

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y
DEL MEDIO NATURAL**



**UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA**



**INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO**

**MÁSTER EN CIENCIA E INGENIERÍA DE LOS
ALIMENTOS**

**EFFECTO DEL PRETRATAMIENTO CON
MICROONDAS EN LA HIDRÓLISIS
ENZIMÁTICA DE LOS RESIDUOS
INDUSTRIALES DE LA PIÑA PARA LA
OBTENCIÓN DE BIOETANOL**

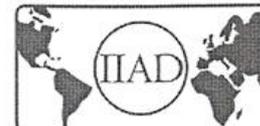
TRABAJO FINAL DE MÁSTER

**ALUMNO:
Ignacio Bernat Senent**

**DIRECTORAS:
Lucía Seguí Gil
Claudia Conesa Domínguez**



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

MÁSTER EN CIENCIA E INGENIERÍA DE ALIMENTOS

Vista la solicitud presentada por el/la alumno/a D./Dña. IGNACIO BERNAT SENENT , la Comisión Académica del Máster le autoriza la realización del Trabajo Fin de Máster enmarcado en la línea de investigación EFECTO DEL PRETRATAMIENTO CON MICROONDAS EN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LOS RESIDUOS INDUSTRIALES DE LA PIÑA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOETANO bajo la Dirección Académica de D./Dña. LUCÍA SEGUÍ GIL, debiendo ajustarse a las Normas establecidas para la redacción y presentación de dichos Trabajos.

Codirectores/as (si procede):

Director/a Experimental (si procede): CLAUDIA CONESA DOMÍNGUEZ

Tutor/a (si procede):

Valencia, 22 de julio de 2013

LA DIRECTORA DEL MÁSTER



Mª Dolores Ortolá Ortolá

** (Esta solicitud será incluida en todos los ejemplares del Trabajo, como primera página tras la portada)

EFFECTO DEL PRETRATAMIENTO CON MICROONDAS EN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LOS RESIDUOS INDUSTRIALES DE LA PIÑA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOETANOL

Ignacio Bernat Senent¹, Claudia Conesa Domínguez¹, Lucía Seguí Gil¹

RESUMEN

Los residuos procedentes de la industrialización de la piña pueden llegar a alcanzar hasta un 50% (m/m) del total de fruta procesada. Al tratarse de un material con una proporción significativa de azúcares fermentables, celulosa y hemicelulosa, podría constituir una materia prima de bajo coste para la producción de bioetanol. No obstante, la estructura lignocelulósica es difícilmente degradable por lo que resulta necesario aplicar algún pretratamiento como paso previo a la hidrólisis enzimática. En concreto, el objetivo del presente trabajo consiste en evaluar la eficacia del pretratamiento con microondas previo a la hidrólisis enzimática de los residuos industriales de la piña para la obtención de bioetanol. Para ello, se aplicaron diferentes potencias (10.625, 8.5, 6.375, 4.25 y 2.125 W/g) y tiempos (1-6 min, 8, 10, 14 y 20 min) y, posteriormente, se procedió a la sacarificación de las muestras (pH 5, 50 °C, 0.4% (m/m) de celulasa, 0.1% (m/m) de hemicelulasa de *Aspergillus niger*, durante 24 h). Se determinaron los sólidos solubles totales, el pH y el perfil de azúcares del hidrolizado final. Los resultados obtenidos sugieren que pretratar con microondas el residuo sólido de la piña permite mejorar la eficacia de la hidrólisis enzimática posterior. Los pretratamientos a 6.375 W/g, a 4.25 W/g entre 11-14 min y a 8.5 W/g entre 1-3 min generaron un incremento estadísticamente significativo de los azúcares con respecto a la muestra hidrolizada no sometida a pretatamiento. En concreto, en la muestra pretratada a 6.375 W/g durante 4 min se produjo un incremento del 47% para los azúcares fermentables y del 46% para los totales con respecto al residuo sólido hidrolizado no pretratado y del 123% con respecto al residuo sólido inicial.

PALABRAS CLAVE: Pretratamiento con microondas, hidrólisis enzimática, bioetanol, residuos industriales de la piña.

RESUM

Els residus procedents de la industrialització de la pinya poden arribar a constituir fins a un 50% (m/m) del total de fruita processada. En tractar-se d'un material amb una proporció significativa de sucres fermentables, cel·lulosa i hemicel·lulosa, podria constituir una matèria primera de baix cost per a la producció de bioetanol. Malgrat això, l'estructura lignocel·lulósica és difícilment degradable pel que resulta necessari aplicar algun pretractament com a pas previ a la hidròlisi enzimàtica. En concret, l'objectiu del present treball consisteix a avaluar l'eficàcia del pretractament amb microones previ

¹Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IIAD)
Universitat Politècnica de València (UPV)
Camino de Vera s/n, 46022- Valencia

a la hidròlisi enzimàtica dels residus industrials de la pinya per a l'obtenció de bioetanol. Per això, es van aplicar diferents potències (10.625, 8.5, 6.375, 4.25 i 2.125 W/g) i temps (1-6 min, 8, 10, 14 i 20 min) i, posteriorment, es va procedir a la sacarificació de les mostres (pH 5, 50 °C, 0.4% (m/m) de cel·lulasa, 0.1% (m/m) de hemicel·lulasa de *Aspergillus niger*, durant 24 h). Es van determinar els sòlids solubles totals, el pH i el perfil de sucres de l'hidrolitzat final. Els resultats obtinguts suggereixen que pretractar amb microones el residu sòlid de la pinya permet millorar l'eficàcia de la hidròlisi enzimàtica posterior. Els pretractaments a 6.375 W/g, a 4.25 W/g entre 11-14 min i a 8.5 W/g entre 1-3 min van generar un increment estadísticament significatiu dels sucres pel que fa a la mostra hidrolitzada no sotmesa a pretractament. En concret, en la mostra pretractada a 6.375 W/g durant 4 min es va produir un increment del 47% per als sucres fermentables i del 46% per als totals pel que fa al residu sòlid hidrolitzat no pretractat i del 123% pel que fa al residu sòlid inicial.

PARAULES CLAU: Pretractament amb microones, hidròlisi enzimàtica, bioetanol, residus industrials de la pinya.

