

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL  
MEDI NATURAL



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

***Estudio de la aplicación de microondas en medio alcalino  
como pretratamiento para la mejora de la hidrólisis  
enzimática del residuo de industrialización de piña para  
la producción de bioetanol***

TRABAJO FIN DE GRADO EN INGENIERÍA AGROALIMENTARIA Y DEL MEDIO RURAL

ALUMNA: Dña. ANDREA MESA NAVARRO

TUTORA ACADÉMICA: Dra. LUCÍA SEGUÍ GIL

COTUTORA COLABORADORA: Dña. CLAUDIA CONESA DOMÍNGUEZ

**Curso Académico: 2014-2015**

**Valencia, 1 de Septiembre de 2015**

Licencia Creative Commons "Reconocimiento no Comercial –Sin Obra Derivada"



## ***Estudio de la aplicación de microondas en medio alcalino como pretratamiento para la mejora de la hidrólisis enzimática del residuo de industrialización de piña para la producción de bioetanol***

### **RESUMEN**

El bioetanol es uno de los biocombustibles más atractivos hoy en día, ya que se puede obtener en grandes cantidades y permite reducir las emisiones de gases contaminantes a la atmósfera. En concreto, el bioetanol de segunda generación producido a partir de la biomasa lignocelulósica residual es una fuente prometedora de combustible gracias principalmente a su disponibilidad y a la posibilidad de dar valor añadido a un producto de desecho.

No obstante, la matriz lignocelulósica necesita ser pretratada e hidrolizada para poder liberar los azúcares fermentables de los cuales se obtiene este biocombustible. Los pretratamientos y la hidrólisis pueden liberar al medio una cantidad importante de compuestos inhibitorios de la fermentación, como son los compuestos fenólicos procedentes de la degradación de la lignina, o el furfural y el hidroximetilfurfural procedentes de la degradación de los azúcares.

Los pretratamientos son importantes para que la hidrólisis enzimática se pueda llevar a cabo, ya que gracias a éstos se facilita el acceso de las enzimas hidrolíticas a la estructura, aumentando los rendimientos obtenidos. Se ha comprobado que las microondas, solas o combinadas con bases, incrementan la cantidad de azúcares liberados al medio durante la hidrólisis enzimática posterior.

La finalidad del presente trabajo es la de conocer el efecto de un pretratamiento combinado de microondas en medio alcalino en la posterior hidrólisis enzimática de residuo industrial de piña. Para tal fin, se aplicaron diferentes potencias (1,125 W/g, 4,24 W/g y 6,375 W/g) y tiempos de exposición (5 s, 10 s, 20 s, 40 s, 60 s, 120 s y 180 s) y se caracterizó el residuo antes y después de la hidrólisis en términos de sólidos solubles totales (SST), humedad ( $x_w$ ) y pH. Además, se determinó la presencia de compuestos inhibitorios e la fermentación (fenoles totales, furfural e hidroximetilfurfural) en el residuo hidrolizado. Finalmente, se estudiaron las temperaturas alcanzadas durante el pretratamiento por microondas mediante cámara termográfica y se analizaron los cambios estructurales mediante Cryo-SEM.

Los resultados obtenidos indican que el empleo de microondas en medio alcalino favorece el contenido en azúcares fermentables cuando la potencia aplicada es de 4,25 W/g y tiempos de exposición entre los 10 y 20 s. El contenido en fenoles e hidroximetilfurfural aumenta a medida que se incrementa la potencia aplicada y el tiempo de exposición. Esto se encuentra relacionado con el aumento de la temperatura registrada mediante termografía y con las modificaciones estructurales observadas en las micrografías.

Como conclusión general del presente trabajo se establece que un pretratamiento con microondas en medio alcalino favorece la liberación de azúcares fermentables durante la hidrólisis enzimática posterior, cuando se utilizan potencias y tiempos de exposición cortos, en los que, además, el contenido en compuestos inhibitorios de la fermentación es reducido.

Palabras clave: Pretratamiento, microondas, hidrólisis enzimática, bioetanol, biomasa lignocelulósica.

