, tanto de uva como de granada, muestra que la mayor concentración de azúcares totales en el bagazo de uva. Clasificado por tamaño de partícula se obtuvo con un tamaño entre 1.40-1.70 mm con 2.682 mg/mL (Tabla 2). La mayor concentración de azúcares reductores en bagazo de uva se obtuvo con diámetros de partícula entre 0.85-1.00 mm (1.333 mg/mL). En cuanto la actividad antioxidante (AOx) representada por el contenido de DPPH, la mayor concentración se presentó con diámetros de partícula entre 2.36-2.80 mm (2.43 mg/mL).

Para la cáscara de granada, la mayor concentración de azúcares totales se obtuvo en partículas entre 1.40-1.70 mm (4.215 mg/mL). La mayor concentración de azúcares reductores, se obtuvo con diámetros entre 0.85-1.00 mm

Table 2.
Concentration of total and reducing sugars in grape bagasse and pomegranate bagasse, classified by particle size.

Tabla 2.
Concentración de azúcares totales y reductores en el bagazo de uva y bagazo de granada, clasificada por tamaño de partícula.

Particle size	Grape			Pomegranate		
	TS (mg/mL)	RS (mg/mL)	AOx (mg/mL)	TS (mg/mL)	RS (mg/mL)	AOx (mg/mL)
2.36-2.80 mm	1.976±0.077 ^c	0.821±0.044 ^c	2.43±0.11 ^a	2.070±0.105 ^c	1.656±0.187 ^b	2.77±0.64 ^b
1.40-1.70 mm	2.682±0.104 ^a	1.017±0.054 ^b	2.08±0.08 ^b	4.215±0.212 ^a	1.646±0.086 ^b	4.59±0.66 ^a
0.85-1.00 mm	2.297±0.089 ^b	1.333±0.070 ^a	2.31±0.10 ^a	3.938±0.198 ^b	2.058±0.107 ^a	4.95±0.60 ^a

Averages with same letters between columns, are not statistically equals (Tukey $p \leq 0.05$). TS: Total sugars; RS: Reducing sugars; AOx: Antioxidant activity.

Promedios con letras iguales entre cada columna, no son diferentes estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$). TS: Azúcares totales; RS: Azúcares reductores; AOx: Actividad antioxidante.

For pomegranate peel, the highest of total sugars was obtained in particles ranging from 1.40 to 1.70 mm (4.215 mg/mL). The highest concentration of reducing sugars was obtained for diameters ranging from 0.85 to 1.00 mm (2.058 mg/mL). The highest concentration of DPPH was obtained with diameters of particles ranging from 0.85 to 1.00 mm (4.95 mg/mL).

The above mentioned reflected that the particles size is a factor affecting the quantification of analytes of interest. This variation can be attributed to the easiness of interaction of the raw material with the chemical compound, since it allows a better surface distribution. Jiménez Islas *et al.* (2012) showed the effect of the concentration of the acid used in the hydrolysis processes and mentioned that there can be an interference due to the variation in the size of particles of the material, mainly its interaction between the surface area and the acid attack towards the particles. To improve sugars extraction by thermal hydrolysis processes, a lower particles size supposes lower changes in the adhesion forces among particles of different sizes (Polachini *et al.*, 2019).

Experimental analysis of the thermal hydrolysis treatment

The levels experimentally evaluated to be able to study the thermal hydrolysis process, presented heating and cooling profiles with times of 13±2 min and 22±2 min, respectively. Table 3 shows the analysis of variance performed on reducing sugars data obtained from the treatments derived from the L-9 orthogonal design. For

(2.058 mg/mL). La mayor concentración de DPPH se obtuvo con diámetros de partícula entre 0.85-1.00 mm (4.95 mg/mL).