ABSTRACT

Industrial pineapple waste can reach up to 50% (w/w) of the total processed fruit. This waste is characterized by containing a significant amount of fermentable sugars, cellulose and hemicelluloses; thus, it could be used as a low cost alternative for bioethanol production. However, the lignocellulosic structure is hardly degradable and, therefore, a pretreatment step prior to the enzymatic hydrolysis is needed. The aim of the present work is to evaluate the effectiveness of a microwave pretreatment before enzymatic hydrolysis of industrial pineapple waste for bioethanol production. With this purpose, the solid waste was treated using different microwave powers (10.625, 8.5, 6.375, 4.25 and 2.125 W/g) and times (1-6 min, 8, 10, 14 and 20 min) and then saccharified (pH 5, 50 °C, 0.4% (w/w) of cellulase, 0.1% (w/w) of hemicellulase from *Aspergillus niger* during 24 h). Total soluble solids, pH and sugar profile were determined on the final hydrolyzate. Results suggest that, in general, microwave pretreatment enhance the enzymatic hydrolysis of pineapple waste. Pretreatments at 6.375 W/g, at 4.25 W/g during 11-14 min and at 8.5 W/g in the range 1-3 min generated a statistically significant increase in the sugars yield with respect to the non-pretreated hydrolyzed sample. Specifically, the samples pretreated at 6.375 W/g during 4 min underwent an increase of 47% in fermentable sugars, and of 46% in total sugars, as compared with the non-pretreated hydrolyzed waste, and of 123% with respect to the initial waste.

KEYWORDS: Microwave pretreatment, enzymatic hydrolysis, bioethanol, industrial pineapple waste.

INTRODUCCIÓN

La producción mundial de piñas se ha incrementado progresivamente hasta alcanzar los 21 millones de toneladas en el año 2011, lo que la convierte en la tercera fruta tropical más importante por detrás de la banana y del mango (FAO, 2013). Sus dos principales industrias de transformación son la industria de zumos y la conservera, que en muchos casos se combinan para la obtención simultánea de zumos y de concentrados, y de piña enlatada. Durante su procesado, alrededor de un 50% (m/m) de la fruta acaba convirtiéndose en residuos, constituidos principalmente por la corteza, la corona y el corazón, muy difíciles de degradar y de gestionar (Ketnawa et al., 2012). No obstante, nuevas investigaciones se centran en la obtención de bioetanol de segunda generación a partir de estos residuos al tratarse de un material lignocelulósico que contiene altas proporciones de mono y disacáridos fermentables como la glucosa, la fructosa y la sacarosa, y de celulosa y de hemicelulosa potencialmente hidrolizables (Nigam, 1999; Tanaka et al., 1999; Ruangviriyachai et al., 2010). Las moléculas de celulosa se organizan en largas cadenas lineales llamadas microfibrillas recubiertas por hemicelulosa y lignina que la protegen de la hidrólisis enzimática (Taherzadeh y Karimi, 2008), por lo que pretratar la matriz lignocelulósica se convierte en un paso primordial para la obtención de bioetanol. En la actualidad existen diferentes tipos de pretratamientos físicos (molienda, pirólisis), fisicoquímicos (autohidrólisis, AFEX, explosión de CO₂), químicos (ozonólisis, hidrólisis ácida o alcalina, empleo de organosolventes) y biológicos, así como una combinación de todos ellos (Sun y Chen, 2002). Muchos de estos pretratamientos requieren altas temperaturas, que se alcanzan mediante calentamiento por convección o por conducción (Liu y Wyman, 2005; Mosier et al., 2005), pero que generan un elevado coste energético y pueden producir compuestos inhibidores de la fermentación alcohólica.

El empleo de microondas, radiaciones electromagnéticas no ionizantes que se hallan dentro de una gama de frecuencias de 300 MHz (longitud de onda 1 m) a 300 GHz (longitud de onda de 1 mm), es un método alternativo a los pretratamientos convencionales (Hu y Wen, 2008). En concreto, permite un calentamiento volumétrico, selectivo y rápido del producto, al existir un contacto directo entre este y el campo electromagnético generado por el microondas (Datta, 2001; De la Hoz et al., 2005). Esto se traduce en una mayor efectividad energética y facilidad de manejo con respecto a los pretratamientos convencionales de la matriz lignocelulósica. Además, los últimos estudios demuestran que las microondas cambian la ultraestructura de la celulosa (Xiong et al., 2000; De la Hoz et al., 2005) y degradan la lignina y la hemicelulosa, incrementando así la efectividad de la hidrólisis enzimática sobre la matriz lignocelulósica (Azuma et al., 1984; Ooshima et al., 1984; Kitchaiya et al., 2003; Zhu et al., 2005; Zhu et al., 2006). No obstante, la efectividad de un pretratamiento depende tanto de las condiciones del proceso, como de la matriz lignocelulósica objeto de estudio. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es evaluar la eficacia del

pretratamiento con microondas previo a la hidrólisis enzimática de los residuos industriales de la piña para la obtención de bioetanol.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

Las piñas (*Ananas comosus*) utilizadas en el presente trabajo pertenecen a la variedad de cultivo MD-2, más conocida como Extra Sweet o Golden Sweet. Con el fin trabajar con una muestra homogénea, los frutos se seleccionaron de acuerdo a su tamaño, peso, color, aspecto y estado de madurez.

Obtención del residuo sólido

Para la obtención de la muestra, se lavaron las piñas en una disolución de agua e hipoclorito de sodio al 0.1%, durante 5 minutos. Posteriormente se eliminó la corona del fruto con un cuchillo y se separaron la corteza y el corazón de la pulpa con un cortador de piña (GEFU). A continuación se trocearon la corteza y el corazón y se prensaron en una prensa hidráulica a 2.5 bar (Vincent Corporation modelo CP-4). La torta de prensado se trituró con una batidora americana (Solac Professional Mixer 1000W Inox.). Por último, el residuo triturado se introdujo en frascos de vidrio que se llevaron a congelación a -22 °C hasta la realización de los experimentos. A este residuo se le denominará, a lo largo del trabajo, residuo sólido inicial.

Pretratamiento con microondas

El pretratamiento se llevó a cabo usando un horno microondas doméstico (LG MH6340F/MH6340FS) con una frecuencia de 2.45 GHz. Se introdujeron 40 g de residuo triturado y 40 mL de agua destilada en recipientes de plástico especiales para microondas. La mezcla se trató a 850, 680, 510, 340 y 170 W, lo que se traduce en las siguientes potencias W/g: 2.125, 4.25, 6.375, 8.5 y 10.625, y a intervalos de tiempo de 1 minuto hasta 6, 8, 10, 12 y 20 minutos, respectivamente. Finalmente se ajustó el pH del residuo a 5 mediante la adición de NaOH 1 N (Panreac Química, S.L.U.). Todos los tratamientos se realizaron por triplicado.

Hidrólisis enzimática

Se combinaron 0.4% (m/m) de celulasa (1.13 Unidades/mg de sólido, Sigma-Aldrich Spain) y 0.1% (m/m) de hemicelulasa (1.5 Unidades/mg de sólido, Sigma-Aldrich Spain) producidas ambas por *Aspergillus niger* con el residuo pretratado con microondas y sin pretratar en vasos de precipitados de 100 mL. La mezcla se llevó a estufa de incubación (PSelecta modelo Incudigit) a 50 °C durante 24 h.