## ***Study of microwave application in an alkaline environment as a pretreatment to improve enzymatic hydrolysis of industrial pineapple waste for bioethanol production***

### **ABSTRACT**

Nowadays, bioethanol is one of the most important biofuels as it can be massively obtained and it reduces pollutant emissions into the atmosphere. Specifically, second generation bioethanol from lignocellulosic biomass wastes is a promising fuel source and it is mainly due to its availability and potential to give additional value to waste products.

However, the lignocellulosic matrix must be pretreated and hydrolyzed in order to liberate fermentable sugars that will produce bioethanol. Pretreatment and hydrolysis may liberate a considerable amount of fermentation inhibitory compounds such as phenolic compounds from lignin degradation and furfural and hydroxymethylfurfural from sugar degradation processes.

Pretreatments are important for enzymatic hydrolysis as they increase the efficiency of the process by facilitating the access of hydrolytic enzymes into the structure. It has been found that the amount of sugars released into the samples during the subsequent enzymatic hydrolysis are increased by both microwave pretreatments and combined microwave-alkali pretreatments.

The aim of this work is to determine the effect of a combined microwave-alkali pretreatment in the subsequent enzymatic hydrolysis of pineapple waste. To this end, different power (1.125 W / g, 4.24 W / g and 6.375 W / g) and exposure time (5 s, 10 s, 20 s, 40 s, 60 s, 120 s and 180 s) were applied. Next, the residue was characterized in terms of Total Soluble Solids (TSS), and moisture ( $x_w$ ), before and after the hydrolysis. Furthermore, the presence of fermentation inhibitory compounds (total phenols, furfural and hydroxymethylfurfural) in the hydrolyzed residue. Finally, temperatures of the samples were analyzed during the microwave pretreatment by means of a thermal camera. Structural changes were latter analyzed by Cryo-SEM.

Results show that the microwave-alkaly pretreatment promote the increase of fermentable sugars, specifically when the applied power is 4.25 W/g with the following exposure times: 10 s and 20 s. Phenol and hydroxymethylfurfural concentrations increased as power and exposure time were increased. This has to do with the registered temperature raise by the thermal camera and the structural changes observed in the Cryo-SEM pictures.

As a general conclusion, this study states that the combined microwave-alkaline pretreatment at low applied power and short exposure times promote the generation of fermentable sugars during the enzymatic hydrolysis. In addition, subsequent fermentation processes show low concentrations of fermentation inhibitory compounds.

Keywords: Pretreatment, microwave, enzymatic hydrolysis, bioethanol, lignocellulosic biomass.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han formado parte de esta experiencia y sin la ayuda de las cuales no habría sido posible la realización de este Trabajo Final de Grado.

Principalmente a la cotutora colaboradora Claudia Conesa Domínguez, por haber compartido conmigo todos sus conocimientos y sobre todo por su ayuda, cariño y comprensión constante a lo largo de estos meses.

A mi tutora Lucía Seguí Gil, por su constancia en el seguimiento de este trabajo, sus sugerencias y su apoyo incondicional.

A Milagro por todos los conocimientos que he adquirido al trabajar con ella en la última etapa de este proyecto.

A Nicolás por todas las herramientas que he podido emplear y que han sido fundamentales en el trabajo.

A mis compañeras de laboratorio (Belén, Jessica y Oriella) por haberme apoyado diariamente.

Agradecer a mi familia por todo su apoyo constante y sus consejos durante todo este tiempo.

