

SACARIFICACIÓN DE RESIDUOS INDUSTRIALES DE PIÑA CON MEZCLAS DE ENZIMAS COMERCIALES

Claudia Conesa¹, Lucía Seguí¹, Pedro Fito¹

RESUMEN

Los residuos industriales de la piña son una alternativa de bajo coste para la producción de bioetanol. Este desecho contiene azúcares simples fermentables (glucosa, fructosa y sacarosa) y cantidades significativas de celulosa y de hemicelulosa potencialmente hidrolizables. En el presente trabajo se ha estudiado la hidrólisis enzimática con celulasas y hemicelulasas comerciales producidas por los hongos *Aspergillus niger* y *Trichoderma reesei*. Previo a la sacarificación, la biomasa se trituró, se esterilizó en autoclave (121°C - 20 min), y se ajustó el pH a 5 con Ca(OH)₂. El tratamiento se realizó a 40 °C, empleando celulasas producidas por *A. niger* o *T. reesei* a concentraciones de 0, 0.1, 0.2 y 0.4% (p/p) en combinación con las mismas concentraciones de hemicelulasa de *A. niger*. Los sólidos solubles totales (°Brix) y el pH de las muestras se determinaron a lo largo del proceso. El perfil de azúcares se analizó al principio y al final del tratamiento mediante cromatografía líquida de intercambio iónico. Los resultados mostraron que la hidrólisis concluía a las 24 horas de tratamiento enzimático. El empleo de Ca(OH)₂ y de enzimas hidrolíticas incrementaron la concentración de azúcares fermentables en el residuo hidrolizado y favorecieron la aparición de nuevos azúcares como la arabinosa, la xilosa y la celobiosa. Se demostró que la adición de celulosa de cualquier tipo tiene un mayor poder hidrolítico sobre el residuo lignocelulósico que la hemicelulasa, y que ésta última favorece la acción de las celulasas. Se obtuvo un mayor contenido en azúcares fermentables y en azúcares totales para 0.4% de hemicelulasa y de celulosa de *T. reesei*., aunque no se encontraron diferencias significativas entre ésta y otras combinaciones en las que se utilizaron menores concentraciones. Por ello se recomienda el empleo de 0.4% de celulosa de *A. niger* y de 0.1% de hemicelulasa.

Palabras clave: valorización de residuos, piña, sacarificación, hidrólisis enzimática, bioetanol.

RESUM

Els residus industrials de la pinya són una alternativa de baix cost per a la producció de bioetanol. Aquests residus contenen sucres simples fermentables (glucosa, fructosa i sacarosa) i quantitats significatives de cel·lulosa i de hemicel·lulosa potencialment hidrolitzables. En el present treball s'estudia la hidròlisi enzimàtica amb cel·lulases i hemicel·lulases comercials produïdes pels fongs *Aspergillus niger* i *Trichoderma reesei*. Previ a la sacarificació, la biomassa es va triturar, es va esterilitzar en autoclau (121 ° C - 20 min) i es va ajustar el pH a 5 amb Ca(OH)₂. El tractament es va realitzar a 40°C, emprant cel·lulases produïdes per *A. niger* o *T. reesei* a concentracions de 0, 0.1, 0.2 i

¹Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo- Universitat Politècnica de Valencia. Camino de Vera s/n. 46022- Valencia (España).

0.4% (p/p) en combinació amb les mateixes concentracions de hemicel·lulasa de *A. niger*. Els sòlids solubles totals (°Brix) i el pH de les mostres es van determinar al llarg del procés. El perfil de sucres es va analitzar al principi i al final del tractament mitjançant cromatografia líquida d'intercanvi iònic. Els resultats van mostrar que la hidròlisi conclouia a les 24 hores de tractament enzimàtic. L'ús de Ca(OH)_2 i d'enzims hidrolítics, van incrementar la concentració de sucres fermentables en el residu hidrolitzat i van afavorir l'aparició de nous sucres com la arabinosa, la xilosa i la celobiosa. Es va demostrar que l'addició de cel·lulasa de qualsevol tipus té un major poder hidrolític sobre el residu lignocel·lulòsic que la hemicel·lulasa i aquesta última, afavoreix l'acció de les cel·lulases. Es va obtenir un major contingut en sucres fermentables i en sucres totals per a 0.4% de hemicel·lulasa i de cel·lulasa de *T. reesei*, encara que no es van trobar diferències significatives entre aquesta i altres combinacions en què es van utilitzar menors concentracions. Per això es recomana l'ús de 0.4% de cel·lulasa de *A. niger* i de 0.1% de hemicel·lulasa.

Paraules claus: valoració de residus, pinya, sacarificació, hidròlisi enzimàtica, bioetanol.

ABSTRACT

Industrial pineapple wastes are a low-cost alternative for bioethanol production. This waste contains simple fermentable sugars (glucose, fructose, sucrose) and significant amounts of highly hydrolysable cellulose and hemicellulose. In this paper, enzymatic hydrolysis by commercial cellulases and hemicellulases produced by *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei* has been studied. Biomass was milled and sterilized in an autoclave (121°C – 20 min). The enzymatic hydrolysis was performed by adjusting the pH to 5 with Ca(OH)_2 at 40 °C. Saccharification was carried out using mixtures of 0, 0.1, 0.2 and 0.4% (w/w) cellulase from *A. niger* or *T. reesei* with the same content of hemicellulase from *A. niger*. Total soluble solids (°Brix) and pH of the samples were determined throughout the whole process. Sugar profile was analyzed at the beginning and end of the treatment by Ion Exchange Chromatography. The results showed that the hydrolysis concluded 24 hours after the enzymatic treatment. The use of Ca(OH)_2 and hydrolytic enzymes increased the concentration of fermentable sugars in the hydrolyzed waste and stimulated the appearance of new sugars, such as arabinose, xylose and cellobiose. It was proved that the addition of any kind of cellulase has a higher hydrolytic power in the lignocellulosic matrix than hemicellulase addition. Moreover, hemicellulase increases the cellulase action. It was obtained a higher content of fermentable and total sugars with 0.4% of hemicellulase and cellulase from *T. reesei*, although there were no significant differences between this one and other treatments. It is recommended the use of 0.4% of cellulase from *A. niger* and 0.1% of hemicellulase.

Keywords: waste valorization, pineapple, saccharification, enzymatic hydrolysis, bioethanol.

INTRODUCCIÓN

El consumo de energía ha aumentado considerablemente en el último siglo debido al incremento de la población mundial y a la industrialización de un mayor número de países (Sun y Cheng, 2002). Las reservas de combustibles fósiles son por lo tanto cada vez menores. El encarecimiento de los combustibles fósiles, los gases contaminantes causantes del cambio climático y la dependencia respecto a países extracomunitarios productores de energía, propician la búsqueda de alternativas más limpias y que puedan abastecer a generaciones futuras (Camps y Marcos, 2002).

Desde esta perspectiva, se ha fomentado la producción y el consumo de energías renovables, sostenibles y respetuosas con el medioambiente como la biomasa. La directiva 2003/30/CE define como biocarburante todo combustible líquido o gaseoso producido a partir de biomasa que puede utilizarse para alimentar los motores de combustión interna de los vehículos de transporte. Esta definición engloba, entre otros productos, al bioetanol. El bioetanol es un alcohol obtenido a partir de la fermentación de la materia orgánica, principalmente cereales, cultivos con alto contenido en azúcares y otros producidos específicamente para su obtención. En el proceso de fermentación de los azúcares se obtiene el alcohol hidratado, que tras su deshidratación se puede utilizar como combustible. Actualmente, el bioetanol es el biocombustible de mayor producción mundial (Demirbas, 2005; Lewis, 1996), pero su coste es más elevado que el de los combustibles fósiles (Berg, 2001).

El empleo de alimentos como fuente de obtención de bioetanol (bioetanol de primera generación) compite con el mercado mundial de alimentos con la consiguiente subida de los precios de los mismos. Este motivo ha suscitado que en las últimas dos décadas las investigaciones se hayan centrado en la búsqueda de nuevas fuentes de obtención de bioetanol más rentables, eficaces y menos perjudiciales para el medioambiente y la sociedad. Una alternativa es el uso de los residuos lignocelulósicos resultado de procesos agrícolas, forestales o industriales (Dale et al., 1984; Wright, 1998; Azzam, 1989; Cadoche y López, 1989; Reshamwala et al., 1995; Bjerre et al., 1996; Duff y Murray, 1996). Dentro de este grupo, se encuentran los residuos de industrialización de la piña, muy difíciles de degradar por sus altas demandas bioquímicas y químicas de oxígeno (DBO y DQO) y que pueden suponer hasta un 80% de la materia prima procesada (Muttamara y Nirmala, 1982; Tewari et al., 1987). En los últimos años, se ha conseguido obtener bioetanol y biometanol a partir de los residuos de la piña por ser éstos ricos en azúcares, almidón y hemicelulosa (Nigam, 2000; Tanaka et al., 1999).