Efecto de la congelación

La congelación del residuo sólido inicial se llevó a cabo con la finalidad de conservar la muestra hasta análisis. No obstante, puesto que la congelación en sí misma podría contribuir a la desestructuración del material, y con el fin de tener en cuenta este posible efecto al utilizar este método con anterioridad al pretratamiento con microondas, se procedió como sigue. Se procesó piña y se separó el residuo triturado en dos partes, una de las cuales se llevó a congelación a -22 °C. En ambos casos, se pretrató a 510 W durante 4 min y se llevó a cabo la hidrólisis enzimática.

Caracterización del residuo en las diferentes etapas del tratamiento

Se determinaron por triplicado la humedad, el pH, los Sólidos Solubles Totales (SST) y el perfil de azúcares del residuo sólido inicial, del residuo hidrolizado pretratado y sin pretratar con microondas, y del residuo hidrolizado y pretratado a 510 W y 4 min congelado y sin congelar.

DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD

Se valoró el contenido en agua (x_w) mediante el método gravimétrico de doble pesada 934.06 (AOAC, 2000) modificado. Según este método, la humedad de la muestra puede obtenerse a partir de la ecuación 1. Las muestras se secaron en estufa a 63 °C (J.P.Selecta) hasta peso constante. Las pesadas se realizaron con balanza analítica (Mettler Toledo modelo MS304S).

$$x_w(\%) = \frac{M_{0+mh} - M_{0+ms}}{M_{0+mh} - M_0} \quad (1)$$

Donde: M_0 se corresponde con la masa del crisol vacío; M_{0+mh} con la masa del crisol con una pequeña cantidad de la muestra húmeda; M_{0+ms} con la masa del crisol junto con la muestra secada en estufa.

DETERMINACIÓN DEL PH

El pH se determinó con un pH-metro digital con electrodo de contacto (Mettler Toledo Inlab) previamente calibrado con tampones (pH 4.01, 7.0 y 9.21).

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN SÓLIDOS SOLUBLES TOTALES (SST)

Los SST se evaluaron por refractometría a través de la medida de los grados Brix (°Brix) de la fase líquida. Para ello, se utilizó un refractómetro de mesa (ABBE ATAGO 3T) termostatado a 20 °C según el método ISO 1743:1982. La fase líquida se obtuvo por prensado con una prensa manual.

DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE AZÚCARES

La determinación de los azúcares presentes en la fase líquida del residuo se realizó mediante Cromatografía Líquida de Intercambio Iónico (cromatógrafo modelo 716 Compact IC Metrohm), con columna Metrosep Carb 1 250/4.6 (250 mmLx 4.6 mmID), utilizando 0.1 M NaOH (1 mL/min) como fase móvil. Para realizar las determinaciones, se prepararon diluciones 1:2000 con agua milliQ de la fase líquida del residuo que se filtraron con un filtro de nailon de 0.45 µm. Los patrones utilizados para la cuantificación del contenido en azúcares del residuo fueron arabinosa (pureza ≥98%), glucosa (pureza ≥99.5%), xilosa (pureza ≥99%), fructosa (pureza ≥99%) y sacarosa (pureza ≥99.5%), preparados en diluciones de 2.5, 5, 10, 15, 25 y 50 ppm. La lectura de los cromatogramas se realizó mediante el programa IC Net 2.3 (Metrohm).

Análisis Estadístico

Se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) para estudiar los resultados obtenidos en los experimentos. Para ello se utilizó el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización del licor de prensado

Los resultados de la caracterización fisicoquímica del licor de prensado del residuo industrial de la piña se presentan en la tabla 1. Según puede apreciarse, la fase líquida se caracteriza por un pH ácido y los azúcares presentes en la misma son glucosa, fructosa y sacarosa, lo que lo convierte en una fuente potencial de obtención de bioetanol. En concreto, la glucosa es el azúcar que se encontraba en una mayor proporción seguido por la fructosa y, en menor medida, por la sacarosa. Los valores obtenidos de azúcares totales fueron inferiores a los obtenidos por Abdullah y Hanafi (2008): 73,76 g/L y Sasaki et al. (1991): 100 g/L. Esta diferencia se puede deber al proceso de obtención del residuo de la piña y/o al estado de madurez de los frutos.

TABLA 1. Caracterización fisicoquímica del licor de prensado¹.

Licor de prensado					
SST (°Brix)	pH	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)	Sacarosa (g/L)	Azúcares Totales (g/L)
10.8 (0.8)	3.31 (0.04)	17 (5)	12.7 (2.6)	3.1 (1.1)	33 (7)

¹Los valores se corresponden a la media de tres repeticiones (Desviación Estándar).

Caracterización del residuo sólido de industrialización de la piña

En la tabla 2 se muestran el pH, la humedad, los sólidos solubles totales y el contenido en azúcares del residuo sólido tras haber sido reconstituido con agua. Se añadió agua en la proporción de 1:1 (m/m) a la torta de prensado puesto que algunos autores como Azuma et al. (1984) y Ooshima et al. (1984) sugieren que en presencia de agua, el pretratamiento con microondas mejoraría la hidrólisis enzimática de los materiales lignocelulósicos. El análisis de los cromatogramas (figura 1) de la fase líquida permitió identificar y cuantificar los azúcares presentes en el residuo sólido restaurado. Como consecuencia de la restauración del residuo sólido con agua en una proporción de 1:1 (m/m), el pH es ligeramente superior con respecto al licor de prensado y en general, la concentración de los distintos azúcares se reduce a aproximadamente la mitad.

TABLA 2. Caracterización fisicoquímica y contenido en azúcares del residuo sólido reconstituido con agua¹.

Residuo Sólido reconstituido con agua						
SST (°Brix)	x_w (%)	pH	Glucosa (g/L)	Fructosa (g/L)	Sacarosa (g/L)	Azúcares Totales (g/L)
3.8 (0.2)	92.2 (0.5)	3.80 (0.05)	10 (5)	7 (2)	1.5 (0.6)	19 (7)

¹Los valores se corresponden a la media de tres repeticiones (Desviación Estándar).