Y por último, a mis amigos y compañeros de universidad, por todas las experiencias vividas, el apoyo recibido y el cariño.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1. DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL BIOETANOL</b> .....	1
<b>1.2. BIOMASA LIGNOCELULÓSICA</b> .....	2
1.2.1. Estructura de la biomasa lignocelulósica .....	2
<b>1.3. PROCESO DE OBTENCIÓN DEL BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN</b> .....	3
1.3.1. Hidrólisis enzimática .....	4
1.3.2. Fermentación de la biomasa lignocelulósica .....	4
1.3.3. Productos inhibidores de la fermentación .....	5
1.3.4. Pretratamientos de la biomasa lignocelulósica .....	6
1.3.5. Pretratamientos con microondas .....	8
<b>2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO</b> .....	10
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	11
<b>3.1. MATERIAL VEGETAL Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS</b> .....	11
<b>3.2. PRETRATAMIENTO DEL RESIDUO SÓLIDO DE PIÑA</b> .....	11
3.2.1. Pretratamiento alcalino .....	11
3.2.2. Pretratamiento con microondas en medio alcalino .....	11
<b>3.3. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA</b> .....	12
<b>3.4. CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DEL RESIDUO DE PIÑA</b> .....	12
3.4.1. Determinación del contenido en Sólidos Solubles totales (SST) .....	12
3.4.2. Determinación del contenido en humedad ( $x_w$ ) .....	12
3.4.3. Determinación del pH .....	13
<b>3.5. DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS INHIBITORIOS DE LA FERMENTACIÓN</b> .....	13
3.5.1. Contenido en fenoles totales .....	13
3.5.2. Contenido en Furfural e Hidroximetilfurfural .....	14
<b>3.6. ESTUDIO DEL CALENTAMIENTO POR MICROONDAS MEDIANTE IMÁGENES TERMOGRÁFICAS</b> .....	14

3.7.	CAMBIOS ESTRUCTURALES .....	15
3.8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	15
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
4.1.	CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA .....	16
4.1.1.	Contenido en sólidos solubles totales (SST) .....	16
4.1.2.	Humedad ( $x_w$ ) y pH .....	17
4.2.	COMPUESTOS INHIBITORIOS DE LA FERMENTACIÓN .....	18
4.2.1.	Contenido en fenoles totales .....	18
4.2.2.	Contenido en furfural (F) e hidroximetilfurfural (HMF) .....	20
4.3.	ANÁLISIS POR TERMOGRAFÍA. EVOLUCIÓN DE LA TEMPERATURA DURANTE EL PRETRATAMIENTO CON MICROONDAS.....	22
4.4.	ANÁLISIS DE LA CORRELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES DE ESTUDIO.....	27
4.5.	ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA DEL RESIDUO PRETRATADO MEDIANTE MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA (Cryo-SEM).....	28
5.	CONCLUSIONES.....	30
6.	BIBLIOGRAFÍA .....	31

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Principales mezclas de etanol y gasolina utilizadas como biocombustibles.....	2
<b>Figura 2.</b> Estructura de la biomasa lignocelulósica .....	2
<b>Figura 3.</b> Proceso de producción de etanol a partir de la biomasa lignocelulósica.....	3
<b>Figura 4.</b> Espectro electromagnético. ....	8
<b>Figura 5.</b> Mecanismos de calentamiento por microondas. ....	8
<b>Figura 6.</b> Diagrama del proceso de obtención de las muestras de residuo de piña triturado. ..	11
<b>Figura 7.</b> Refractómetro de mesa .....	12
<b>Figura 8.</b> Desecador y estufa a 63 °C.....	13
<b>Figura 9.</b> pHmetro digital con electrodo de contacto.....	13
<b>Figura 10.</b> Espectrofotómetro.....	14
<b>Figura 11.</b> HPLC equipado con desgasificador, modulo de separación y detector de matriz de fotodiodos.....	14
<b>Figura 12.</b> Cámara termográfica. ....	15
<b>Figura 13.</b> Equipo de Cryo-SEM acoplado a un microscopio electrónico de barrido. ....	15
<b>Figura 14.</b> Contenido en SST del residuo pretratado con microondas en medio alcalino (MMA) y posteriormente sacarificado.La línea discontinua representa el valor correspondiente al residuo pretratado en medio alcalino y sacarificado. <sup>a,b,c...</sup> Superíndices similares indican grupos estadísticamente homogéneos con un intervalo de confianza del 95%.....	16
<b>Figura 15.</b> Curva patrón de Acido gálico .....	19
<b>Figura 16.</b> Contenido en fenoles totales (mg EAG/mL)del residuo pretratado con microondas en medio alcalino (MMA). La línea discontinua representa el residuo pretratado en medio alcalino (MA) y sacarificado. <sup>a,b,c...</sup> Superíndices similares indican grupos estadísticamente homogéneos con un intervalo de confianza del 95%. ....	20
<b>Figura 17.</b> Cromatogramas correspondientes al: a) patrón de 100 ppm de HMF y b) patrón de 5 ppm de F.....	20
<b>Figura 18.</b> Cromatograma correspondiente a la muestra pretratada en MMA a 4,25 W/g – 60 s y sacarificado. Dilución metanol/agua 1:10 (m:v) .....	21
<b>Figura 19.</b> Contenido en hidroximetilfurfural del residuo pretratado con microondas en medio alcalino (MMA) y posteriormente sacarificado. La línea discontinua representa el valor correspondiente al residuo pretratado en medio alcalino y sacarificado. <sup>a,b,c...</sup> Superíndices similares indican grupos estadísticamente homogéneos con un intervalo de confianza del 95%. ....	21