La celulosa es un polímero lineal de monómeros de D-glucosa que se unen por enlaces β -1,4-O-glucosídicos (McKendry, 2002). Las moléculas de celulosa se unen formando moléculas más largas conocidas como protofibrillas que se empaquetan en unidades mayores denominadas microfibrillas. Las estructuras fibrilares están estabilizadas lateralmente por puentes de hidrógeno entre grupos hidroxilo intra e intermoleculares y todos los átomos de carbono están fijados en una posición concreta respecto a los otros. Las regiones donde las microfibrillas presentan una estructura altamente ordenada se llaman regiones cristalinas y las regiones con una estructura menos ordenada se denominan amorfas, por ello la celulosa se considera un polímero semicristalino. Cuanto más ordenada y cristalina es la celulosa resulta menos soluble y más difícil de

hidrolizar (Zhang y Lynd, 2004; Laureano-Pérez et al., 2005). La hemicelulosa, en cambio es un polímero complejo de hetropolisacáridos formado por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa), hexosas como la D-glucosa y ácidos urónicos. La cadena principal recibe el nombre de xilano: polímero de xilasas unidas por enlaces β -1,4, sustituidos con residuos del ácido α -D-glucurónico y de α -L-arabinosa, fácilmente hidrolizables (Fengel y Wegener, 1984).

Para producir bioetanol a partir de dichos residuos, sería recomendable hidrolizar la celulosa y la hemicelulosa a azúcares fermentables (Balat et al., 2008; Sánchez, 2008). Este tratamiento recibe el nombre de sacarificación o hidrólisis y puede ser de dos tipos: ácida o enzimática (Balat et al., 2008). La hidrólisis ácida es menos costosa y más rápida que la enzimática, sin embargo es necesario eliminar el ácido residual porque puede producir compuestos tóxicos que inhiben la posterior fermentación de los azúcares a etanol (Sun y Cheng, 2002; Hendriks y Zeeman, 2008; Rubin, 2008). Además, el ácido sulfúrico empleado durante la sacarificación puede degradar las moléculas de glucosa liberadas durante la hidrólisis (Sánchez, 2008).

Actualmente se propone el uso de enzimas segregadas por hongos filamentosos para la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos como son: las celulasas, que engloban un conjunto de enzimas que hidrolizan la celulosa cristalina a pequeños oligosacáridos y posteriormente a glucosa; y las hemicelulasas, que hidrolizan la hemicelulosa a azúcares monoméricos (Krogh et al., 2004; Wen et al., 2005; Sehnem et al., 2006; Goyal et al., 1991). La celulasa fúngica consta de tres compuestos enzimáticos principales: 1) endoglucanasas (EC 3.2.1.4) que hidrolizan al azar enlaces glicosídicos en regiones amorfas de la celulosa generando oligosacáridos, lo que causa la disminución en la longitud de las cadenas y un incremento de los azúcares reductores, 2) celobiohidrolasas o exoglucanasas (EC 3.2.1.74) que actúan sobre los extremos no-reductor y reductor de las cadenas de celulosa liberando glucosa o celobiosa, y 3) β -glucosidasas (EC 3.2.1.21) que hidrolizan la celobiosa, no fermentable, en glucosa (Goyal et al., 1991). Entre las hemicelulasas fúngicas destacan las enzimas hidrolíticas del xilano como la xilanasas y la β -xilosidasa que rompen la cadena principal (Shallom y Shoham, 2003) y enzimas que rompen las ramificaciones como las α -L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55), α -D-glucuronosidasas, acetixilano esterases, ferúlico esterases y β -galactosidasas (Saha, 2003).

Los hongos filamentosos capaces de producir enzimas hidrolíticas son: *Sclerotium rolfsii*, *P. chrysosporium* y especies de *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* y *Penicillium* (Sternberg, 1976; Fan et al., 1987; Duff y Murray, 1996). Las enzimas producidas por el hongo *Trichoderma reesei* son las mejor caracterizadas y es por ello que se usan a menudo para la sacarificación enzimática de materiales lignocelulósicos (Esterbauer et al., 1991). No obstante, en el caso de la obtención de bioetanol a partir de los residuos industriales de la piña, los estudios se han decantado por el empleo de celulasa y hemicelulasa provenientes de *Aspergillus niger* (Ban-Koffi y Han, 1990).

El objetivo principal del presente trabajo es caracterizar la acción de las celulasas y de las hemicelulasas procedentes de *Trichoderma reesei* y de *Aspergillus niger* en el proceso de sacarificación de los residuos de industrialización de la piña para la obtención de bioetanol.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

Las piñas (*Ananas comosus*) utilizadas en el presente trabajo fueron de la variedad de cultivo MD-2 conocida comúnmente como Extra Sweet o Golden Sweet. La selección de los frutos se basó en aspectos externos tales como la ausencia de defectos, el estado de madurez y el peso (alrededor de 1.3 Kg).

Obtención de la muestra

Para la obtención de la muestra utilizada en los experimentos, se prosiguió de la siguiente manera. En primer lugar se eliminó la corona con ayuda de un cuchillo. Posteriormente se separó la corteza y el corazón de la pulpa utilizando un cortador de piñas (GEFU). Una vez obtenido el material que correspondería al desecho o subproducto, se troceó en partes más pequeñas para facilitar su posterior triturado con una batidora americana (Solac Professional Mixer 1000 W Inox.). A continuación se ajustó el pH de cada uno de las muestras a pH 5 mediante la adición de $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Finalmente, el subproducto tratado se vertió en frascos de vidrio y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Tras su esterilización, los botes se mantuvieron en congelación a -22 °C hasta la realización de los experimentos.

Caracterización del subproducto triturado

Se determinaron el pH mediante un pHmetro digital (Mettler Toledo Inlab), los sólidos solubles totales (°Brix), con un refractómetro de mesa ABBE ATAGO 3T termostatado a 20 °C según el método ISO 1743:1982 y los azúcares presentes en la fase líquida de la materia prima triturada mediante Cromatografía Líquida de Intercambio Iónico (716 Compact IC Metrohm, columna Metrosep Carb 1 250/4,6 (250 mmLx 4,6 mmID) y 100 mM NaOH (1 ml/minuto) como fase móvil. Para la determinación de azúcares, la fase líquida se filtró a través de un filtro de nailon de 0,45µm y se prepararon diluciones 1:2000 con agua bidestilada (milliQ). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. Para la cuantificación del contenido en azúcares en el subproducto se emplearon como patrones glucosa (pureza ≥99.5%), fructosa (pureza ≥99%) y sacarosa (pureza ≥99.5%), por ser éstos los azúcares esperables en el material analizado, preparados en diluciones de 2.5, 5, 10, 15, 25 y 50 ppm. La lectura de los cromatogramas se realizó mediante el programa ICnet 2.0 (Metrohm).

Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática se llevó a cabo combinando concentraciones de 0, 0.1, 0.2 y 0.4% (p/p) de hemicelulasa producida por *A. niger* (1,5 U/mg de sólido, Sigma-Aldrich, Co) con celulasa proveniente de *A. niger* (1,13 U/mg de sólido, Sigma-Aldrich, Co) o de *T. reesei* (6 U/mg de sólido, Sigma-Aldrich, Co), ambas en concentraciones de 0, 0.1, 0.2 y 0.4% (p/p). Cada combinación de enzimas se añadió a 50 g de residuo descongelado de piña en vasos de precipitado de 100 mL. La mezcla se llevó a incubación en estufa a 40°C

durante 24 horas. Se realizaron dos repeticiones para cada combinación de enzimas.

Estudio cinético de la hidrólisis de la celulosa y de la hemicelulosa

Para cada tratamiento se midieron los sólidos solubles (°Brix) y el pH a lo largo del experimento, a intervalos de una hora durante las siete primeras horas de tratamiento y a las 24 horas, correspondiéndose este tiempo con el final de la hidrólisis enzimática. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

Caracterización del hidrolizado final

Además del pH y de los sólidos solubles (°Brix), obtenidos durante el estudio cinético, se determinó el perfil de azúcares (cromatografía líquida de IC) en las muestras hidrolizadas a las 24 horas de sacarificación. A partir de los cromatogramas obtenidos, se decidió realizar rectas patrón con diluciones de 50, 25, 15, 10, 5 y 2.5 ppm de los siguientes azúcares: arabinosa ($\geq 98\%$), glucosa ($\geq 99.5\%$), xilosa ($\geq 99\%$), fructosa ($\geq 99\%$), sacarosa ($\geq 99.5\%$) y celobiosa ($\geq 98\%$).

Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los resultados se realizó mediante el programa Statgraphics Centurion XV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización del subproducto triturado

En la tabla 1, se resumen los principales parámetros medidos en el residuo triturado de la piña antes y después de ajustar el pH para su posterior hidrólisis enzimática. Según puede observarse, los residuos de piña contienen los siguientes azúcares fermentables: glucosa, fructosa y sacarosa. Estos valores se asemejan a los encontrados en bibliografía para los residuos de la industrialización de la piña: glucosa (3.1% p/p), fructosa (3.4% p/p) y sacarosa (5.2% p/p) (Ban-Koffi y Han, 1990). Además, son equiparables al contenido en glucosa (3.8 y 1.0% p/p), fructosa (2.0 y 1.1% p/p) y sacarosa (1.6 y 16.5% p/p) de la paja de arroz (Shinozaki y Kitamoto, 2011) y de la caña de azúcar (Shiroma et al, 2012) respectivamente, principales subproductos estudiados actualmente para la producción de bioetanol (Sakar et al, 2012). Por lo tanto, se puede decir que los residuos de la industria de la piña son una fuente potencial de obtención de bioetanol de bajo coste (Nigam, 1999). Por otro lado, se aprecia que la adición de hidróxido de calcio además de aumentar el pH, incrementa también la cantidad de sólidos solubles totales. Esto último se debería a que el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ es una base fuerte que permite romper una parte de la lignina y solubilizar una fracción de los sólidos presentes en la matriz lignocelulósica (Balat, 2011).