Lo anterior refleja que el tamaño de partícula es un factor que afecta en la cuantificación de analitos de interés. Esta variación puede ser atribuida a la facilidad con la que puede interactuar el material con el compuesto químico, ya que permite una mejor distribución superficial. Jiménez Islas *et al.* (2012) mostraron el efecto de la concentración del ácido empleado en los procesos de hidrólisis y mencionan que la interferencia se puede dar debido a la variación en el tamaño de partícula del material, principalmente su interacción entre el área superficial y el ataque ácido hacia las partículas. Para mejorar la extracción de los azúcares por procesos de termo-hidrólisis, un menor tamaño de partícula supondrá menores cambios en las fuerzas de adhesión entre partículas de diferentes tamaños (Polachini *et al.*, 2019).

Análisis experimental del tratamiento de hidrólisis térmica

Los niveles evaluados experimentalmente para poder estudiar el proceso de hidrólisis térmica presentaron perfiles de calentamiento y enfriamiento con tiempos de 13±2 min y 22±2 min respectivamente. La Tabla 3 muestra los análisis de varianza efectuados para los azúcares reductores obtenidos de los tratamientos derivados del diseño ortogonal L-9. Para el hidrolizado líquido de uva, los factores tiempo, presión y tamaño de partícula en los niveles individuales evaluados, no mostraron efectos

Table 3.
ANOVA of the Taguchi design for reducing sugars from grape residues.

Tabla 3.
ANOVA del diseño Taguchi para los azúcares reductores de residuos de uva.

Hydrolysate	Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
	Time	2	0.32786	0.32786	0.16393	1.24	0.447
	Pressure	2	0.03980	0.03980	0.01990	0.15	0.869
	Size	2	0.42639	0.42639	0.21319	1.61	0.383
	Residual error	2	0.26502	0.26502	0.13251		
	Total	8	1.05906				
Slurry	Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
	Time	2	0.47264	0.47264	0.236319	26.00	0.037
	Pressure	2	0.35601	0.35601	0.178004	19.58	0.049
	Size	2	0.37008	0.37008	0.185042	20.35	0.047
	Residual error	2	0.01818	0.01818	0.009091		
	Total	8	1.21691				

DF: degrees of freedom; Seq SS: Sequential Sum-of-Squares; Adj SS: Adjusted Sum-of-squares; Adj MS: Adjusted Mean Square.
DF: grados de libertad; Seq SS: suma de cuadrados secuenciales; Adj SS: Suma de cuadrados ajustada; Adj MS: Cuadrado medio ajustado.

grape liquid hydrolysate, time, pressure and particles size factors in the individual levels evaluated did not showed significant effects ($p \leq 0.05$). However, the model estimated by Taguchi's analysis achieved to determine that the best effect for releasing reducing sugars for the hydrolysate was given by the particles size, followed by the duration time of the process (Figure 1).

For the slurry of grape residues, the three factors evaluated showed a significant effect for the release of reducing sugars ($p \leq 0.05$), being the time the factor which most benefits the process, followed by the pressure in the system (Figure 2).

In the case of the liquid hydrolyzed and the slurry of pomegranate residues, time, pressure and particles size factors in the individual levels evaluated, did not show significant effects ($p \leq 0.05$) in either treatment.

The greatest effect for the release of reducing sugars for the hydrolysate was given by the pressure during the process, followed by the duration time of the process (Figure 3); and the greatest effect for the release of sugars in the slurry was the particles size, followed by the time of the process (Figure 4).

significativos ($p \leq 0.05$). Sin embargo, el modelo estimado por el análisis de Taguchi logró determinar, que el mayor efecto para la liberación de azúcares reductores para el hidrolizado está dado por el tamaño de partícula, seguido por el tiempo de duración del proceso (Figura 1).

Para el slurry de residuos de uva los tres factores evaluados mostraron un efecto significativo para la liberación de azúcares reductores ($p \leq 0.05$), siendo el tiempo el factor que más beneficia al proceso, seguido de la presión en el sistema (Figura 2).

En el caso del hidrolizado líquido y del slurry de los residuos de granada, los factores tiempo, presión y tamaño de partícula en los niveles individuales evaluados, no mostraron efectos significativos ($p \leq 0.05$) en ambos tratamientos.

El mayor efecto para la liberación de azúcares reductores para el hidrolizado está dado por la presión en el proceso, seguido por el tiempo de duración del proceso (Figura 3); y el mayor efecto para la liberación de azúcares en el slurry, fue el tamaño de partícula, seguido del tiempo del proceso (Figura 4).