**Figura 20.** Histograma correspondiente al residuo de piña en medio alcalino y pretratado con microondas a una potencia aplicada de 2,125 W/g y un tiempo de exposición de 20 s..... 25

**Figura 21.** Gráficos de evolución de: a) la temperatura promedio ( $T_{prom}$ ), b) la temperatura máxima ( $T_{max}$ ) y c) la temperatura mínima ( $T_{min}$ ) para las diferentes potencias aplicadas y los diferentes tiempos de exposición ..... 26



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Principales características de los pretratamientos físicos, fisicoquímicos, químicos y biológicos más utilizados en la actualidad (adaptada de Masiá et al., 2014). .....	7
<b>Tabla 2.</b> Contenido $x_w$ y pH del residuo pretratado en medio alcalino y sacarificado y del residuo pretratado con microondas en medio alcalino y sacarificado, según las diferentes potencias y tiempos aplicados.. <sup>a,b,c...</sup> Superíndices similares indican grupos estadísticamente homogéneos con un intervalo de confianza del 95%. .....	18
<b>Tabla 3.</b> Termografías correspondientes a la base del recipiente conteniendo el residuo de piña pretratado con microondas a distintas potencias (2,125 W/g, 4,25 W/g, 6,375 W/g) y tiempos 5 s → 180 s. ....	23
<b>Tabla 4.</b> Coeficientes de correlación de Pearson y significancia estadística para las distintas variables de estudio. ....	28
<b>Tabla 5.</b> Micrografías correspondientes al residuo de piña con diferentes tratamientos. ....	29

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL BIOETANOL

El bioetanol es un alcohol etílico obtenido a partir de la fermentación de la materia orgánica de distinta procedencia, principalmente: materiales azucarados (remolacha y caña de azúcar), productos amiláceos (cereales) y biomasa lignocelulósica (residuos de procesos agroindustriales).

El bioetanol es actualmente uno de los biocombustibles más atractivos puesto que se puede obtener en grandes cantidades mediante biorrefinería y utilizarse como oxigenante de la gasolina, elevando su contenido en O<sub>2</sub>, y por tanto disminuyendo las emisiones contaminantes de hidrocarburos no oxidados completamente (Sánchez y Cardona, 2005), como aditivo (reemplazando al éter metiltert-butílico (MTBE) responsable de la contaminación de suelos y del agua subterránea) o bien mezclarse con la gasolina convencional. De esta manera, se obtiene un combustible de alto poder energético con características muy similares a la gasolina convencional pero con menores emisiones de CO<sub>2</sub> y de partículas a la atmósfera (Sánchez y Cardona, 2008; González-García *et al.*, 2009; Chen y Qiu, 2010; Balat, 2011). Además, las mezclas de etanol con gasolina al 5 y al 10% (conocidas como gasohol), E5 y E10 respectivamente, no requieren modificaciones en los motores actuales.