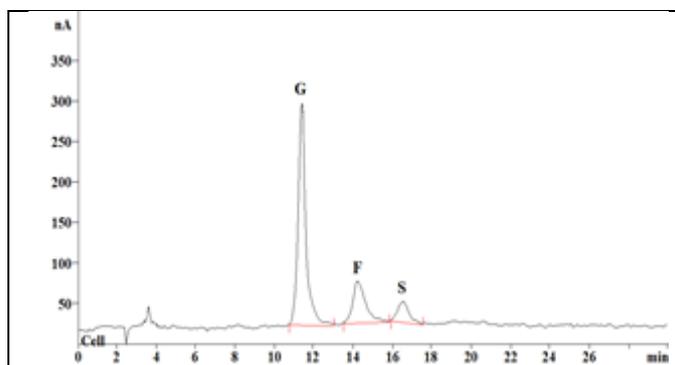


FIGURA 1. Cromatograma obtenido por cromatografía líquida de intercambio iónico correspondiente al residuo sólido reconstituido con agua (dilución 1:2000 v/v). G: Glucosa; F: Fructosa; S: Sacarosa.

Hidrólisis enzimática del residuo sólido de piña sin pretratar y pretratado con microondas

CARACTERIZACIÓN DEL RESIDUO HIDROLIZADO ENZIMÁTICAMENTE SIN PRETRATAMIENTO

En la tabla 3 se muestran los resultados de la caracterización fisicoquímica del residuo sólido hidrolizado (24 h) sin pretratamiento con microondas.

A partir de los cromatogramas, se deduce que tras la hidrólisis enzimática existe un incremento con respecto al residuo restaurado de glucosa (60%), fructosa (39%) y sacarosa (6,7%), como consecuencia de la acción de la celulasa fúngica que consta de tres grupos de enzimas: las endoglucanasas (EC 3.2.1.4), las celobiohidrolasas o exoglucanasas (EC 3.2.1.74) y las β -glucosidasas (EC 3.2.1.21) (Goyal et al., 1991). El mecanismo enzimático de la hidrólisis de la celulosa, polímero de D-glucosa unida por enlaces β -1,4-O-glucosídicos, consta de las etapas descritas a continuación: En primer lugar las endoglucanasas hidrolizan al azar enlaces glicosídicos en las regiones amorfas de la celulosa generando oligosacáridos. Posteriormente las celobiohidrolasas actúan sobre los extremos no reductor y reductor de las cadenas de celulosa liberando glucosa y celobiosa. Finalmente las β -glucosidasas hidrolizan la celobiosa no fermentable a glucosa (Ting et al., 2009). Algunos autores como Ban-Koffi y Han (1990) y Abdullah y Mat (2008) sugieren que a pH ácido, la sacarosa se hidroliza a D-glucosa y a D-fructosa, lo que justificaría el menor incremento de la sacarosa con respecto a los dos monosacáridos.

Además de los azúcares inicialmente presentes, los cromatogramas permitieron identificar dos nuevos azúcares: arabinosa y xilosa (figura 2). Como se ha indicado en la introducción, la celulosa está recubierta por hemicelulosa. Este polímero complejo de heteropolisacáridos está formado por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) y ácidos urónicos (Scheller, 2010). En el caso del residuo de la piña, la cadena principal recibe el nombre de xilano al tratarse de un polímero de xilosas con enlaces β -(1 \rightarrow 4) sustituidos por cadenas de L-arabinosa y D-ácido glucurónico, fácilmente hidrolizables. La aparición de estos dos azúcares se debe a la hidrólisis de la hemicelulosa por la acción de la hemicelulasa. Este complejo enzimático consta de enzimas que hidrolizan la cadena principal: las xilanasas y las β -xilosidasas (Shallom y Shoham, 2003); así como de las responsables de la hidrólisis de las ramificaciones de la hemicelulosa: las α -L-arabinofuranosidasas y las α -D-glucuronosidasas (Saha, 2005). Según puede observarse en la tabla 3, existe una mayor liberación de xilosa que de arabinosa al tratarse la primera del principal constituyente de la cadena lineal de xilano. Con todo ello, la hidrólisis enzimática permite incrementar en 10 g/L (53%) el contenido en azúcares totales del residuo sólido.

El término azúcares fermentables hace referencia, a lo largo de este trabajo, al conjunto formado por la glucosa, la fructosa y la sacarosa. Esto se debe a que estos son los azúcares naturalmente fermentables por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, microorganismo mejor estudiado y más utilizado a nivel industrial para la fermentación. No obstante existen en la actualidad diferentes bacterias (Lee et al., 2000; Cardona y Sánchez, 2007) y levaduras (Huang et al., 2009), así como cepas modificadas de *S. cerevisiae* capaces de fermentar tanto la glucosa, la fructosa y la sacarosa, como la xilosa y la arabinosa a etanol (Hahn-Hagerdal et al., 2007; Mussatto et al., 2010). Es por ello que el término azúcares totales hace referencia en este trabajo al conjunto formado por los azúcares fermentables, junto con la arabinosa y la xilosa.

Como consecuencia del aumento en azúcares totales, se constata un incremento en los SST (°Brix) del 68%. Por último, se aprecia un ligero descenso en el contenido de humedad del residuo hidrolizado debido a que la hidrólisis de un enlace glucosídico se lleva a cabo mediante la disociación de una molécula de agua del medio.

TABLA 3. Caracterización fisicoquímica y contenido en azúcares del residuo sólido hidrolizado y sin pretratamiento con microondas. 24 h de hidrólisis con 0.4% (m/m) celulasa y 0.1% (m/m) hemicelulasa¹.

Residuo sólido hidrolizado y sin pretratamiento con microondas									
SST (°Brix)	x _w (%)	pH	A (g/L)	G (g/L)	X (g/L)	F (g/L)	S (g/L)	AF (g/L)	AT (g/L)
6.4 (0.2)	91.4 (0.7)	4.28 (0.07)	0.59 (0.12)	16 (5)	0.61 (0.14)	10.1 (1.3)	1.6 (0.3)	28 (7)	29 (7)

¹Los valores se corresponden a la media de tres repeticiones (Desviación Estándar).
A: Arabinosa; G: Glucosa; X: Xilosa; F: Fructosa; S: Sacarosa; AF: Azúcares Fermentables; AT: Azúcares Totales.

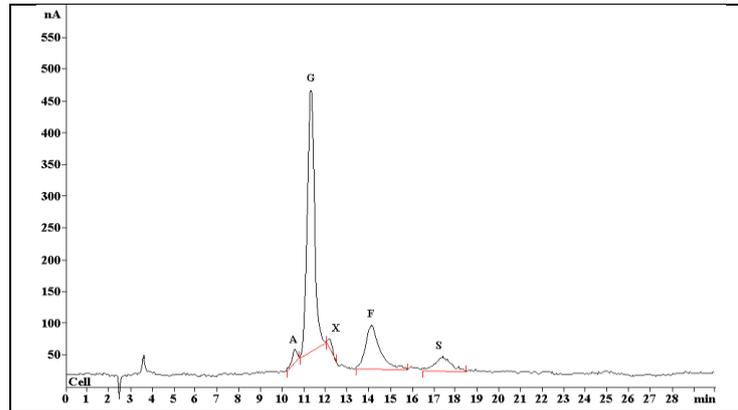


FIGURA 2. Cromatograma obtenido por cromatografía líquida de intercambio iónico del residuo hidrolizado sin pretratamiento (dilución 1:2000 v/v). A: Arabinosa; G: Glucosa; X: Xilosa; F: Fructosa; S: Sacarosa.