La diferencia en los ANOVAs y el impacto de los factores evaluados en la liberación de los azúcares monoméricos

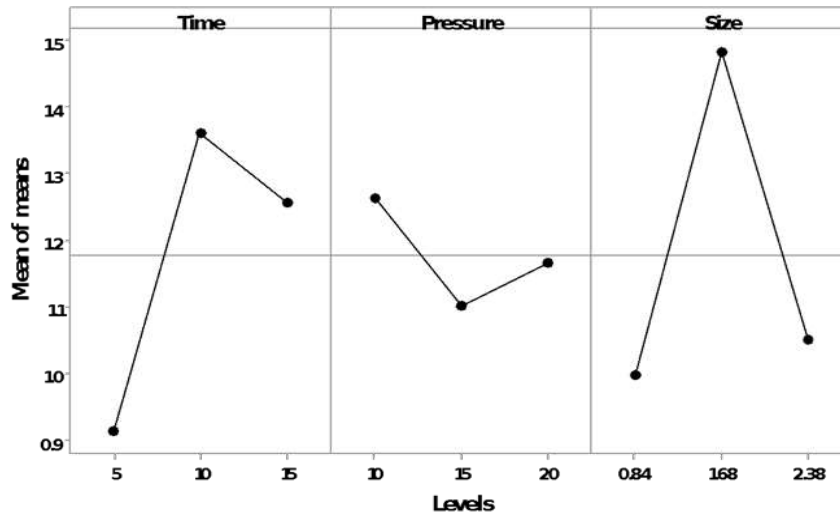


Figure 1. Main effects for the means of reducing sugars in the grape hydrolysate.

Figura 1. Efectos principales para las medias de azúcares reductores en el hidrolizado de uva.

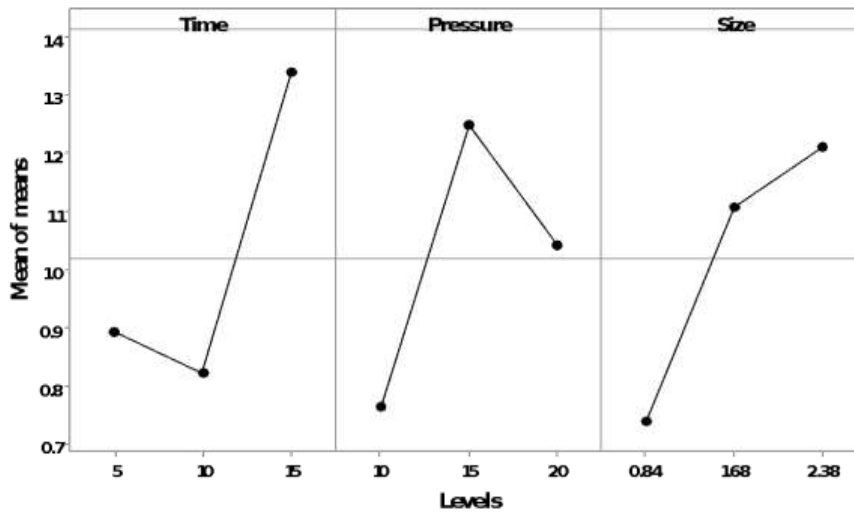


Figure 2. Main effects for the means of reducing sugars in the grape slurry.

Figura 2. Efectos principales para las medias de azúcares reductores liberados en el slurry de uva.

Table 4.
ANOVA of the Taguchi design for reducing sugars from pomegranate residues.

Tabla 4.
ANOVA del diseño Taguchi para los azúcares reductores de residuos de granada.

	Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Hydrolysate	Time	2	1.2535	1.2535	0.6268	0.53	0.652
	Pressure	2	1.1289	1.1289	0.5644	0.48	0.675
	Size	2	0.5560	0.5560	0.2780	0.24	0.808
	Residual error	2	2.3454	2.3454	1.1727		
	Total	8	5.2838				
	Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Slurry	Time	2	1.549	1.549	0.7745	0.24	0.808
	Pressure	2	1.463	1.463	0.7317	0.22	0.817
	Size	2	3.238	3.238	1.6189	0.50	0.668
	Residual error	2	6.521	6.521	3.2604		
	Total	8	12.771				

DF: degrees of freedom; Seq SS: Sequential Sum-of-Squares; Adj SS: Adjusted Sum-of-squares; Adj MS: Adjusted Mean Square.