No obstante, este biocombustible está sujeto a una fuerte polémica ya que el empleo de cultivos alimentarios como fuente de obtención de bioetanol (primera generación o 1G) ha generado un aumento de los precios de los alimentos como indican algunos autores (Xavier *et al.*, 2010). Además, se ha producido una deforestación de bosques para la implantación de cultivos ricoenergéticos, con el consecuente impacto negativo sobre el medioambiente (Mussatto *et al.*, 2010). Por lo tanto, una de las alternativas que más peso ha ganado en los últimos años es el uso de biomasa lignocelulósica de origen residual, es decir, de residuos procedentes de procesos agrícolas, forestales o industriales (Reshamwala *et al.*, 1995; Bjerre *et al.*, 1996; Duff y Murray, 1996). Este proceso de obtención de bioetanol es conocido como *Waste to Biofuels* (W2B) y el combustible así producido recibe el nombre de bioetanol de segunda generación o 2G, que permitiría diversificar las fuentes de suministro de energía sin competir con el mercado mundial de alimentos.

Brasil y Estados Unidos son los dos países en los que más se incentivan y se utilizan los biocombustibles, y muy especialmente el bioetanol. En Brasil, más de la mitad de los coches (1,3 millones) usan mezclas con el 25 % de bioetanol (E25), mientras que en EE.UU. hay ya seis millones de vehículos flexibles (FFV), con depósito, motor y sistema de combustible único capaz de funcionar con gasolina y etanol, solos o mezclados en cualquier proporción (Figura 1.). En Europa y otras zonas del mundo se está arrancando con fuerza en el uso de los biocombustibles, dadas las grandes ventajas económicas, sociales y medioambientales que supone, aunque todavía limitadas a un 10% de mezclas (E10). Las especificaciones para la utilización de bioetanol se compendian en la norma Europea de Gasolinas UNE-EN 228:2013, en España se encuentra transpuesta la Directiva 2003/17/CE relativa a la calidad de las gasolinas y gasóleo, en el Real Decreto R.D. 61/2006 de las especificaciones y uso de biocarburantes.

Code	E5	E10	E15	E25	E85	E100
<b>Composition</b>	max 5% anhydrous ethanol  min 95% gasoline	max 10% anhydrous ethanol  min 90% gasoline	max 15% anhydrous ethanol  min 85% gasoline	max 25% anhydrous ethanol  min 75% gasoline	max 85% anhydrous ethanol  min 15% gasoline	~5.3% water  100% Brazilian hydrous ethanol (contains on average 5.3 vol.% water)
<b>Countries</b>	Western Europe today	USA today (Western Europe in near future)	USA EPA approval cars > 2000	Brazil	USA / Europe	Brazil

Gasoline blends for use in regular cars

Flex Fuel Vehicles

Figura 1. Principales mezclas de etanol y gasolina utilizadas como biocombustibles.

## 1.2. BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

La biomasa lignocelulósica que incluye residuos agrícolas, forestales, agroindustriales entre otros, comprende aproximadamente el 50% de la biomasa mundial (Claassen *et al.*, 1999) y es rica en polímeros de celulosa y hemicelulosa (entre el 75-80%) susceptibles de ser degradados a azúcares más simples. No obstante, aunque es posible mediante procesos físicos, químicos y/o biológicos desdoblarlos a azúcares monosacáridos para su posterior conversión a etanol (Sánchez *et al.*, 2010), la biomasa lignocelulósica es en general difícil de degradar.

### 1.2.1. Estructura de la biomasa lignocelulósica

Los materiales lignocelulósicos están formados principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, envueltos en una compleja estructura (Fengel y Wegener, 1984), como se observa en la Figura 2.