CARACTERIZACIÓN DEL RESIDUO PRETRATADO CON MICROONDAS E HIDROLIZADO ENZIMÁTICAMENTE

En la figura 3 se muestra el contenido en azúcares totales y fermentables del residuo sólido (RS), del residuo sólido hidrolizado enzimáticamente sin pretratamiento (SP) y del residuo sólido pretratado con microondas y sacarificado para cada uno de los tratamientos estudiados. Para evaluar el efecto del pretratamiento con microondas, se realizaron sendos ANOVA de tipo monofactorial para cada una de las potencias estudiadas (nivel de confianza del 95%) escogiendo como variables respuesta el contenido en azúcares totales y fermentables para cada tiempo de exposición al pretratamiento. El resultado del contraste de rango múltiple de este análisis se muestra también en la figura 3.

En general, se observó un comportamiento similar de los azúcares totales y de los azúcares fermentables para todos los tratamientos. Esto se debe a que la mayor proporción de los azúcares totales está compuesta por los azúcares fermentables, como se ha visto previamente.

Pretratar con microondas el residuo industrial de piña a 2.125 W/g no genera un incremento estadísticamente significativo del contenido en azúcares totales y fermentables con respecto al residuo hidrolizado sin pretratamiento. En este caso (figura 3A), los valores de azúcares obtenidos tras el pretratamiento para los diferentes tiempos de exposición oscilan alrededor del contenido en azúcares del residuo hidrolizado sin pretratamiento. El pretratamiento a una potencia ligeramente superior (4.25 W/g, figura 3B) generó un incremento del contenido en azúcares totales y fermentables a tiempos de exposición altos (a partir de 8 min) aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al residuo hidrolizado sin pretratamiento.

Por su parte, pretratar con microondas el residuo industrial de piña a 6.375 W/g y para cualquier tiempo de exposición produjo un incremento estadísticamente significativo del contenido en azúcares fermentables y totales con respecto al residuo hidrolizado sin pretratar como se aprecia en la figura 3.C. No obstante, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tiempos de exposición a las microondas, alcanzándose el mayor rendimiento en azúcares fermentables (40.65 g/L) y totales (41.93 g/L) a los 4 min de tratamiento.

El pretratamiento con microondas a 8.5 W/g (figura 3D) a tiempos cortos de exposición (hasta 3 min para los azúcares fermentables y hasta 4 min para los azúcares totales) provocó un incremento del contenido en azúcares totales y fermentables con respecto al residuo hidrolizado sin pretratamiento, aunque este efecto no resultó estadísticamente significativo. Por otro lado, se observa cierta tendencia a una disminución del rendimiento en azúcares en el residuo hidrolizado a medida que aumenta el tiempo de exposición.

Por último, el pretratamiento del residuo a 10.625 W/g y para cualquier tiempo de exposición generó un descenso del contenido en azúcares totales y fermentables con respecto al residuo hidrolizado sin pretratamiento, como se observa en la figura 3.E.



FIGURA 3. Contenido en azúcares totales y fermentables del Residuo Sólido (RS), del residuo no pretratado e hidrolizado enzimáticamente (SP) y del residuo pretratado con microondas e hidrolizado enzimáticamente: A) 2.125 W/g; B) 4.25 W/g; C) 6.375 W/g; D) 8.5 W/g; E) 10.625 W/g.

Algunos autores como De la Hoz et al. (2005) sugieren que el efecto de la aplicación de las microondas sobre las reacciones químicas se corresponde con la suma de los efectos térmicos y no térmicos. Los efectos térmicos surgen de las diferencias existentes entre el calentamiento convencional y el calentamiento dieléctrico por microondas. El calentamiento por microondas se basa en la capacidad de algunos compuestos (líquidos o sólidos) para transformar la energía eléctrica en calor, como consecuencia de dos mecanismos: la orientación e inducción dipolar y la conducción iónica (Lidström et al., 2001). De esta manera el empleo de microondas genera un calentamiento de elevada penetración que permite cambios estructurales masivos a diferencia del calentamiento por conducción (Talens et al., 2013). Estas características hacen que el empleo de las microondas pueda mejorar el rendimiento de ciertos procesos bioquímicos al reestructurar el medio y facilitar el acceso de las enzimas al sustrato.

Los resultados obtenidos sugieren que a potencias bajas (2.125 W/g) no existe ningún efecto del pretratamiento con microondas en el rendimiento en azúcares fermentables y totales durante la hidrólisis enzimática. Esto se debería a que la potencia aplicada no sería suficiente para generar la desestructuración de la matriz lignocelulósica y, por lo tanto, no actuaría como facilitador de la posterior acción de las enzimas hidrolíticas. En el extremo opuesto, pretratar la matriz lignocelulósica a potencias elevadas (10.625 W/g) tampoco supondría un beneficio puesto que disminuye el contenido en azúcares totales y fermentables en el residuo hidrolizado con respecto al que no ha sido pretratado. De hecho, algunos autores sugieren que a potencias elevadas, la temperatura alcanzada durante el pretratamiento puede provocar la degradación de los azúcares, produciéndose así un efecto contrario al deseado (Zhu et al., 2005).

No obstante, a potencias intermedias sí se observa un efecto positivo del pretratamiento con microondas sobre la desestructuración de la matriz lignocelulósica. En concreto, a potencias intermedias bajas (4.25 W/g) el mayor rendimiento en azúcares fermentables y totales se obtiene para tiempos de exposición altos. Para potencias intermedias altas (8.5 W/g), las mayores concentraciones se alcanzan a tiempos cortos de exposición mientras que para potencias intermedias de pretratamiento (6.375 W/g), cualquier tiempo de exposición al microondas favorece la hidrólisis enzimática.

Considerando todos los tratamientos, el análisis estadístico mostró que el mayor contenido en azúcares fermentables y totales se obtiene para cualquier tratamiento a 6.375 W/g, a 4.25 W/g entre 11-14 min y a 8.5 W/g entre 1-3 min, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas con respecto a los valores correspondientes al residuo hidrolizado sin pretratamiento. Para ello se realizaron ANOVA monofactoriales (nivel de confianza del 95%) escogiendo como variables respuesta el contenido en azúcares totales y fermentables y como factores cada combinación de potencia y tiempo de exposición. De esta manera, pretratar el residuo sólido a 6.375 W/g durante 4 min genera un incremento del 47% para los azúcares fermentables y del 46% para los totales comparándolo con el residuo sólido hidrolizado sin pretratar y del 123% con respecto al residuo sólido inicial.