DF: grados de libertad; Seq SS: suma de cuadrados secuenciales; Adj SS: Suma de cuadrados ajustada; Adj MS: Cuadrado medio ajustado.

The difference detected in ANOVAs and the impact of the factors evaluated in the release of monomeric sugars can be due to the characteristics of the vegetable material. When using residues of industrial processes where sugars are required as raw material, they lack of hydro-soluble available sugars for their aqueous extraction at low time and temperature conditions.

Analyzing and optimizing thermal hydrolysis conditions for grape residues showed that time-size and pressure-size interactions presented the highest severity indexes (27.41 % and 20.76 % respectively). For pomegranate residues, the most critical interaction with 34.29 % of severity was the pressure-size one. The particles size makes the hydrolysis easier, due to the extension of the contact area, in addition to improve solubility for the smaller particles sizes (Grajales Martínez *et al.*, 2018).

Therefore, the conditions that most favored the release of reducing sugars of grape residues hydrolysates can be determined, such as: time of 10 minutes, pressure of 10 psi and size of 1.40-1.70 mm; while for slurry, they were: time of 15 minutes, pressure of 15 psi and size of 2.36-2.80 mm. The conditions for pomegranate residues hydrolysates were time of 15 minutes, pressure of 20 psi and size of 1.40-1.70 mm; while for

se puede deber a las características del material vegetal. Al emplear los residuos de procesos industriales donde se requieren los azúcares como materia prima, estos carecen de azúcares hidrosolubles disponibles para extracción acuosa a bajas condiciones de tiempo y temperatura.

El análisis y optimización de las condiciones de hidrólisis térmica para los residuos de uva mostraron que las interacciones entre tiempo-tamaño y presión-tamaño presentan los mayores índices de severidad (27.41 % y 20.76 % respectivamente). Para los residuos de granada, la interacción más crítica con el 34.29 % de severidad fue la de presión-tamaño. El tamaño de partícula facilita la hidrólisis, debido a la ampliación del área de contacto, además de solubilizarse en mayor medida a tamaños más pequeños de partícula (Grajales Martínez *et al.*, 2018).

Con lo anterior, se pudo determinar las condiciones que más favorecen la liberación de azúcares reductores de hidrolizados de residuos de uva, como son: tiempo de 10 min, presión de 10 psi y tamaño de 1.40-1.70 mm; mientras que para el slurry son: tiempo de 15 min, presión de 15 psi y tamaño de 2.36-2.80 mm. Las condiciones para los hidrolizados de residuos de granada son: tiempo de 15 min, presión de 20 psi y tamaño de 1.40-1.70 mm; mientras para el slurry: tiempo de 5 min, presión de 15 psi y tamaño de 2.36-2.80 mm.