TABLA 1. Caracterización de los residuos de industrialización de la piña triturados y esterilizados, antes y después del ajuste de pH con hidróxido de calcio^a.

Parámetro	Valor
pH	3.63 ± 0.01
SST	10.2 ± 0.3 (°Brix)
pH después de ajustar pH	4.92 ± 0.02
SST después de ajustar pH	10.6 ± 0.2
Glucosa	27 ± 2 g/L (2.65% ± 0.18 p/p)
Fructosa	22 ± 2 g/L (2.13% ± 0.19 p/p)
Sacarosa	20 ± 3 g/L (2.0% ± 0.2 p/p)

^a Media ± SD (Desviación estándar) de dos repeticiones medidas por duplicado.

Estudio cinético de la hidrólisis de la celulosa y la hemicelulosa

En la figuras 1 y 2 se presentan, respectivamente, la evolución de los sólidos solubles totales (°Brix) y el pH para todas las combinaciones ensayadas. Para todos los tratamientos estudiados se observa que la velocidad de la hidrólisis enzimática es mayor durante las dos primeras horas de sacarificación, y que disminuye durante las horas posteriores hasta alcanzar un valor prácticamente nulo a las 24 horas de tratamiento enzimático. La hidrólisis enzimática concluye aproximadamente a las 24 horas de tratamiento, lo que se debe a un agotamiento del sustrato fácilmente disponible para las enzimas y sugeriría la necesidad de utilizar pretratamientos al material lignocelulósico para incrementar la acción enzimática (Hendricks y Zeeman, 2009).

Se observa que incluso sin tratar enzimáticamente la biomasa se produce un ligero aumento de los sólidos solubles totales durante las 24 horas de incubación. Este fenómeno de hidrólisis de la matriz lignocelulósica puede deberse a la acción hidrolítica del Ca(OH)₂ mencionada anteriormente.

El incremento en sólidos solubles totales es mayor cuando se añaden enzimas fúngicas al triturado inicial y se obtienen diferencias significativas entre el contenido de sólidos solubles de la biomasa sin tratar y la biomasa tratada enzimáticamente, exceptuando con el tratamiento 0% de hemicelulasa y 0.1% de celulasa de *A. niger* (12.3 °Brix).

En la figura 1 se observa que para una concentración de hemicelulasa constante, un aumento en la concentración de celulasa fúngica tanto de *A. niger* como de *T. reesei*, produce un aumento de sólidos solubles totales. No obstante, esto no ocurre cuando se utilizan concentraciones de 0.2% ó 0.4% de celulasa procedente de *T. reesei* y 0.4 % de hemicelulasa. Este fenómeno se discutirá más adelante. Para un mismo origen de celulasa y para igual concentración de la misma, la adición de una concentración creciente de hemicelulasa provoca un aumento de los sólidos solubles totales y de la velocidad de reacción. Sin embargo, este incremento es menor que el provocado por la adición de la misma concentración de celulasa de cualquier tipo a pesar de que el contenido en hemicelulosa de los residuos de la piña es mayor (20.2% p/p) que el de la celulosa (14.0% p/p) y que el de la lignina (1.5% p/p) (Ban-Koffi y Han, 1990). A este respecto, conviene recordar que la celulasa hidroliza las cadenas de celulosa mientras que la hemicelulasa hidroliza la hemicelulosa y favorece la hidrólisis de la celulosa aumentando la accesibilidad del sistema celulolítico a las fibras de celulosa (Berlin et al., 2005), lo que vendría a justificar el mayor efecto hidrolítico de la celulasa de cualquier origen que el de la hemicelulasa.

Teniendo en cuenta ambas celulasas, la mayor producción de sólidos solubles totales se obtiene para la combinación 0.4% de celulasa de *T. reesei* y 0.4% de hemicelulasa (15°Brix), siendo este resultado estadísticamente superior al obtenido con cualquier otra combinación u origen de las celulasas. En general, la adición de una misma cantidad de celulasa procedente de *T. reesei* en comparación con celulasa procedente de *A. niger*, produce un mayor incremento de los sólidos solubles en el hidrolizado final. Esto se explicaría por la mayor efectividad que tiene la celulasa de *T. reesei* en la degradación de la celulosa nativa y cristalina con respecto a otras enzimas fúngicas (Ovando-Chacón, 2005). No obstante, para 0.4% de hemicelulasa no existen diferencias estadísticamente significativas entre la adición de 0.4% de celulasa procedente de *A. niger* o la misma concentración de celulasa producida por *T. reesei*.

Con respecto al pH (figura 2), se constata que a medida que avanza la hidrólisis enzimática, el pH disminuye en todos los casos. El pH se reduce intensamente durante las dos primeras horas de la sacarificación y se estabiliza a las 24 horas de tratamiento. Estos resultados coinciden con los observados para la evolución de los sólidos solubles. Existe por lo tanto una relación entre el aumento de los sólidos solubles y la disminución del pH. A medida que avanza el proceso de sacarificación, se produce la hidrólisis de la celulosa y de la hemicelulosa con la consiguiente liberación de azúcares, como se verá posteriormente, fenómeno que contribuye al aumento de la acidez del hidrolizado y por lo tanto a la disminución del pH.

En general, se observa que la adición de una cantidad creciente de hemicelulasa no tiene efecto sobre la variación de pH. Por el contrario la adición de una mayor concentración de celulasa de cualquier origen lo disminuye. Esto se explicaría por el mayor efecto de la celulasa en la sacarificación que de la hemicelulasa. La mayor disminución de pH se obtiene al utilizar 0.1% de celulasa de *A. niger* y 0.4% de hemicelulasa, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre éste y los siguientes tratamientos: 0.2% de celulasa de *A. niger* y 0% ó 0.4% de hemicelulasa y 0.4% de celulasa de *A. niger* y 0% ó 0.2% de hemicelulasa.