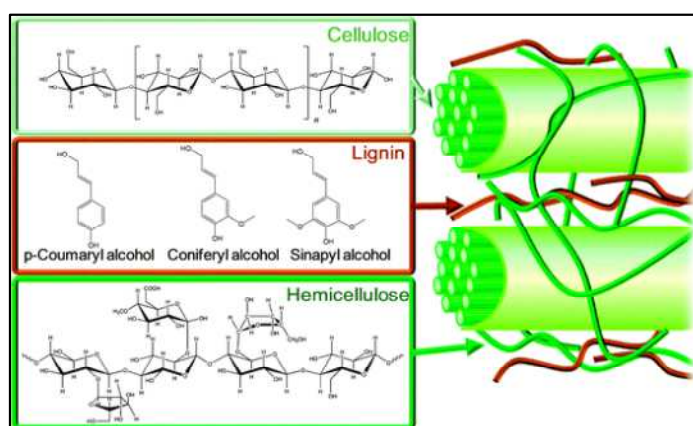
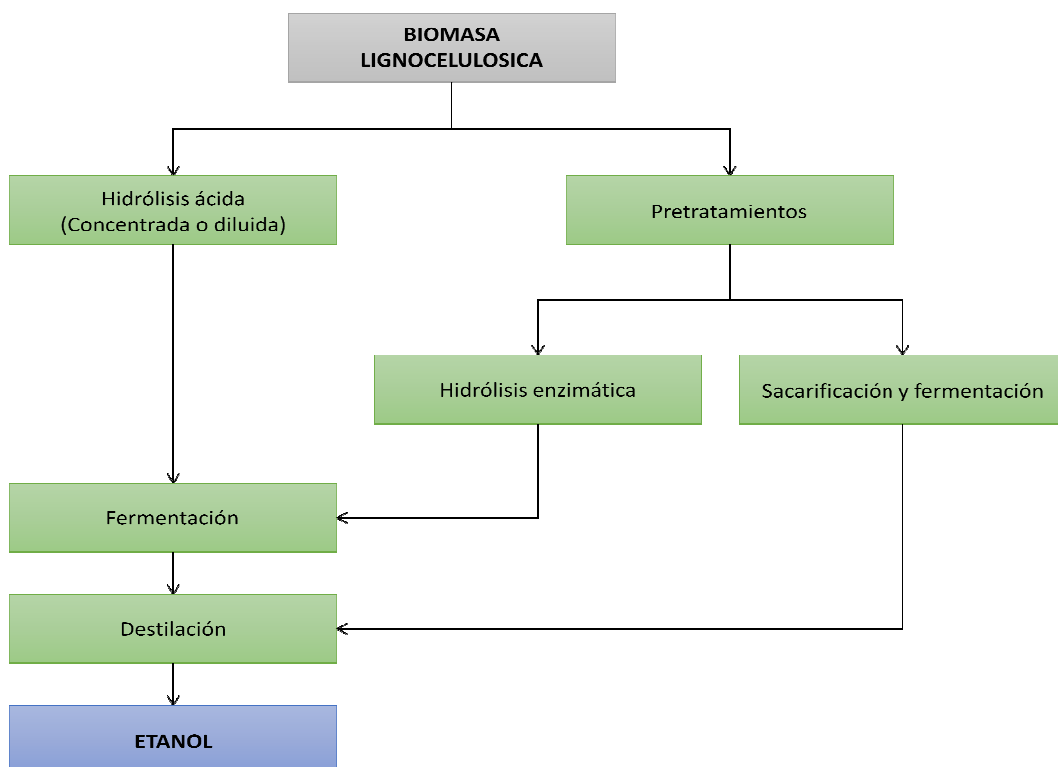


Figura 2. Estructura de la biomasa lignocelulósica (Martín-Alonso *et al.*, 2012).

Las moléculas de celulosa, conocidas como microfibrillas, se organizan en largas cadenas lineales de D-glucosa, unidas por enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos. Estas microfibrillas están unidas entre sí por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals intramoleculares y recubiertas por hemicelulosa y lignina (Laureano-Perez *et al.*, 2005). La hemicelulosa es un polímero complejo de heteropolisacáridos formado por pentosas (como xilosa y arabinosa) y hexosas (como manosa, glucosa y galactosa). Sirve de conexión entre la lignina y las microfibrillas de celulosa, dando toda la rigidez a la red compleja que confeccionan estos tres polímeros (Laureano-Perez *et al.*, 2005). En el caso del residuo de la piña, sobre el que se centrará el presente trabajo, la cadena principal lineal de hemicelulosa recibe el nombre de xilano, puesto que es un polímero de xilosas unidas por enlaces  $\beta$ -1,4. Por último, la lignina es un heteropolisacárido amorfo compuesto por ácidos y alcoholes fenilpropílicos que no son solubles en agua y ópticamente inactivo lo que provoca que esta sea muy difícil de degradar (Harmsen *et al.*, 2010; Fengel y Wegener, 1984).