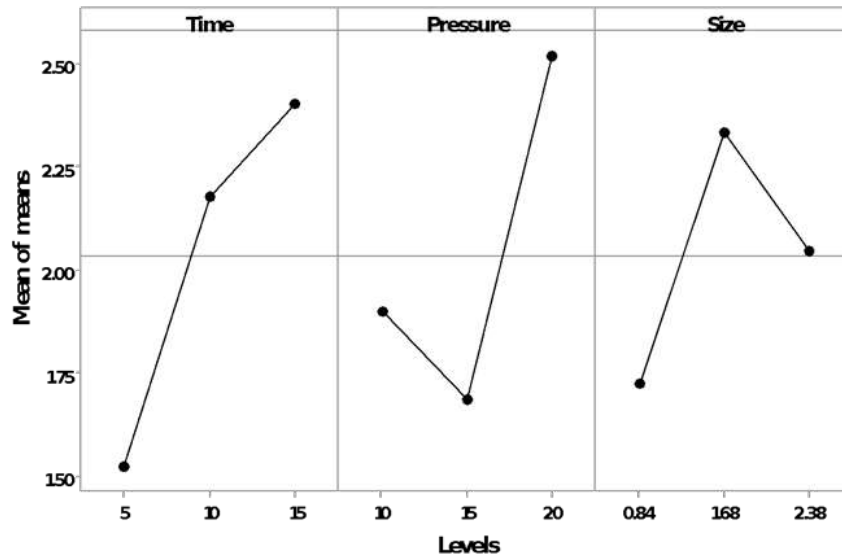


Figure 3. Main effects for the means of reducing sugars in the pomegranate hydrolysate.

Figura 3. Efectos principales para las medias de azúcares reductores liberados en el hidrolizado de granada.

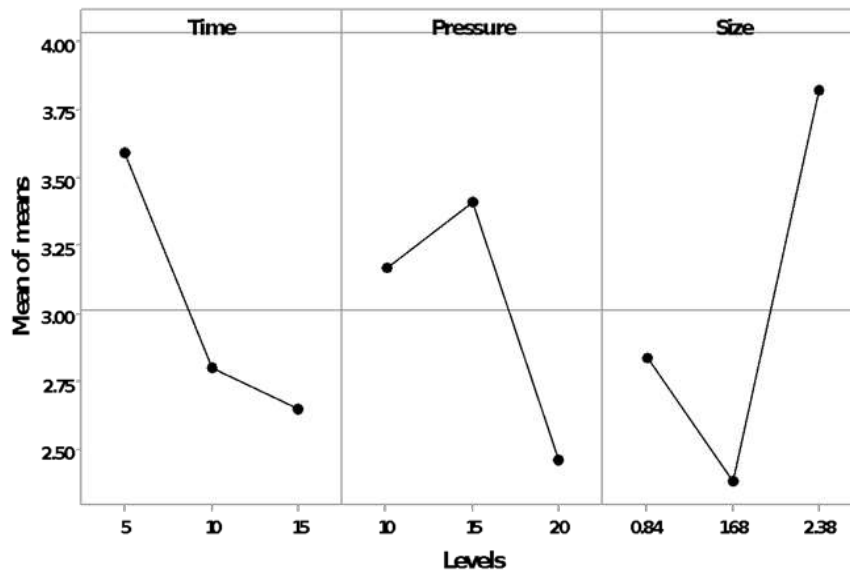


Figure 4. Main effects for the means of reducing sugars in the pomegranate slurry.

Figura 4. Efectos principales para las medias de azúcares reductores liberados en el slurry de granada.

Table 5.
Sugars and antioxidant (AOx) content comparison from the grape and pomegranate and the thermo-hydrolysis properties.

Tabla 5.
Comparación del contenido de azúcares y capacidad antioxidante (AOx) de la uva y granada, y los derivados del proceso de termo-hidrólisis.

	Glucose (mg/ml)	AOx (mg/ml)
Grape-Initial	1.31±0.04 ^b	2.27±0.18 ^a
Grape-Hydrolysate	1.77±0.02 ^a	0.99±0.53 ^b
Grape-Slurry	1.76±0.04 ^a	1.64±0.14 ^b
Pomegranate-Initial	2.08±0.02 ^c	4.10±0.17 ^a
Pomegranate-Hydrolysate	3.18±0.03 ^a	2.24±0.13 ^b
Pomegranate-Slurry	2.33±0.04 ^b	2.21±0.40 ^b

slurry, they were: time of 15 minutes, pressure of 15 psi and size of 2.36-2.80 mm.

The conditions achieved a better extraction of reducing sugars content (Table 5), allowing to generate an added value to these residues, and being able to use them as a substrate in diverse processes for obtaining biomolecules or biofuels.

In both vegetable residues, the hydrolysis process achieved to increase reducing sugars extraction present in vegetables, compared to initial values of the respective grape and pomegranate values. The quantity of water absorbed in the particles allows to give access to water molecules, helping swell the vegetable material, generating amorphous regions and favoring the hydrolysis process (Kapoor *et al.*, 2019).