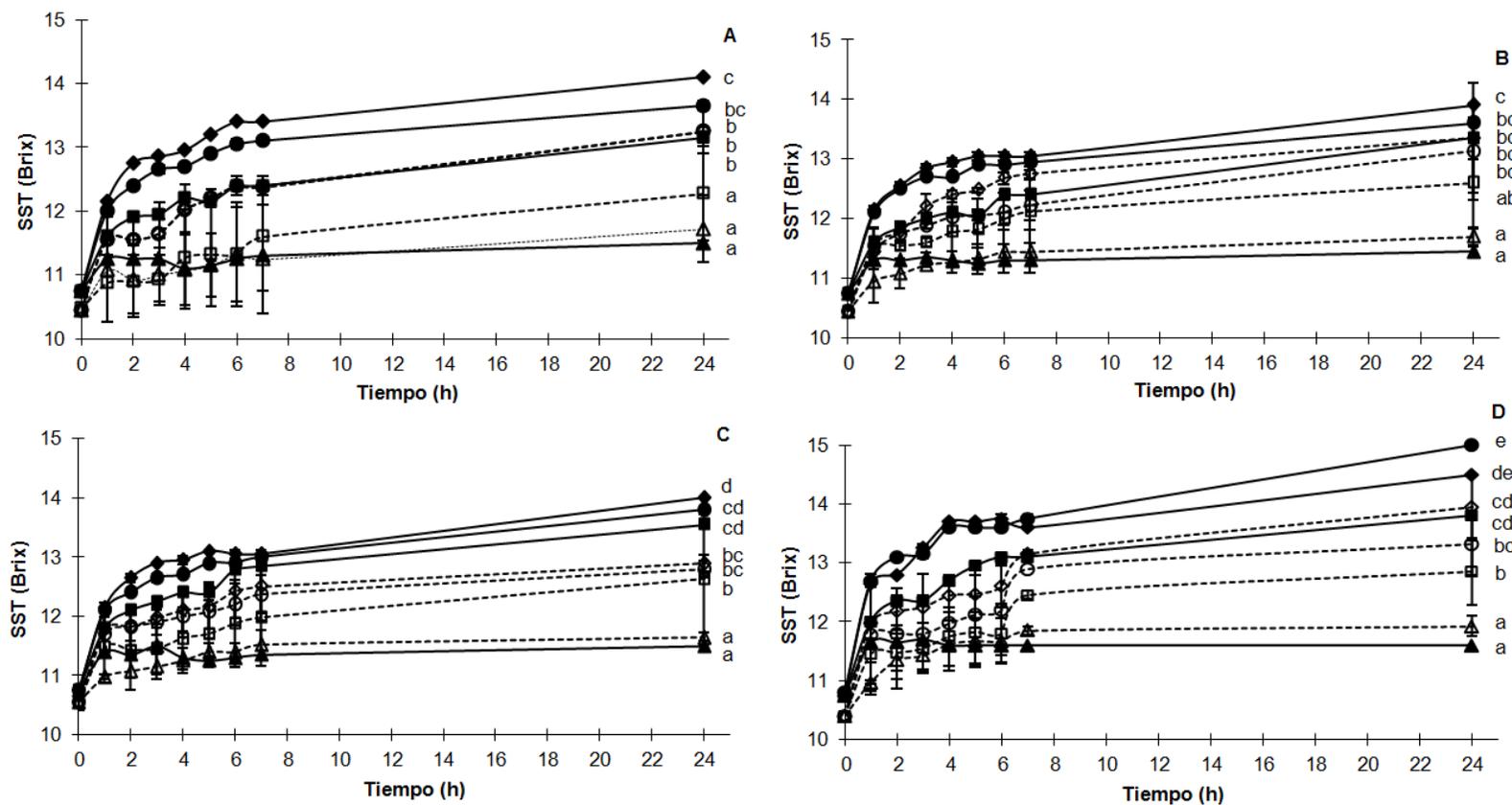


FIGURA 1. Evolución de los sólidos solubles totales durante las 24 horas de tratamiento enzimático con diferentes combinaciones de celulasa procedente de *A. niger* o *T. reesei* y hemicelulasa procedente de *A. niger*. En cada gráfico se incluyen los resultados obtenidos para una misma concentración de hemicelulasa y distintas concentraciones de celulasa. **A:** 0% de hemicelulasa, **B:** 0.1% de hemicelulasa, **C:** 0.2% de hemicelulasa y **D:** 0.4% de hemicelulasa. Letras minúsculas similares indican grupos estadísticamente homogéneos con un nivel de confianza del 95%. Símbolos: ▲, 0% de celulasa; ■, 0.1% de celulasa; ●, 0.2% de celulasa; ◆, 0.4% de celulasa. Trazo de la línea quebrado y símbolo sin relleno: celulasa producida por *A. niger*; trazo de la línea sólido y símbolo con relleno: celulasa producida por *T. reesei*.

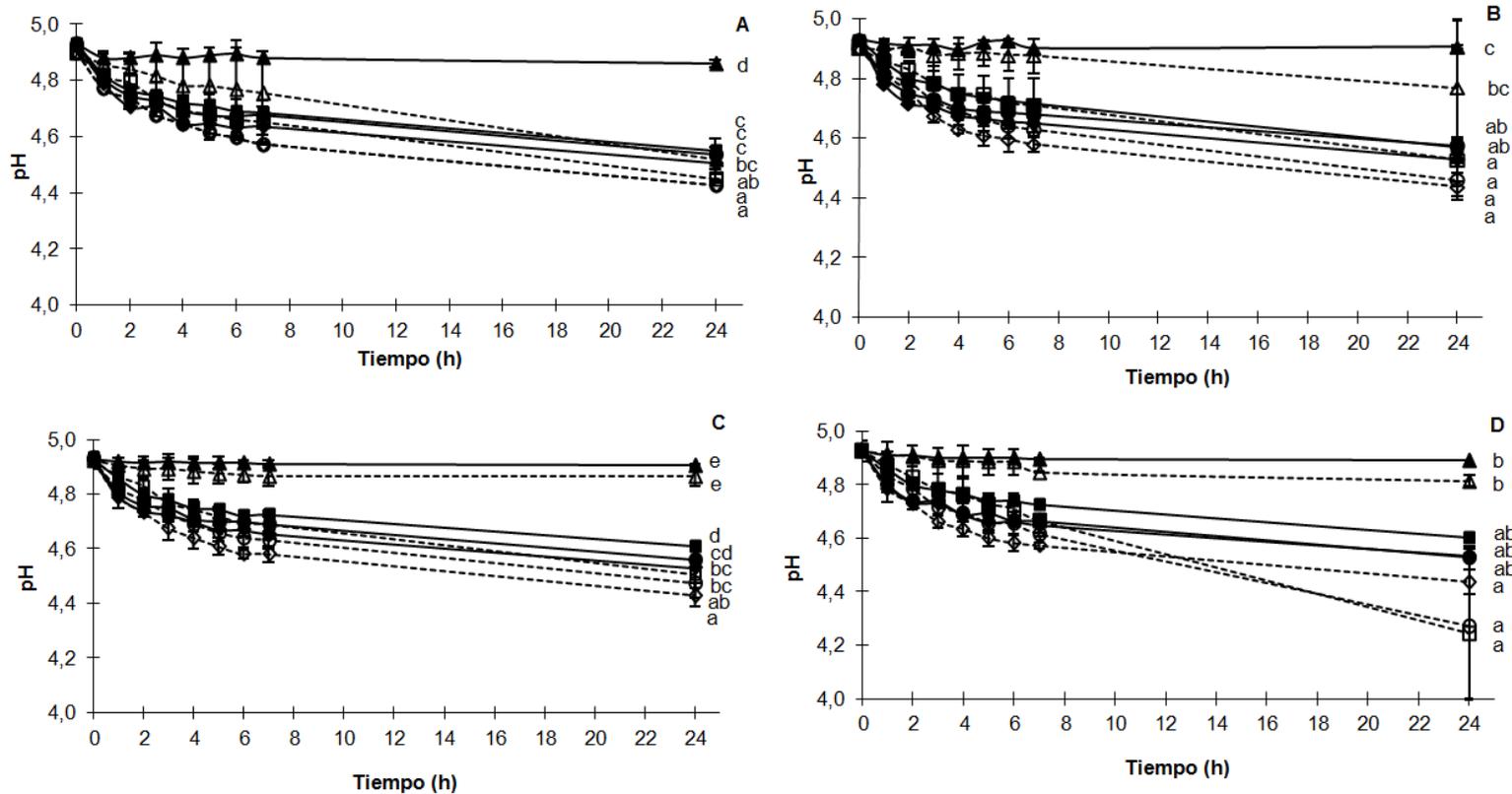


FIGURA 2. Evolución del pH durante las 24 horas de tratamiento enzimático con diferentes combinaciones concentraciones de celulasa procedentes de *A. niger* o *T. reesei* y hemicelulasa procedente de *A. niger*. En cada gráfico se incluyen los resultados obtenidos para una misma concentración de hemicelulasa y distintas concentraciones de celulasa. **A:** 0% de hemicelulasa, **B:** 0.1% de hemicelulasa, **C:** 0.2% de hemicelulasa y **D:** 0.4% de hemicelulasa. Letras minúsculas similares indican grupos estadísticamente homogéneos con un nivel de confianza del 95%. Símbolos: ▲, 0% de celulasa; ■, 0.1% de celulasa; ●, 0.2% de celulasa; ◆, 0.4% de celulasa. Trazo de la línea quebrado y símbolo sin relleno: celulasa producida por *A. niger*; trazo de la línea sólido y símbolo con relleno: celulasa producida por *T. reesei*.

Perfil de azúcares del hidrolizado final.

Los azúcares presentes en el hidrolizado final (40 °C – 24 h) se identificaron y cuantificaron a través de los cromatogramas obtenidos a partir de las diluciones de la fase líquida de cada una de las muestras sacarificadas. En la figura 3 se presentan distintos cromatogramas correspondientes a (A) una muestra a la que no se han adicionado enzimas (B) una muestra sacarificada y (C) una muestra que contiene los diversos azúcares patrón (arabinosa, glucosa, xilosa, fructosa, sacarosa y celobiosa). Según puede observarse, a los azúcares presentes en la muestra original (glucosa, fructosa y sacarosa), se suman otros tres azúcares que fueron identificados como arabinosa, xilosa y celobiosa, mediante el cromatograma patrón. La aparición de dichos azúcares se debe a que son, junto con la glucosa, la fructosa y la sacarosa, los azúcares principales que constituyen la celulosa y la hemicelulosa y es consecuencia de la hidrólisis producida por las enzimas, según se ha descrito en la introducción.

Los resultados correspondientes a cada una de las muestras incubadas en estufa durante 24 h, para las distintas concentraciones de enzimas ensayadas, se muestran en la tabla 2. Según puede verse en la tabla, los valores de glucosa, fructosa y sacarosa del triturado sin tratamiento enzimático son muy similares a los del triturado inicial (tabla 1) aunque se constata una disminución del contenido en glucosa y un aumento del contenido en fructosa y sacarosa. En términos generales hay un ligero aumento de los azúcares fermentables cuando se incuba el producto triturado, aun sin adicionar enzimas. Este resultado concuerda con el pequeño incremento de sólidos solubles y el ligero descenso de pH registrado sin tratamiento enzimático, debido, como se ha citado anteriormente, al efecto hidrolítico del Ca(OH)_2 sobre la matriz lignocelulósica.