### 1.3. PROCESO DE OBTENCIÓN DEL BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN

En el proceso de obtención de bioetanol se obtiene un alcohol hidratado, con un contenido aproximado del 5% de agua, que tras ser deshidratado se puede utilizar como combustible. En la Figura 3. se muestran las diferentes etapas de producción de este biocombustible.



**Figura 3.** Proceso de producción de etanol a partir de la biomasa lignocelulósica.

### 1.3.1. Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática es un proceso catalizado por enzimas denominadas celulasas y hemicelulasas, cuyo propósito es la degradación de la celulosa y la hemicelulosa a mono y disacáridos fermentables, y puede ser de dos tipos: ácida o enzimática (Sánchez *et al.*, 2010). El uso de diferentes pretratamientos, principalmente en el caso de la hidrólisis enzimática tal y como se explicará más adelante, facilita el desarrollo de esta etapa.

La principal ventaja de la hidrólisis ácida es que el ácido puede penetrar en la lignina sin necesidad de pretratar la biomasa. No obstante, las altas temperaturas alcanzadas durante el proceso pueden generar compuestos tóxicos que inhiben la fermentación alcohólica de las levaduras (Kootstra *et al.*, 2009).

En general, la tendencia actual es la de utilizar enzimas hidrolíticas producidas por hongos filamentosos como: *Sclerotium rolfsii*, *Phanerochaete chrysosporium* y especies de *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* y *Penicillium* (Duff y Murray, 1996) para llevar a cabo la sacarificación o hidrólisis enzimática. Estos hongos filamentosos segregan dos tipos de complejos enzimáticos: las celulasas que hidrolizan la celulosa a pequeños oligosacáridos y posteriormente a glucosa, y las hemicelulasas que hidrolizan la hemicelulosa a azúcares monoméricos (Sehnm *et al.*, 2006). La hidrólisis enzimática daría lugar a una menor producción de compuestos no deseados inhibitorios de la fermentación; no obstante, los pretratamientos, necesarios en la mayoría de los casos, sí producirían la liberación de algunos de dichos compuestos.

### 1.3.2. Fermentación de la biomasa lignocelulósica

La fermentación y la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica pueden ser simultáneas (SSF: Simultaneous Saccharification and Fermentation) o consecutivas (SHF: Separate Hydrolysis and Fermentation). La SSF muestra mayores rendimientos de etanol y menores consumos energéticos que la SHF, pero las temperaturas de operación no son óptimas para la hidrólisis y se requiere de mayores dosis de enzimas (Wyman *et al.*, 1992).

En la actualidad, existen diferentes especies de bacterias, levaduras y hongos filamentosos capaces de fermentar los azúcares a etanol. Algunos de ellos sólo pueden metabolizar las hexosas mientras que otros también fermentan las pentosas, aunque con rendimientos mucho más bajos (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007).

Las levaduras son las más empleadas en la fermentación, ya que aunque son más lentas en la ejecución del proceso de fermentación, poseen una alta productividad, baja producción de inhibidores y mayor facilidad de separación tras la fermentación (Sánchez *et al.*, 2010). En concreto, la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, capaz de fermentar la glucosa, fructosa y sacarosa, es el microorganismo más utilizado para la fermentación alcohólica. *S. cerevisiae* se emplea con éxito a escala industrial debido a sus altos rendimientos y a su elevada tolerancia al etanol y otros inhibidores usualmente presentes en los residuos lignocelulósicos (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007; Matsushika *et al.*, 2009), además de ser capaz de trabajar a temperaturas mayores a los 40 °C (Krishna *et al.*, 2001).

Por otro lado, algunas levaduras como *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* y *Pachysolen tannophilus* y cepas genéticamente modificadas de *S. cerevisiae* son capaces de convertir también las pentosas a etanol (Huang *et al.*, 2009).