Hydrolysis treatments achieved to convert recalcitrant vegetable wall, mainly made up by lignin, into hemicellulose compounds of higher availability for monomeric sugars. Zietsman *et al.* (2017) identified that the thermal treatment to which their grape residues samples were submitted managed to eliminate pectin and to increase released carbohydrates (xylan, xyloglucan, cellulose and mannan polymers) in the supernatants obtained. Dos Santos Rocha *et al.* (2017), when performing hydro-thermal treatments studies on sugarcane bagasse, reported that thermal treatments can remove hemicellulose up to 85 %, favoring the conversion of complex carbohydrates into oligomers and monomers.

Las condiciones antes mencionadas, logran una mejor extracción del contenido de azúcares reductores (Tabla 5), lo que permite generar un valor agregado a estos residuos, y poderlos emplear como sustrato en diversos procesos para la obtención de biomoléculas o biocombustibles.

En ambos residuos vegetales, el proceso de hidrólisis logra incrementar la extracción de los azúcares reductores presentes en los vegetales, comparado con los valores iniciales de las respectivas muestras de uva y granada. La cantidad de agua absorbida en las partículas permite dar acceso a las moléculas de agua, lo que ayuda a hinchar el material vegetal, generando regiones amorfas y favorecer el proceso de hidrólisis (Kapoor *et al.*, 2019).

Los tratamientos de hidrólisis logran convertir la pared vegetal recalcitrante, conformada principalmente por lignina, en compuestos de hemicelulosa de mayor accesibilidad hacia los azúcares monoméricos. Zietsman *et al.* (2017) identificaron que el tratamiento térmico al que sometieron sus muestras de residuos de uva logró eliminar la pectina incrementar los carbohidratos liberados (xilano, xiloglucano, celulosa y polímeros de manano) en los sobrenadantes obtenidos. Dos Santos Rocha *et al.* (2017) al realizar estudios de tratamientos hidrotérmicos sobre bagazo de caña de azúcar, reportan que los tratamientos térmicos pueden remover la hemicelulosa hasta un 85 % favoreciendo la conversión de carbohidratos en oligómeros y monómeros.

Las condiciones de presión (temperatura) y tamaños de partícula evaluadas logran remover la lignina de la fase líquida

Pressure (temperature) conditions and particles size evaluated achieved to remove lignin from the liquid phase (hydrolysate), being more evident in pomegranate residues than in grape residues (Table 4). The low quantity of glucose in hydrolysate grape can be due to the conversion of initial monomeric sugars into hydroxymethylfurfural and furfural (Dos Santos Rocha *et al.*, 2017).

The analysis of the antioxidant capacity of materials of grape bagasse and pomegranate residues were observed to be related to times of residence and temperature, due to the characteristics presented by proanthocyanidins, anthocyanins and flavonoids when being submitted to hydrolysis and when increasing hydrolysis times (Petrović *et al.*, 2016), which represents a decrease in its antioxidant activity when being submitted to higher times and temperatures of the thermal process. The antioxidant activity is related to phenolic compounds present in the vegetable material and to the derivatives of lignin degradation by thermal treatment. In the case of grape and pomegranate hydrolysates, reductions of the antioxidant effect were shown in samples treated with thermal hydrolysis. The concentration and the type of phenolic compounds present in the hydrolysates depend on operating conditions (temperature and residence times), as well as on the treated lignocellulosic material and its initial phenolic compounds content (Moure *et al.*, 2017).

Conclusion

The thermal hydrolysis process managed to release a higher quantity of sugars in grape and pomegranate samples, compared with the initial ones. The release of reducing sugars indicated that the thermal hydrolysis process as a pretreatment managed to remove the vegetal lignin and to give availability to the present sugars.

The time of the process and the particles size are determining factors in the hydrolysis process. The exposure time is clearly a variable to be considered in the future, above all if higher concentrations are wanted in sugars extraction of agro-industrial residues.

Acknowledgements

The author Mariela Chávez García thanks CONACYT for funding her postgraduate studies. The

(hidrolizado) siendo más evidente en los residuos de granada que en los de uva (Tabla 4). La baja cantidad de glucosa en la uva hidrolizada se puede deber a la conversión de los azúcares monoméricos iniciales en hidroximetilfurfural y furfural (Dos Santos Rocha *et al.*, 2017).