Analizando el efecto de la sacarificación en función de las distintas mezclas de enzimas empleadas, se observa que para una misma cantidad de celulosa, la adición de cantidades crecientes de hemicelulasa produce un ligero aumento de la concentración final de los azúcares arabinosa y xilosa (tabla 2). La aparición de arabinosa en el hidrolizado final se debe a la acción de la α -L-arabinofuranosidasas que es una exo-hidrolasa que interviene en la remoción de los residuos terminales de α -L-arabinofuranosilo no reductores de la hemicelulosa (Sozzi y Civello, 2005). En el caso de la xilosa, hay dos enzimas implicadas en la hidrólisis de la hemicelulasa: las β -D-xilosidasas (EC 3.2.1.37), enzimas con actividad exo capaces de hidrolizar los enlaces terminales β -1,4 entre residuos de xilosa del extremo no reductor del xilano; y las Endo- β -1,4-D-xilanasas (EC 3.2.1.8), también conocidas como xilanasas, responsables de la hidrólisis interna de los enlaces β -1,4 entre residuos de la xilosa que forman parte del xilano (Cleemput et al., 1997). Por otro lado, para una misma cantidad de hemicelulasa, un aumento en la concentración de celulosa de cualquier origen, produce un incremento de la concentración de arabinosa y de xilosa en el hidrolizado final aunque no se observan diferencias significativas. Cabe destacar que, si no se adiciona celulosa al triturado, no se detecta ni arabinosa ni xilosa al final del tratamiento enzimático sea cual sea la cantidad de hemicelulasa añadida. Por lo tanto, parece necesario hidrolizar previamente la celulosa para favorecer la acción de la hemicelulasa. Se deduce que no sólo la hemicelulasa es necesaria en la hidrólisis de la hemicelulosa, sino que también la celulosa juega un papel fundamental.

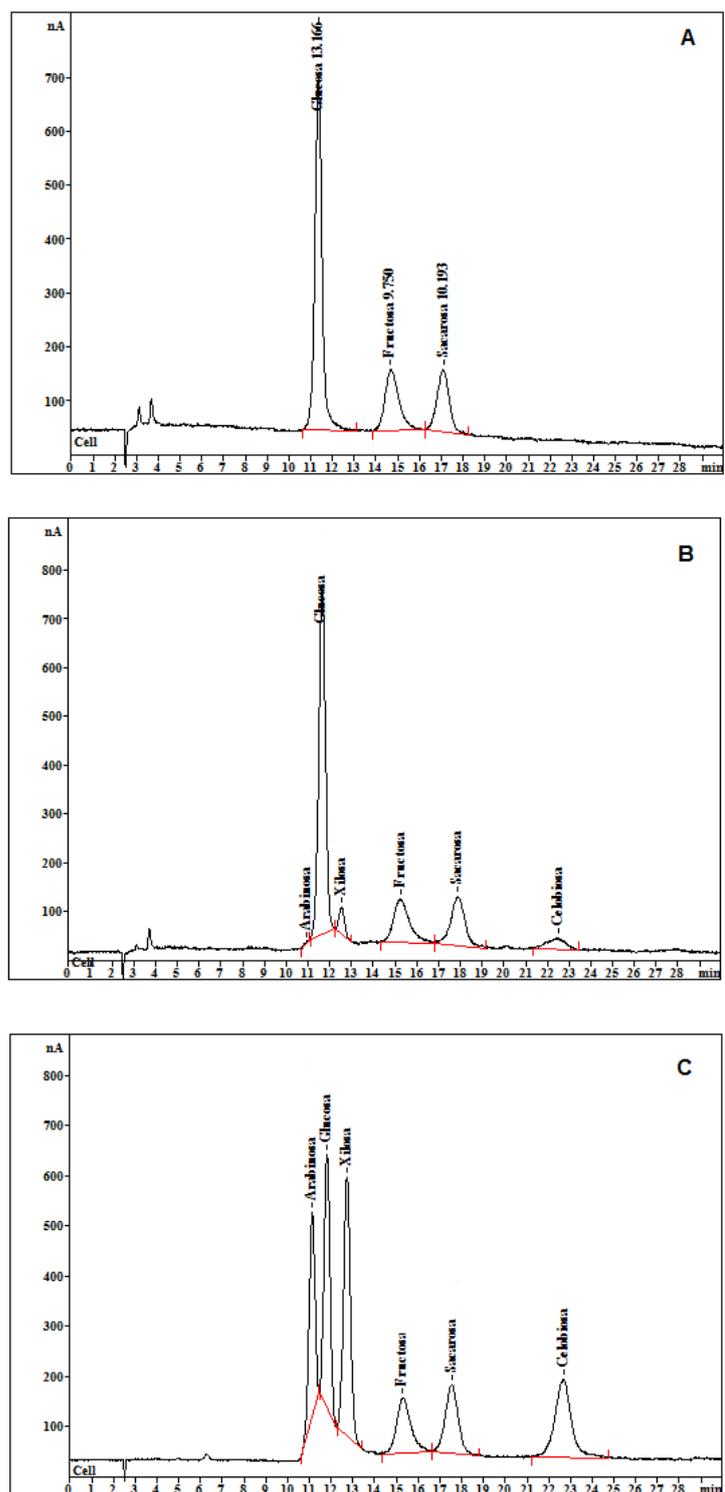


FIGURA 3. Cromatogramas obtenidos por cromatografía de intercambio iónico. A: Cromatograma de una muestra sin tratar enzimáticamente después de 24 horas de incubación a 40°C (dilución 1:2000). B: Cromatograma del tratamiento con celulasa procedente de *T. reesei* al 0.2% y de hemicelulasa de *A. niger* al 0.4% tras 24 horas de incubación a 40°C (dilución 1:2000). C: Cromatograma patrón de arabinosa, glucosa, xilosa, fructosa, sacarosa y celobiosa a 15 ppm.

En la tabla 2 se observa que para cualquier tipo de celulasa se obtiene una mayor concentración de xilosa que de arabinosa, debido a que la xilosa es el constituyente principal de la cadena lineal del xilano (Fengel y Wegener, 1984). La máxima producción de arabinosa tiene lugar cuando se utiliza 0.4% de celulasa y 0.4% de hemicelulasa procedente de *A. niger* (1.4 g.L^{-1}), aunque no existen diferencias estadísticamente significativas entre este tratamiento y concentraciones de celulasa del 0.2% y de hemicelulasa del 0.1, 0.2 ó 0.4% y para 0.4% de celulasa y cualquier concentración de hemicelulasa de *A. niger*. No obstante, la mayor concentración de xilosa se obtiene para 0.4% de celulasa de *T. reesei* y 0.4% de hemicelulasa (3.2 g.L^{-1}), sin diferencias estadísticamente significativas con 0.2% de celulasa de *T. reesei* y 0.2 y 0.4% de hemicelulasa o con 0.4% de esta celulasa y cualquier concentración de hemicelulasa.

Con respecto a otros azúcares, en concreto sacarosa y fructosa, se observa que para una misma cantidad de celulasa, un aumento en el contenido de hemicelulasa produce un ligero descenso de la cantidad de sacarosa y un leve incremento de la concentración de fructosa. Por otra parte, para una misma cantidad de hemicelulasa, a medida que se aumenta el contenido en celulasa se produce un descenso más pronunciado de la cantidad del disacárido y un aumento de la cantidad de fructosa en el triturado. Por lo tanto, la hemicelulasa y la celulasa favorecen la hidrólisis de la sacarosa a D-glucosa y a D-fructosa aunque el papel de la celulasa es siempre más activo. En este caso, la hidrólisis es mayor cuando se utiliza celulasa producida por *A. niger* que la segregada por *T. reesei* (tabla 2). La mayor concentración de fructosa (28 g.L^{-1}) se produce con 0.4% de celulasa y 0.4% de hemicelulasa de *A. niger*. No obstante, no existen diferencias estadísticamente significativas entre dicho valor y el alcanzado con 0.1% de celulasa de *A. niger* y 0.4% de hemicelulasa, con 0.2 ó 0.4% de celulasa de *A. niger* y cualquier concentración de hemicelulasa y con 0.2% de celulasa de *T. reesei* o con 0.4% de hemicelulasa y 0.4% de celulasa de *T. reesei* independientemente de la concentración de hemicelulasa. Este mismo fenómeno de hidrólisis de la sacarosa en medio ácido, en presencia de enzimas hidrolíticos del material lignocelulósico, ha sido constatado por otros autores (Ban-Koffi y Han, 1990).

Con respecto a la liberación de glucosa, se observa un incremento muy leve cuando, para una cantidad de celulasa constante, se añade una mayor cantidad de hemicelulasa. No obstante, si se mantiene constante la cantidad de hemicelulasa y se aumenta la concentración de celulasa, este incremento es mucho mayor. Por lo que se refiere a la producción de celobiosa, un aumento en el contenido de celulasa, y en menor medida de hemicelulasa, produce un aumento inicial en la concentración de celobiosa hasta que, llegado un punto, la cantidad de celobiosa disminuye progresivamente. Estos fenómenos se deberían a la acción de las tres celulasas: las endoglucanasas, las celobiohidrolasas y las β -glucosidasas. Las endoglucanasas actúan hidrolizando aleatoriamente los enlaces β -1.4 centrales de la cadena de la celulosa creando extremos libres. Las celobiohidrolasas, también llamadas exoglucanasas, actúan sobre los extremos de las cadenas liberando monómeros de glucosa, celobiosa y oligosacáridos de bajo peso molecular. De este modo, se produce una acción sinérgica secuencial entre las endoglucanasas y las celobiohidrolasas en esta primera etapa de hidrólisis (Medve et al., 1998). Posteriormente, las β -glucosidasas degradan la celobiosa

que tiene un efecto fuertemente inhibitorio sobre las endoglucanasas y las celobiohidrolasas (Yue et al., 2004). Por otro lado, la hemicelulasa favorece la acción de las celulasas como se ha descrito anteriormente.