Por otra parte, los resultados correspondientes a la caracterización fisicoquímica (SST, humedad y pH) del residuo pretratado con microondas a diferentes potencias e hidrolizado, se resumen en la tabla 4. Según puede apreciarse, el contenido en humedad de las muestras pretratadas con microondas es, en general, inferior al del residuo hidrolizado que no ha recibido pretratamiento. Esto se debería, como se ha comentado previamente, a que la hidrólisis enzimática genera un descenso de la humedad del residuo y la hidrólisis enzimática se produce en mayor proporción cuando se realiza el pretratamiento con microondas. Además, el análisis estadístico (ANOVA monofactorial, nivel de confianza del 95%) mostró que no existían diferencias estadísticamente significativas entre los distintos pretratamientos con respecto a la humedad.

El contenido en SST (°Brix) para cada tratamiento siguió en general una tendencia similar a la de los azúcares totales y fermentables, incrementándose a medida que aumentan los azúcares en el residuo pretratado e hidrolizado. Por último, el pH no varía de manera significativa en ninguno de los tratamientos estudiados.

TABLA 4. Caracterización fisicoquímica del residuo sólido hidrolizado pretratado con microondas.¹

Tratamiento (W/g)	Determinaciones	Tiempo (min)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2.125	SST (°Brix)	6.4 (0.14) ^{ab}	6.7 (0.14) ^{cdef}	6.8 (0.5) ^{def}	6.80 (0.07) ^{ef}	6.8 (0.2) ^{ef}	6.78 (0.12) ^{ef}	6.88 (0.10) ^f	6.85 (0.14) ^f	6.75 (0.07) ^{ef}	6.75 (0.14) ^{ef}
	x _w (%)	91.6 (0.7) ^c	91.4 (0.7) ^{abc}	90.9(0.6) ^{ab}	91.4 (0.6) ^{abc}	90.9 (0.3) ^{ab}	91.5 (0.9) ^{abc}	91.4 (0.8) ^{abc}	91.30 (0.14) ^{abc}	91.2 (0.2) ^{abc}	91.0 (0.3) ^{abc}
	pH	4.47 (0.14) ^a	4.39 (0.16) ^a	4.40 (0.18) ^a	4.39 (0.04) ^a	4.37 (0.07) ^a	4.38 (0.09) ^a	4.39 (0.10) ^a	4.36 (0.04) ^a	4.42 (0.07) ^a	4.410 (0.011) ^a
4.25	SST (°Brix)	6.8 (0.2) ^{ab}	6.63 (0.18) ^{ab}	6.6 (0.3) ^{ab}	6.80 (0.14) ^{ab}	6.70 (0.14) ^{ab}	6.75 (0.07) ^{ab}	6.74 (0.08) ^{ab}	6.88 (0.10) ^b	6.7 (0.2) ^{ab}	6.75 (0.07) ^{ab}
	x _w (%)	90.9 (0.6) ^a	91.6 (0.6) ^a	91.1 (0.8) ^a	91.4 (0.2) ^a	90.943 (0.008) ^a	91.3 (0.0) ^a	91.55 (0.04) ^a	91.39 (0.07) ^a	91.30 (0.10) ^a	90.9 (0.2) ^a
	pH	4.28 (0.16) ^a	4.39 (0.16) ^a	4.27 (0.04) ^a	4.27 (0.08) ^a	4.31 (0.06) ^a	4.25 (0.10) ^a	4.30 (0.14) ^a	4.34 (0.10) ^a	4.3 (0.2) ^a	4.30 (0.07) ^a
6.375	SST (°Brix)	6.50 (0.08) ^a	6.7 (0.2) ^a	6.8 (0.4) ^a	6.7 (0.2) ^a	6.9 (0.4) ^a	6.8 (0.2) ^a	6.75 (0.07) ^a	6.80 (0.12) ^a	6.80 (0.13) ^a	6.68 (0.10) ^a
	x _w (%)	91.1 (0.2) ^a	91.3 (0.7) ^a	91.3 (1.1) ^a	91.3 (0.4) ^a	91.1 (0.7) ^a	90.95 (0.16) ^a	91.1 (0.2) ^a	90.9 (0.14) ^a	91.2 (0.8) ^a	91.4 (0.8) ^a
	pH	4.39 (0.07) ^a	4.33 (0.07) ^a	4.27 (0.05) ^a	4.3 (0.8) ^a	4.390 (0.010) ^a	4.24 (0.03) ^a	4.26 (0.05) ^a	4.4 (0.2) ^a	4.30 (0.10) ^a	4.27 (0.06) ^a
8.5	SST (°Brix)	6.7 (0.5) ^a	6.61 (0.16) ^a	6.6 (0.2) ^a	6.5 (0.4) ^a	6.5 (0.3) ^a	6.5 (0.4) ^a	6.7 (0.5) ^a	6.6 (0.5) ^a		
	x _w (%)	92.3 (0.9) ^a	91.5 (0.7) ^a	91.4 (0.5) ^a	91.05 (0.06) ^a	91.2 (1.0) ^a	91.4 (0.5) ^a	91.1 (0.6) ^a	91.1 (0.5) ^a		
	pH	3.31 (1.0) ^a	3.6 (0.8) ^{ab}	3.8 (0.4) ^{ab}	4.015 (0.007) ^{ab}	4.2125 (0.4) ^{ab}	4.6 (0.6) ^{ab}	4.8 (1.0) ^{ab}	5.2 (1.3) ^b		
10.625	SST (°Brix)	6.4 (0.14) ^a	6.53 (0.17) ^a	6.4 (0.4) ^a	6.5 (0.2) ^a	6.50 (0.07) ^a	6.3 (0.3) ^a				
	x _w (%)	91.280 (0.002) ^a	91.1 (0.4) ^a	90.5 (1.0) ^a	90.9 (0.9) ^a	91.00 (0.10) ^a	91.4 (0.5) ^a				
	pH	4.27 (0.15) ^a	4.19 (0.13) ^a	4.24 (0.04) ^a	4.24 (0.04) ^a	4.20 (0.04) ^a	4.29 (0.07) ^a				

[...] Continuación Tabla 4.