Los análisis de la capacidad antioxidante en los materiales de bagazo de uva y residuos de granada se ven relacionados con los tiempos de residencia y temperatura, debido a las características que presentan las proantocianidinas, antocianinas y flavonoides de sufrir hidrólisis conforme se incrementan los tiempos de hidrólisis (Petrović *et al.*, 2016), lo que representa una baja en su actividad antioxidante al ser sometidas a mayores tiempos y temperaturas de proceso térmico. La actividad antioxidante está ligada a los compuestos fenólicos presentes en el material vegetal y a los derivados de la degradación de la lignina por el tratamiento térmico. En el caso de los hidrolizados de uva y granada, se mostraron reducciones en el efecto antioxidante de las muestras tratadas con la termo-hidrólisis. La concentración y el tipo de compuestos fenólicos presentes en los hidrolizados dependen de las condiciones de operación (temperatura y tiempos de residencia) así como del material lignocelulósico tratado y su contenido inicial de compuestos fenólicos (Moure *et al.*, 2017).

Conclusión

El proceso de hidrólisis térmica logró liberar una mayor cantidad de azúcares en las muestras de uva y las muestras de granada, comparadas con las iniciales. La liberación de reductores indica que el proceso de termo-hidrólisis como pretratamiento logra remover la lignina vegetal y dar disponibilidad para los azúcares presentes.

El tiempo del proceso y el tamaño de partícula tienen un factor determinante en el proceso de hidrólisis. Queda claro que el tiempo de exposición es una variante para considerar en el futuro, sobre todo si se desea llegar a mayores concentraciones en la extracción de azúcares de residuos agroindustriales.

Agradecimientos

La autora Mariela Chávez García, agradece al CONACYT por la beca otorgada durante sus estudios de

author Armando Robledo Olivo thanks the Antonio Narro Agrarian Autonomous University for supporting internal research projects.

postgrado. El autor Armando Robledo Olivo, agradece a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por el apoyo otorgado a través de los proyectos internos de investigación.

References

- Álvarez, C., Reyes-Sosa, F. M. and Díez, B. (2016). Enzymatic hydrolysis of biomass from wood. *Microbial biotechnology*, 9(2): 149-156. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12346>
- Blanco, L. I., Blanco, E. A. and Rodríguez, R. (2017). Oxidación Microbiana del Glicerol por Microorganismos Termotolerantes Aislados de Noreste de México. *Revista de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina*. III Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina I Simposio Nacional de Microbiología Aplicada <http://www.rcfb.uanl.mx/index.php/rcfb/article/view/34/34>
- Castro Granado, A. J. (2018). Estudio bibliográfico del estado del arte de la digestión anaerobia de residuos sólidos orgánicos y mejora del proceso mediante pretratamientos (Tesis de Licenciatura), Universidad de Cádiz, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales. Puerto Real, Cádiz. <http://hdl.handle.net/10498/20924>
- Rodrigues Dos Santos Rocha, M. S., Pratto, B., De Sousa Júnior, R., Garcia Almeida, R. M. R. and Goncalves da Cruz, A. J. (2017). A kinetic model for hydrothermal pretreatment of sugarcane straw. *Tecnología Bioambiental*, 228: 176-185. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.087>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebersy, P. t. and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3): 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Financial-Tribune. (2016). Pomegranate Production Estimated at Over 1m Tons. *Financial Tribune*. <https://financialtribune.com/articles/economy-domestic-economy/53155/pomegranate-production-estimated-at-over-1m-tons> [Last Checked: April 4th 2020].
- Grajales Martínez, A. F., Tello Aragón, J. P. and Verdugo Reátiga, O. (2018). Diseño de un proceso para el aprovechamiento de los residuos orgánicos generados en el proceso de extracción de la pulpa de Fruta Pontificia Universidad Javeriana]. <http://vitela.javerianacali.edu.co/handle/11522/10884> [Last Checked: April 4th 2020].
- Jiménez Islas, D., Abreu Corona, A., López y López, V. E., Tellez Jurado, A. and Gracida Rodríguez, J. N. (2012). Obtención de azúcares fermentables mediante hidrólisis ácida de *Beta vulgaris* L. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 28(2): 151-158. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992012000200006
- Kapoor, M., Semwal, S., Sattlewal, A., Christopher, J., Gupta, R. P., Kumar, R., Puri, S. K. and Ramakumar, S. S. V. (2019). The impact of particle size of cellulosic residue and solid loadings on enzymatic hydrolysis with a mass balance. *Fuel*, 245: 514-520. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.02.094>
- Kumar, A. K., & Sharma, S. (2017). Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. *Bioresources and bioprocessing*, 4, 7. <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0137-9>
- Mejías-Brizuela, N., Orozco-Guillén, E. and Galáan-Hernández, N. (2016). Aprovechamiento de los residuos agroindustriales y su contribución al desarrollo sostenible de México. *Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales*, 2(6): 27-41. http://ecorfan.org/spain/researchjournals/Ciencias_Ambientales_y_Recursos_Naturales/vo2num6/Revista_de_Ciencias_Ambientales_y_Recursos_Naturales_V2_N6_4.pdf
- Mestries, F. (2015). Los posibles impactos de la biotecnología en la agricultura mexicana. *Sociológica México* (13) 5. <http://www.sociologiamexico.azc.uam.mx/index.php/Sociologica/article/view/924>
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3): 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Moldes, A. B., Cruz, J. M., Domínguez, J. M. and Parajó, J. C. (2002). Production of a cellulosic substrate susceptible to enzymatic hydrolysis from prehydrolyzed barley husks. *Agricultural and Food Science in Finland*, 11(1): 51-58. <http://urn.fi/URN:NBN:fi-fe201604069163>

- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. sci. technol.*, 26(2): 211-219. <http://rdo.psu.ac.th/sjstweb/journal/26-2/07-DPPH.pdf>
- Moure, A., Garrote, G. and Domínguez, H. (2017). Effect of Hydrothermal Pretreatment on Lignin and Antioxidant Activity. In Ruiz H., Hedegaard Thomsen M., & Trajano, H. (Eds.), *Hydrothermal Processing in Biorefineries*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56457-9_2
- Petrović, J., Perišić, N., Maksimović, J. D., Maksimović, V., Kragović, M., Stojanović, M., Laušević, M. and Mihajlović, M. (2016). Hydrothermal conversion of grape pomace: Detailed characterization of obtained hydrochar and liquid phase. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 118: 267-277. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2016.02.010>
- Polachini, T. C., Mulet, A., Telis-Romero, J. and Cárcel, J. A. (2019). Influence of high-intensity ultrasound application on the kinetics of sugar release from acid suspensions of artichoke (*Cynara scolymus*) biomass. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*, 145: 107681. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2019.107681>
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación [SAGARPA]. (2017). Uva Mexicana. In SAGARPA (Ed.), *Planeación Agrícola Nacional 2017-2030* (pp. 1-16). <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257085/Potencial-Uva.pdf>
- Saval, S. B. (2012). Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro. *BioTecnología*, 16(2): 14-46. https://smbb.mx/wp-content/uploads/2017/10/Revista_2012_V16_n2.pdf
- Shahbandeh, M. (2019). *Global grape production 2012/13-2018/19*. <https://www.statista.com/statistics/237600/world-grape-production-in-2007-by-region/> [Last Checked: April 4th 2020].
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP]. (2018). *Anuario Estadístico de la Producción Agrícola* <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> [Last Checked: April 4th 2020].
- Sun, S., Sun, S., Cao, X. and Sun, R. (2016). The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. *Bioresource technology*, 199: 49-58. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.061>
- Zietsman, A. J. J., Moore, J. P., Fangel, J. U., Willats, W. G. T. and Vivier, M. A. (2017). Combining hydrothermal pretreatment with enzymes de-pectinates and exposes the innermost xyloglucan-rich hemicellulose layers of wine grape pomace. *Food Chemistry*, 232: 340-350. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.015>