El tratamiento que maximiza la concentración de glucosa es el correspondiente a 0.4% de celulasa producida por *A. niger* y 0.4% de hemicelulasa ($42. \text{ g.L}^{-1}$), pero sin diferencias estadísticamente significativas con 0.2% de celulasa de *A. niger* y 0.4% de hemicelulasa o con 0.4% de celulasa de *A. niger* y 0, 0.1 ó 0.2% de hemicelulasa. Se deduce que la celulasa procedente de *T. reesei* tiene una peor actividad β -glucosidasa que la celulasa procedente de *A. niger* (Sternberg et al., 1977). Es importante destacar que la glucosa presente en el hidrolizado final engloba la glucosa inicial (tabla 1), la liberada durante la hidrólisis de la sacarosa y la procedente de la hidrólisis de la celulosa. Se aprecia una correspondencia entre los niveles más bajos de sacarosa y los más altos de glucosa (tabla 2), de manera que se maximiza y se minimiza el contenido de glucosa y sacarosa respectivamente para 0.4% de celulasa producida por *A. niger* y 0.4% de hemicelulasa. Como se ha visto antes, la adición de celulasa procedente de *A. niger* produce una acidificación del medio y favorece la hidrólisis de la sacarosa, por lo tanto aumenta la concentración de glucosa en el hidrolizado final.

Con respecto a la celobiosa, su máxima concentración se alcanza con 0.1% de celulasa de *T. reesei* y 0.2% de hemicelulasa (4.4 g.L^{-1}), sin diferencias estadísticamente significativas con 0.1% de celulasa de *T. reesei* y cualquier concentración de hemicelulasa, con 0.2% de celulasa de *T. reesei* y 0% ó 0.1% de hemicelulasa, con 0.1% de celulasa de *A. niger* y 0.2% ó 0.4% de hemicelulasa y con sólo 0.2% de celulasa de *A. niger*. La diferencia entre los tratamientos entre ambas celulasas es que con la derivada de *A. niger* a 0.4% y 0.4% de hemicelulasa la concentración de celobiosa en el hidrolizado final es de 0 g.L^{-1} mientras que para el mismo tratamiento con *T. reesei* la concentración obtenida es de 1.9 g.L^{-1} . La menor actividad β -glucosidasa de la *T. reesei* sería consecuencia de la acumulación de celobiosa que a su vez es un fuerte inhibidor de la actividad de la celobiohidrolasa y de la endoglucanasa durante la hidrólisis de la celulosa (Sehnem et al., 2006).

Se ha demostrado la utilidad de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y de la bacteria *Zymomonas mobilis* para la fermentación de la glucosa, de la fructosa y de la sacarosa de los residuos de la industrialización de la piña para producción de etanol (Ban-Koffi y Han, 1990; Tanaka et al., 1999; DePrados et al., 2010). Se obtiene un mayor contenido en azúcares fermentables (76 g.L^{-1}) para 0.4% de celulasa procedente de *T. reesei* y 0.4% de hemicelulasa (tabla 2). Este tratamiento presenta un menor contenido en glucosa (33.7 g.L^{-1}) y fructosa (27.4 g.L^{-1}) que el mismo tratamiento con *A. niger*, pero un mayor contenido en sacarosa (15 g.L^{-1} y 3.9 g.L^{-1} respectivamente). Sin embargo, no existen diferencias estadísticamente significativas en el contenido de azúcares fermentables del hidrolizado final para cualquier concentración de hemicelulasa y de celulasa de *T. reesei* o para 0.4% de celulasa producida por *A. niger* y cualquier concentración de hemicelulasa.

Otros microorganismos como la bacteria recombinante *Escherichia coli* K022 han sido desarrollados para fermentar no sólo la glucosa, la fructosa y la sacarosa sino también, la arabinosa y la xilosa (Ohta et al., 1990; Beall et al., 1991). La mayor concentración en azúcares totales se alcanza con concentraciones de 0.4% de hemicelulasa y de celulasa de *T. reesei* (82 g.L^{-1}).

Dicho tratamiento maximiza la concentración de arabinosa (1.0 g.L^{-1}), de glucosa (33.7 g.L^{-1}), de xilosa (3.2 g.L^{-1}) y de fructosa (27.4 g.L^{-1}) a pesar de minimizar la de sacarosa (15 g.L^{-1}) y la de celobiosa (1.9 g.L^{-1}). No obstante no se observan diferencias estadísticamente significativas entre dicho tratamiento y el obtenido con 0.1%, 0.2% ó 0.4% de celulasa de *T. reesei* y cualquier concentración de hemicelulasa o con 0.4% de celulasa de *A. niger* y 0.1, 0.2 ó 0.4% de hemicelulasa.

Según puede deducirse de los resultados obtenidos en el presente trabajo, a pesar de que el tratamiento enzimático consigue un incremento de los azúcares presentes en la muestra, dicho aumento no es en ningún caso mayor al 10%. Por este motivo, se cree necesaria la utilización de otros pretratamientos de la matriz lignocelulósica para favorecer la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa. Algunos posibles tratamientos serían pretratamientos químicos con ácidos o bases, o el uso de ondas electromagnéticas (microondas) (Hendricks y Zeeman, 2009).

TABLA 3. Perfil y concentración de azúcares (g.l⁻¹) para cada combinación de hemicelulosa y de celulosa de *A. niger*¹ o de *T. reesei*² en el hidrolizado^{3,4}

Tratamiento ¹	Arabinosa	Glucosa	Xilosa	Fructosa	Sacarosa	Celobiosa	Azúcares Totales	Azúcares fermentables
C0% H0%	0 (0) ^a	26 (2) ^a	0 (0) ^a	22.4 (1.4) ^a	21.0 (1.8) ^{lm}	0 (0) ^a	69.6 (1.5) ^a	69.6 (1.5) ^{abcdefgh}
C0% H0.1%	0 (0) ^a	27 (3) ^{abc}	0 (0) ^a	22.6 (1.8) ^{ab}	20.5 (1.6) ^{klm}	0 (0) ^a	70 (4) ^a	70 (4) ^{bcdefgh}
C0% H0.2%	0 (0) ^a	28 (2) ^{abcde}	0 (0) ^a	23.5 (1.4) ^{abc}	19.2 (1.5) ^{hijklm}	0 (0) ^a	70 (1) ^a	70.4 (1.2) ^{bcdefghi}
C0% H0.4%	0 (0) ^a	28 (2) ^{abcde}	0 (0) ^a	23.6 (0.9) ^{abc}	18.2 (1.0) ^{hi}	0 (0) ^a	70 (3) ^a	70 (3) ^{bcdefgh}
C0.1% H0%	0.9 (0.2) ^{cdefgh}	32 (3) ^{fg hij}	1.3 (0.3) ^b	24 (4) ^{abcd}	7.9 (0.6) ^e	4.3 (0.9) ^{ij}	71 (6) ^{ab}	64 (7) ^a
C0.1% H0.1%	1.0 (0.2) ^{defghi}	33 (1) ^{hij}	1.3 (0.4) ^b	24.5 (1.0) ^{abcde}	7.5 (0.6) ^{de}	4.3 (1.0) ^{ij}	72 (2) ^{abc}	65 (3) ^{ab}
C0.1% H0.2%	1.1 (0.2) ^{ghij}	32.9 (0.8) ^{ghij}	1.4 (0.3) ^{bc}	25.4 (0.9) ^{bcdefg}	7.3 (0.3) ^{cde}	4.1 (0.8) ^{ghij}	72.2 (0.7) ^{abc}	65.6 (1.7) ^{abc}
C0.1% H0.4%	1.1 (0.1) ^{ghijk}	34 (1) ^{jk}	1.5 (0.3) ^{bcd}	25.8 (1.6) ^{cdefgh}	7.1 (0.8) ^{bcde}	3.7 (0.5) ^{ghij}	73 (3) ^{abcd}	67 (3) ^{abcde}
C0.2% H0%	1.2 (0.3) ^{hijk}	34 (2) ^{kl}	1.5 (0.2) ^{bcd}	26.0 (1.1) ^{cdefgh}	5.7 (0.9) ^{abcd}	3.6 (0.6) ^{ghij}	72 (2) ^{abc}	66.1 (1.9) ^{abcde}
C0.2% H0.1%	1.20 (0.08) ^{ijkl}	37 (2) ^{kl}	1.6 (0.2) ^{bcde}	26.5 (1.4) ^{defgh}	5.3 (0.4) ^{abc}	3.5 (0.7) ^{ghij}	75 (4) ^{abcdef}	69 (4) ^{abcdefgh}
C0.2% H0.2%	1.2 (0.2) ^{ijkl}	37 (2) ^{kl}	1.6 (0.3) ^{bcde}	26.5 (1.6) ^{defgh}	5.2 (0.8) ^{ab}	3.3 (1.0) ^{efgh}	75 (3) ^{abcdef}	69 (3) ^{abcdefg}
C0.2% H0.4%	1.2 (0.2) ^{ijkl}	37 (3) ^{lmn}	1.6 (0.2) ^{bcde}	27 (3) ^{defgh}	4.3 (0.9) ^a	3.3 (1.0) ^{efgh}	74 (5) ^{abcde}	68 (5) ^{abcdef}
C0.4% H0%	1.3 (0.3) ^{ijkl}	40 (5) ^{lmn}	1.6 (0.3) ^{bcde}	27 (2) ^{defgh}	4.5 (0.7) ^a	1.8 (0.8) ^{bcd}	76 (8) ^{bcdefg}	71 (8) ^{defghi}
C0.4% H0.1%	1.3 (0.1) ^{kl}	40 (5) ^{lmn}	1.7 (0.3) ^{bcde}	28.0 (1.5) ^{gh}	4.4 (0.5) ^a	1.0 (0.5) ^{bc}	76 (7) ^{cdefgh}	72 (7) ^{fghi}
C0.4% H0.2%	1.3 (0.2) ^{kl}	42 (4) ⁿ	1.71 (0.08) ^{bcdef}	28 (4) ^{gh}	4.2 (0.6) ^a	1.0 (0.4) ^b	78 (7) ^{defgh}	74 (7) ^{fghi}
C0.4% H0.4%	1.4 (0.1) ^l	42 (4) ⁿ	1.8 (0.4) ^{bcdef}	28 (2) ^h	3.9 (0.7) ^a	0 (0) ^a	78 (6) ^{defgh}	75 (6) ^{hi}