Tratamiento (W/g)	Determinaciones	Tiempo (min)									
		11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
2.125	SST (°Brix)	6.7 (0.2) ^{cdef}	6.64 (0.05) ^{bcdef}	6.73 (0.04) ^{def}	6.70 (0.04) ^{cdef}	6.78 (0.12) ^{ef}	6.53(0.04) ^{abcdef}	6.5 (0.3) ^{abcd}	6.50 (0.09) ^{abcde}	6.44 (0.05) ^{abc}	6.34 (0.02) ^a
	x _w (%)	91.2 (0.4) ^{abc}	91.8 (0.3) ^{bc}	91.5 (0.4) ^{abc}	90.7 (0.4) ^a	91.4 (0.4) ^{abc}	91.4 (0.5) ^{abc}	91.4 (0.4) ^{abc}	92.0 (0.4) ^{abc}	91.4 (0.3) ^{abc}	91.4 (0.4) ^{abc}
	pH	4.4 (0.2) ^a	4.5 (0.2) ^a	4.44 (0.04) ^a	4.34 (0.13) ^a	4.425 (0.007) ^a	4.42 (0.13) ^a	4.33 (0.14) ^a	4.3 (0.2) ^a	4.28 (0.07) ^a	4.3 (0.2) ^a
4.25	SST (°Brix)	6.7 (0.0) ^{ab}	6.66 (0.12) ^{ab}	6.55 (0.07) ^a	6.58 (0.03) ^a						
	x _w (%)	91.1 (0.4) ^a	91.5 (1.0) ^a	91.720 (0.010) ^a	91.4 (0.4) ^a						
	pH	4.188 (0.003) ^a	4.30 (0.04) ^a	4.30 (0.10) ^a	4.34 (0.02) ^a						

¹ Los valores se corresponden a la media de tres repeticiones (Desviación Estándar).

^{a,b,c} Superíndices similares indican grupos estadísticamente homogéneos con un nivel de confianza del 95%.

EFFECTO DE LA CONGELACIÓN SOBRE EL PRETRATAMIENTO CON MICROONDAS

Durante el proceso de congelación se produce la cristalización de las moléculas de agua, pasando del estado líquido al sólido. Los cristales de hielo se forman alrededor de un núcleo de cristalización, al cual se agregan moléculas de agua adecuadamente orientadas en la estructura cristalina que hacen crecer el cristal a medida que el proceso de congelación avanza. En este fenómeno son importantes dos factores: la velocidad de formación de los núcleos de cristalización y la velocidad de crecimiento de los cristales de hielo. En concreto, si los cristales de hielo se forman lentamente, es decir, cuando se forman a tasas lentas de congelación, se producirá un número relativamente pequeño de centros de nucleación y por consiguiente de cristales de hielo, los cuales tendrán una tasa de crecimiento elevada. Por lo tanto cuando se congela lentamente un producto, se generan pocos cristales de hielo pero de gran tamaño, lo que puede producir deformaciones y roturas celulares irreversibles. Según se ha comentado anteriormente, es necesario conocer si una congelación previa al pretatamiento favorecería la acción de las microondas y enmascararía los resultados obtenidos en el apartado anterior (efectos solapados). Para comprobarlo se caracterizaron fisicoquímicamente y se determinaron los perfiles de azúcares de dos muestras, una de ellas congelada y la otra sin congelar, pretratadas con microondas e hidrolizadas enzimáticamente. Estos análisis y el resultado del contraste de rango múltiple para las medias de cada uno de los parámetros medidos y escogiendo como variable respuesta la congelación (ANOVA monofactorial, nivel de confianza del 95%), se resumen en la tabla 5.

TABLA 5. Caracterización fisicoquímica y contenido en azúcares totales y fermentables del residuo congelado y sin congelar, pretratado con microondas e hidrolizado enzimáticamente¹.

Congelación	SST (°Brix)	pH	x _w (%)	Azúcares Fermentables (g/L)	Azúcares Totales (g/L)
No	7.08 (0.04) ^a	4.46 (0.04) ^a	89.34 (0.08) ^a	46.2 (1.7) ^a	48 (2) ^a
Sí	7.18 (0.11) ^a	4.44 (0.04) ^a	89 (1) ^a	50.8 (0.9) ^a	52.5 (0.7) ^a

¹ Los valores se corresponden a la media de tres repeticiones (Desviación Estándar).

^{a,b,c} Superíndices similares indican grupos estadísticamente homogéneos con un nivel de confianza del 95%.

Según el análisis estadístico, no existen diferencias estadísticamente significativas en el contenido en azúcares totales y fermentables, SST (°Brix), pH y humedad entre la muestra congelada y la muestra sin congelar. No obstante, se observa que la muestra congelada tiene una cantidad ligeramente superior de azúcares que la muestra sin congelar y por lo tanto de SST (°Brix), lo que sugeriría cierto efecto de la congelación sobre la estructura lignocelulósica. En cualquier caso, puesto que este efecto no resulta significativo, se podría afirmar que el hecho de conservar la muestra en congelación no interferiría sobre los resultados obtenidos en el presente trabajo.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que, en general, pretratar con microondas el residuo sólido de la piña permite mejorar el proceso de hidrólisis enzimática. Esto es el resultado de la suma de los efectos térmicos (calentamiento volumétrico, selectivo y rápido) y no térmicos sobre la matriz lignocelulósica que pueden facilitar la ruptura de la estructura lignocelulósica y favorecer la hidrólisis enzimática. Los pretratamientos a 6.375 W/g, a 4.25 W/g entre 11-14 min y a 8.5 W/g entre 1-3 min generaron un incremento estadísticamente significativo de los azúcares totales y fermentables con respecto a la muestra hidrolizada sin pretratamiento. En concreto, en la muestra pretratada a 6.375 W/g durante 4 min se produjo un incremento del 47 % para los azúcares fermentables y del 46% para los totales con respecto al residuo sólido hidrolizado sin pretratamiento y del 123% con respecto al residuo sólido inicial. Por otro lado, se demostró que la congelación previa al empleo de las microondas no interfiere significativamente en los resultados.

Futuros trabajos se centrarán en el estudio de los cambios (micro) estructurales producidos en la estructura lignocelulósica para entender mejor el efecto del pretratamiento con microondas, como por ejemplo examinar las muestras mediante microscopía electrónica de barrido de congelación (Cryo-SEM). Por otro lado, es necesario la realización de estudios utilizando microondas continuos de tipo industrial para determinar el beneficio potencial (rendimiento y económico) del empleo de pretratamientos con microondas a escala industrial. Además sería conveniente analizar la eficacia de un pretratamiento combinando el efecto de las microondas junto con un pretratamiento químico convencional, es decir, en medio alcalino o ácido.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dedicar estas líneas a aquellas personas que han hecho posible que este trabajo final de máster sea una realidad.

A toda mi familia, especialmente a mis padres, por su apoyo, sus consejos y la motivación constante que me han brindado para concluir esta tesina.

Agradecerles también a mis amigos, que con su entusiasmo y cariño me alentaron a continuar.

También a mis compañeros y profesores del Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IIAD), especialmente a la Dra. Milagro Reig por su paciencia y ayuda con la cromatografía.