Tratamiento ²	Arabinosa	Glucosa	Xilosa	Fructosa	Sacarosa	Celobiosa	Azúcares Totales	Azúcares fermentables
C0% H0%	0 (0) ^a	26 (2) ^a	0 (0) ^a	24 (3) ^{abc}	20.8 (0.8) ^{lm}	0 (0) ^a	70 (2) ^a	70.4 (1.7) ^{bcdefghi}
C0% H0.1%	0 (0) ^a	26.7 (0.2) ^{ab}	0 (0) ^a	24 (2) ^{abcd}	20.6 (0.6) ^{klm}	0 (0) ^a	71 (2) ^{ab}	71.1 (1.9) ^{cdefghi}
C0% H0.2%	0 (0) ^a	27 (1) ^{abcd}	0 (0) ^a	24 (2) ^{abcd}	19.7 (0.3) ^{ijklm}	0 (0) ^a	70 (2) ^a	70.4 (1.7) ^{bcdefghi}
C0% H0.4%	0 (0) ^a	27.7 (0.2) ^{abcde}	0 (0) ^a	24 (2) ^{abcd}	19.4 (1.2) ^{hijklm}	0 (0) ^a	71 (4) ^{ab}	71 (4) ^{bcdefghi}
C0.1% H0%	0.5 (0.2) ^b	29 (1) ^{abcdef}	1.8 (0.8) ^{bcdef}	24 (3) ^{abcd}	19.1 (0.2) ^{hijklm}	3.9 (1.0) ^{ghij}	78 (3) ^{defgh}	72 (3) ^{efghi}
C0.1% H0.1%	0.7 (0.1) ^{bc}	29.2 (0.5) ^{abcdef}	1.9 (0.5) ^{bcdefg}	24 (2) ^{abcd}	19 (3) ^{hijklm}	4.4 (0.5) ^{ij}	79 (4) ^{defgh}	72 (4) ^{fghi}
C0.1% H0.2%	0.7 (0.3) ^{bcd}	29 (2) ^{abcdef}	2.0 (0.3) ^{cdefgh}	24.2 (0.2) ^{abcde}	18.8 (1.1) ^{hijkl}	4.4 (0.5) ^{ij}	79 (3) ^{defgh}	72 (3) ^{fghi}
C0.1% H0.4%	0.74 (0.07) ^{bcd}	29.3 (0.4) ^{abcdef}	2.2 (0.6) ^{defgh}	24.3 (1.4) ^{abcde}	18.7 (1.1) ^{hijk}	4.2 (0.5) ^{hij}	79 (1) ^{defgh}	72.3 (1.4) ^{fghi}
C0.2% H0%	0.74 (0.08) ^{bcd}	29.7 (0.8) ^{bcdefg}	2.2 (0.5) ^{efghi}	24.5 (1.4) ^{abcde}	19 (3) ^{hij}	4.3 (0.8) ^{ij}	80 (2) ^{fgh}	73 (2) ^{fghi}
C0.2% H0.1%	0.76 (0.04) ^{bcd}	29.9 (0.6) ^{bcdefg}	2.4 (0.9) ^{fghij}	25 (2) ^{abcdef}	18.2 (1.1) ^{hi}	3.6 (0.6) ^{fghij}	79 (3) ^{defgh}	73 (4) ^{fghi}
C0.2% H0.2%	0.8 (0.2) ^{cde}	30.0 (0.4) ^{cdefg}	2.6 (0.8) ^{ghijk}	25 (4) ^{abcdef}	17.9 (1.1) ^{hi}	3.5 (1.1) ^{fghi}	79 (4) ^{defgh}	73 (4) ^{fghi}
C0.2% H0.4%	0.8 (0.3) ^{cde}	30 (1) ^{defgh}	2.7 (0.9) ^{hijk}	26 (2) ^{cdefgh}	18 (2) ^{hi}	3.2 (1.3) ^{def}	80 (2) ^{gh}	73 (4) ^{fghi}
C0.4% H0%	0.9 (0.3) ^{cdef}	31 (1) ^{efghi}	2.8 (0.6) ^{ijkl}	26 (2) ^{cdefgh}	18 (2) ^h	3.0 (0.3) ^{de}	81 (5) ^{gh}	74 (5) ^{ghi}
C0.4% H0.1%	0.9 (0.3) ^{cdefg}	31.3 (0.5) ^{fghij}	2.9 (1.1) ^{jk}	25.9 (1.4) ^{cdefgh}	17.4 (1.4) ^{gh}	2.5 (0.3) ^{de}	81 (2) ^{gh}	75 (3) ^{hi}
C0.4% H0.2%	0.9 (0.2) ^{cdefgh}	32 (3) ^{fghij}	2.9 (0.7) ^{jk}	26.2 (1.4) ^{cdefgh}	16 (2) ^{fg}	1.9 (0.2) ^{cd}	80 (3) ^{defgh}	74 (2) ^{ghi}
C0.4% H0.4%	1.0 (0.3) ^{efghij}	33.7 (0.6) ^{ijkl}	3.2 (0.7) ^k	27.4 (1.4) ^{fgh}	15 (4) ⁱ	1.9 (0.9) ^{cd}	82 (4) ^h	76 (4) ⁱ

³Medias de cada tratamiento y su desviación estándar entre paréntesis.

⁴Letras minúsculas similares indican grupos estadísticamente homogéneos con un nivel de confianza del 95%.

CONCLUSIONES

Los residuos industriales de la piña contienen azúcares fermentables como son la glucosa, la fructosa y la sacarosa, que los convierte en una fuente potencial de obtención de bioetanol de bajo coste.

El empleo de Ca(OH)_2 y de celulasas y hemicelulasas producidas por los hongos filamentosos *A. niger* y *T. reesei*, son capaces de hidrolizar parte de la matriz lignocelulósica del residuo industrial de la piña. Tras el tratamiento, la concentración de azúcares fermentables aumenta y aparecen nuevos azúcares resultado de la sacarificación tales como la arabinosa, la xilosa y la celobiosa.

La sacarificación concluye aproximadamente a las 24 horas de tratamiento enzimático siendo más intensa durante las dos primeras horas. Durante la misma se produce un incremento de los sólidos solubles totales y una disminución del pH del medio.

Por otro lado, se ha comprobado que la adición de celulasa de cualquier origen tiene un mayor poder hidrolítico sobre el residuo que la hemicelulasa, y que esta última favorece la acción de las celulasas. Además, la adición de una misma cantidad de celulasa procedente de *T. reesei* en comparación con la celulasa procedente de *A. niger* produce en general un mayor efecto hidrolítico.

El mayor contenido en azúcares fermentables en el hidrolizado final se ha obtenido para 0.4% de celulasa procedente de *T. reesei* y 0.4% de hemicelulasa. Sin embargo, no se han observado diferencias estadísticamente significativas entre dicho valor y los alcanzados para cualquier concentración de hemicelulasa y de celulasa de *T. reesei* o para 0.4% de celulasa producida por *A. niger* y cualquier concentración de hemicelulasa.

La mayor concentración en azúcares totales se ha alcanzado con concentraciones de 0.4% de hemicelulasa y 0.4% de celulasa de *T. reesei*. No obstante, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre dicho tratamiento y con 0.1%, 0.2% ó 0.4% de celulasa de *T. reesei* y cualquier concentración de hemicelulasa o con 0.4% de celulasa de *A. niger* y 0.1, 0.2 ó 0.4% de hemicelulasa.

Puesto que uno de los objetivos que se persigue es el de optimizar el proceso de hidrólisis enzimática, teniendo en cuenta tanto la producción de azúcares como el coste del proceso, se recomienda minimizar, siempre que no se produzca un descenso significativo en la producción de azúcares fermentables y totales, la cantidad de celulasa y de hemicelulasa empleadas. Del mismo modo, se antepone el uso de celulasa procedente de *A. niger* frente a *T. reesei* por motivos económicos. Según los resultados obtenidos en el presente trabajo, el tratamiento que aúna todas estas recomendaciones sería: 0.4% de celulasa producida por *A. niger* y 0.1% de hemicelulasa.

Por último, se sugiere estudiar el efecto de diversos pretratamientos sobre la matriz lignocelulósica, tales como pretratamientos químicos o el uso de ondas electromagnéticas.

REFERENCIAS

- Azzam, A.M. 1989. Pretreatment of cane bagasse with alkaline hydrogen peroxide for enzymatic hydrolysis of cellulose and ethanol fermentation. *Journal of Environ. Sci. Health. B.* 24, 4: 421-433.
- Balat, M. 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management* 52: 858-875
- Balat, M.; Balat, H.; Cahide, Ö. 2008. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34: 551-573.
- Ban-Koffi, L. y Han, Y.W. 1990. Alcohol production from pineapple waste- *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 6: 281-284.
- Beall, D.S.; Ohta, K.; Ingram, L.O. 1991. Parametric studies of ethanol production from xylose and other sugars by recombinant *Escherichia coli*. *Bioetchnol. Bioeng.*, 38: 296-303.
- Berg, C. 2001. World bioethanol production, the distillery and bioethanol network. En línea: <http://www.distill.com/worldethanolproduction.htm> (Mayo 2012).
- Berlin, A.; Gilkes, N.; Kilburnn, D.; Bura, R.; Markov, A.; Okunev, O.; Gusarov, A.; Maximenko, V.; Gregg, D.; Saddler, J. 2005. Evaluation of novel fungal cellulose preparation for ability to hydrolyze softwood substrate-evidence of the role of accessory enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 37: 175-184.
- Bjerre, A.B.; Olesen, A. B.; Fernqvist, T. 1996. Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting inconvertible cellulose and hemicellulose. *Biotechnol. Bioeng.* 49: 568-577.
- Cadoche, L. y Lopez, G.D. 1989. Assessment of size reduction as a preliminary step in the production of ethanol of lignocellulosic wastes. *Biol. Wastes*, 30: 153-157.
- Camps, M. y Marcos, F. 2002. Los biocombustibles. Eds. Mundi Prensa libros, Madrid.
- Cleemput, G.; Hessing, M.; Van Oort, M.; Deconynck, M.; Delcour, J.A. 1997. Purification and characterization of a β -D-xylosidase and an endo-xylanase from wheat flour. *Plant Physiology*, 113: 377-386.
- Dale, B.E.; Henk, L.L.; Shiang, M. 1984. Fermentation of lignocellulosic materials treated by ammoniac freeze-explosion. *Dev. Ind. Microbiol.* 26: 223-233.
- Demirbas, A. 2005. Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. *Energy Sources* 27: 327-333.
- DePrados, M.; Seguí, L.; Fito, P. 2010. Industrial pineapple waste as a feasible source to produce bioethanol. *Proceedings of FoodInnova 2010*.
- Directiva 2003/30/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 8 de mayo de 2003 relativa al fomento del uso de biocarburantes u otros combustibles renovables en el transporte.
- Duff, S. J. B. y Murray, W. D. 1996. Bioconversion of forest products industry waste cellulosic to fuel ethanol: a review. *Bioresour. Technol.* 55: 1-33.
- Esterbauer, H.; Steiner, W.; Labudova, I.; Hermann, A. y Hayn, M. 1991. Production of *Trichoderma* cellulase in laboratory and pilot scale. *Bioresour Technol*, 36:51-65.
- Fan, L.T.; Gharpuray, M.M., Lee, Y.H. 1987. In: cellulose Hydrolysis Biotechnology Monographs, Springer, Berlin: 57.
- Fengel, D. y Wegener, G. 1984. Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions. De Gruyter, Berlin.
- Goyal, A.; Ghosh, B.; Eveleigh, D. 1991. Characteristics of fungal cellulose. *Bioresour Technol*, 36:37-50.
- Hendriks A.T.W.M. y Zeeman G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100: 10-18.
- Krogh, K.B.; Mørkeberg, A.; Jørgensen, H.; Frisvad, J.C.; Olsson, L. 2004. Screening genus *Penicillium* for producers of cellulolytic and xylanolytic enzymes. *Appl Biochem Biotechnol*, 114: 389-401.
- Laureano-Perez, L.; Teymouri, F.; Alizadeh, H.; Dale, B.E. 2005. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1081–1099.
- Lewis, S.M. 1996. Fermentation alcohol. En: Godfrey T, West S, editors. *Industrial enzymology*. 2nd ed. New York: Stockton Press: 12-48
- McKendry, P. 2002. Energy production from biomass (part 1). Overview of biomass. *Bioresource Technology*, 83: 37-46.
- Medve J., Karlsson J., Lee D., Tjerneld F. (1998). Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from *Trichoderma reesei*: adsorption, sugar production pattern, and synergism of the enzymes. *Biotechnology and Bioengineering*, 59: 621-634.

- Muttamara, S.; Nirmala, D.J. 1982. Management of industrial wastewater in developing nations. Proceedings of International Symposium (Alexandria, Egypt, March 1981). Eds Stuckey, D. & Hamza, A: 445-452. Oxford: Pergamon Press.
- Nigam, J.N. 2000. Continuous ethanol production from pineapple cannery waste using immobilized yeast cells. *Journal of Biotechnology*, 80: 189-193.
- Ohta, K.; Alterthum, F.; Ingram, L.O. 1990. Effect on environmental conditions on xylose fermentation by recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol*, 56: 463-465.
- Ovando-Chacón, S.L. 2005. Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia*, 21 (42): 111-120.
- Reshamwala, S.; Shawky, B.T.; Dale, B. E. 1995. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of AFEX-treated coastal Bermuda grass and switchgrass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 51/52: 43-55.
- Rubin, E.M. 2008. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, 454:841-845.
- Sarkar, N.; Gosh, S.K.; Bannerjee, S. y Aikat, K. 2012. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. *Renewable Energy*, 37: 19-27.
- Sánchez, J.O. 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*, 99: 5270-5295.
- Saha, B.C.; Iten, L.B.; Cotta, M.A.; Wu Y.V. 2005. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochemistry*, 40: 3693-3700.
- Sehnm, N.T.; Bittencourt, L.R.; Camassola, M.; Dillon, A.J.P. 2006. Cellulase production by *Penicillium echinulatum* on lactose. *Appl Microbiol Biotechnol*, 72:163-167.
- Shallom, D. y Shoham, Y. 2003. Microbial hemicellulases. *Curr Opin Microbiol*, 6:219-228.
- Shinozaki, Y. y Kitamoto, H.K. 2011. Ethanol production from ensiled rice straw and whole-crop silage by simultaneous enzymatic saccharification and fermentation process. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111: 320-325
- Shiroma, R; Park, J.Y.; Arakane, M.; Ishikawa, S.; Terajima, Y.; Ike, M.; Tokuyasu, K. 2012. Readily-milled fraction of wet sugarcane bagasse as an advanced feedstock for monosaccharide production via the RT-CaCCO process. *Bioresource Technology* 116: 529-532.
- Sozzi, G.O.; Civello, P.M. 2005. Fruit cell wall enzymes as targets for biotechnology. D. Thangadurai, T. Pullaiah and Pinheiro de Carvalho (eds.), Regency Publications, NewDelhi. *Genetic Resources and Biotechnology*, 1: 214-249.
- Sternberg, D. 1976. Production of cellulose by *Trichoderma*. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 35-53.
- Sternberg, D.; Vijayakumar, P.; Reese, P. 1977. B-glucosidase: microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. *Can J Microbiol*, 23:139-147.
- Sun, Y. y Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83: 1-11.
- Tanaka, K.; Hilary, Z.D. y Ishizaki, A. 1999. Investigation of the Utility of pineapple juice and pineapple waste material as low cost substrate for ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87: 642-646.
- Tewari, H.K.; Marhawa, S.S.; Rupal, K; Kennedy, J.F. 1987. Bio-utilization of pineapple wastes for ethanol generation. In *Wood and Cellulosics: Industrial utilization, biotechnology, structure and properties*, eds. Kenney, J.F.; Phillips, G.O. & Williams, P.A.: 251-259. Chichester: Ellis Horwood.
- Wen, Z.; Liao, W.; Chen, S. 2005. Production of cellulase/ β -glucosidase by the mixed fungi culture *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. *Process Biochem*, 40:3087-3094.
- Wright, J. D. 1998. Ethanol from biomass by enzymatic hydrolysis. *Chem. Eng. Prog.* 84 (8): 62-74.
- Yue Z., Bin W., Baixu Y., Peiji, G. 2004. Mechanism of cellobiose inhibition in cellulose hydrolysis by cellobiohydrolase. *Science in China series C: Life Science*, 47: 18-24.
- Zhang H.Y. y Lynd L.R. 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 88: 797-779.