A mi directora de trabajo final de máster, la Dra. Lucía Seguí, por su sabiduría, esfuerzo y dedicación para la elaboración de esta tesina.

Y, en especial a mi directora, compañera, y sobretodo amiga Claudia Conesa. Porque después de todo este año tan difícil de sonrisas y lágrimas, de alegrías y decepciones, siempre has estado ahí animándome y apoyándome, sin nunca aflojar, porque eres una de las mejores personas que he conocido, por todo lo que me has enseñado y porque trabajar contigo es una aventura en la que superar obstáculos se convierte en algo sencillo y relativo. Gracias por toda tu comprensión y ayuda, sin tu apoyo no habría sido posible. Te deseo siempre lo mejor de todo corazón, ¡Mucho ánimo y sigue así!

Y a todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de este trabajo, mi mayor agradecimiento y gratitud.

REFERENCIAS

- Abdullah, A. y Mat, H. (2008). Characterization of solid and liquid pineapple waste. *Reaktor*, 12: 48-52.
- Azuma, J.; Tanaka, F.; Koshijima, T. (1984). Enhancement of enzymatic susceptibility of lignocellulosic wastes by microwave irradiation. *Journal of Fermentation Technology*, 62: 377-384.
- Ban-Koffi, L; Han, Y. W. (1990). Alcohol production from pineapple waste. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 6: 281-284.
- Cardona, C. A. y Sánchez, O. J. (2007). Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology*, 98: 2415-2457.
- Datta, A. K. (2001). Fundamentals of heat and moisture transport for microwaveable food product and process development. En: Datta, A. K.; Anantheswaran, R. C. Editors. *Handbook of microwave technology for food applications*. New York: Marcel Dekker Inc., New York, 115-172.
- De la Hoz, A.; Diaz-Ortiz, A.; Moreno, A. (2005) Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwaves effects. *Chemical Society Reviews*, 34: 164-168.
- FAO. FAOSTAT database [en línea]. Dirección URL: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>> [Consulta 18 Abril 2013]
- Fengel, D. y Wegener, G. (1984). Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions. De Gruyter, Berlin.
- Goyal, A.; Ghosh, B.; Eveleigh, D. 1991. Characteristics of fungal cellulose. *Bioresource Technology*, 36: 37-50.
- Hahn-Hagerdal, B.; Karhumaa, K.; Fonseca, C.; Spencer-Martins, I.; Gorwa-Grauslund, M. F. (2007). Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 113: 1207-1209.
- Hu, Z. y Wen, Z. (2008). Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment. *Biochemical Engineering Journal*, 38: 369-378.
- Huang, C. F.; Lin, T. H.; Guo, G. L.; Hwang, W. S. (2009). Enhanced ethanol production by fermentation of rice straw hydrolysate without detoxification using a newly adapted strain of *Pichia stipitis*. *Bioresource Technology*, 100: 3914-3920.
- Ketnawa, S.; Chaiwut, P.; Rawdkuen, S. (2012). Pineapple wastes: A potential source for bromelain extraction. *Food and Bioproducts Processing*, 90: 385-391.
- Kitchaiya, P.; Intanakul, P.; Krairish, M. (2003). Enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic wastes by microwave pretreatment under atmospheric pressure. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 23: L 217-225.
- Lee, W. J.; Ryu, Y. W.; Seo, J. H. (2000). Characterization of two-substrate fermentation processes for xylitol production using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing xylose reductase gene. *Process Biochemistry*, 35: 1199-1203.
- Lidström, P.; Tierney, J.; Wather, B.; Westman, J. (2001). Microwave assisted organic synthesis. A review. *Tetrahedron*, 57: 9225-9283.

- Liu, C. G. y Wyman, C. E. (2005). Partial flow of compressed-hot water through corn stover to enhance hemicellulose sugar recovery and enzymatic digestibility of cellulose. *Bioresource Technology*, 96: 1978–1985.
- Mosier, N.; Wyman, C.; Dale, B.; Elander, R.; Lee, Y. Y.; Holtzapple, M.; Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 96: 673-686.
- Mussatto, S. I.; Dragone, G.; Guimaraes, P. M. R.; Silva, J. P. A.; Carneiro, L. M.; Roberto, I. C.; Vicente, A.; Domingues, L.; Teixeira, J. A. (2010). Technological trends, global market and challenges of bioethanol production. *Biotechnology Advances*, 28: 1873-1899.
- Nigam, J.N. (1999). Continuous ethanol production from pineapple cannery waste. *Journal of Biotechnology*, 72: 197-202
- Ooshima, H.; Aso, K.; Harano, Y. (1984). Microwave treatment of cellulosic materials for their enzymatic hydrolysis. *Biotechnology Letters*, 6: 289-294.
- Ruangviriyachai, C.; Niwaswong, C.; Kosaikanon, N.; Chanthai, S.; Chaimart, P. (2010). Pineapple Peel Waste for Bioethanol Production. *Journal of Biotechnology*, 150: 10.
- 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.
- Sasaki, K.; Noparatnaraphorn, N.; Nagai, S. (1991). Use of photosynthetic bacteria for the production of SCP and chemicals from agro industrial waste. In *Bioconversion of waste material to industrial product*. Editorial Martin A.M. Elsevier Applied Science, London: 225-233.
- Scheller, H. V. y Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review Plant Biology*, 61: 263-289.
- Shallom, D. y Shoham, Y. (2003). Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology*, 6: 219-228.
- Sun, Y. y Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83: 1–11.
- Taherzadeh, M. J. y Karimi, K. (2007) "Process for etanol from lignocellulosic materials I: Acid-based hydrolysis processes". *Bioresources*, 2: 472-499.
- Talens, C.; Castro-Giráldez, M.; Bald, C.; Fito, P.J. (2013). Thermodynamic model of microwave drying of citrus peel with different treatments. *Book of Proceedings: InsideFood Symposium 2013*.
- Tanaka, K.; Hilary, Z. D.; 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.
- Ting, C. L.; Makarov, D. E.; Wang, Z. G. (2009). A Kinetic Model for the Enzymatic Action of Cellulase. *The Journal of Physical Chemistry*, 113: 4970-4977.
- Xiong, J.; Ye, J.; Liang, W. Z.; Fan, P. M. (2000). Influence of microwave on the ultrastructure of cellulose I. *J South China University of Technology*, 28: 84-89.
- Zhu, S. D.; Wu, Y. X.; Yu, Z. N. (2005). Pretreatment by microwave/alkali of rice straw and its enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry*, 40: 3082-3086.
- Zhu, S. D.; Wu, Y. X.; Yu, Z. N. (2006). Microwave-assisted alkali pre-treatment of wheat straw and its enzymatic hydrolysis. *Biosystems Engineering*, 94: 437-442.