### 1.3.3. Productos inhibidores de la fermentación

La aplicación de diferentes pretratamientos al residuo puede ocasionar la aparición de los compuestos inhibitorios de la fermentación, los cuales se pueden clasificar en función de su origen y de su proceso de hidrólisis (Parajó *et al.*, 1998; Mussatto *et al.*, 2004):

- **Productos de la degradación de los azúcares:** derivados del furano formados durante la hidrólisis. Principalmente:
  - o Furfural (F): producto de la degradación de las pentosas (xilosa y arabinosa). Este compuesto pueden reducir la tasa específica de crecimiento celular, disminuir la productividad volumétrica y específica de etanol y la producción de biomasa, generar daños en la membrana plasmática celular e inhibir la acción enzimática (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000). El F inhibe la alcohol deshidrogenasa, induciendo la formación de acetaldehído. En anaerobiosis el F se degrada a alcohol furfurílico y furoico (Oliva, 2003).
  - o 5-hidroximetilfurfural (HMF): producto de la degradación de las hexosas (glucosa, manosa y galactosa). Los efectos producidos por el HMF son menores que el F, pero son los mismos. Se ha comprobado que el HMF aumenta la duración de la fase de latencia y disminuye el crecimiento celular (Delgenes *et al.*, 1996; Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000). Mussatto *et al.* (2004) demostraron que se produce un efecto sinérgico cuando estos compuestos se combinan con otros formados durante la degradación de la lignina.

La concentración de estos compuestos de degradación dependerá en gran medida de las condiciones utilizadas en el tratamiento. De este modo, aquellos que utilicen ácidos como agente hidrolítico, y/o desarrollen condiciones a altas temperaturas y/o altos tiempos de reacción, producirán F e HMF, en mayor concentración que aquellos tratamientos que no lo usen (Wyman, 2007). Los procesos que se desarrollan en condiciones alcalinas no producen aldehídos furánicos ya que éstos no son estables en estos medios, tendiendo a dar reacciones de condensación.

- **Productos de la degradación de la lignina:** compuestos aromáticos, poliaromáticos, fenólicos y aldehídos. Se consideran más tóxicos para los microorganismos que el F e HMF, incluso a concentraciones muy bajas.
  - o Los compuestos fenólicos (ácido 4-hidroxibenzoico, vanilina, catecol, siringaldehído, etc.) presentes en los hidrolizados son los productos más tóxicos para los microorganismos. Generan una pérdida de integridad de las membranas biológicas, afectando su capacidad como barrera selectiva y como matrices enzimáticas y disminuyendo el crecimiento celular y la asimilación de azúcares de los microorganismos (Parajó *et al.*, 1998; Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000).
- **Compuestos derivados de los agentes de extracción:** resinas ácidas, tánicas, ácidos terpénicos y también ácido acético derivado de grupos acetilo presentes en la

hemicelulosa que son liberados durante los procesos hidrolíticos. En términos de toxicidad, los extractos se consideran menos tóxicos para el crecimiento microbiano, que los derivados de la lignina o ácido acético (Mussatto *et al.*, 2004).

- Ácido gálico y pirogálico (pirogalol). Son compuestos fenólicos de bajo peso molecular, normalmente formados a partir de los taninos hidrolizables (Marques *et al.*, 2009), de los que algunos autores han demostrado propiedades antifúngicas (Dix, 1979; Panizzi *et al.*, 2002; Upadhyay *et al.*, 2010).
- El ácido acético es un conocido agente antimicrobiano. A pH bajo, en la forma no disociada, puede difundirse a través de la membrana celular, promoviendo la disminución de la actividad de las células citoplasmáticas e incluso causando la muerte celular (Lawford *et al.*, 1998; Mussatto *et al.*, 2004). El grado de inhibición del ácido acético no sólo depende de su concentración, sino también de la concentración de oxígeno y del pH del medio de fermentación (Vanzyl *et al.*, 1991). Combinado con el F, produce un efecto sinérgico (Oliva, 2003).
- **Iones de metales pesados:** hierro, cromo, níquel y cobre, que resultan de la corrosión de los reactores durante el tratamiento ácido. Su toxicidad actúa a nivel de las vías metabólicas, inhibiendo la actividad enzimática.

#### 1.3.4. Pretratamientos de la biomasa lignocelulósica

Pretratar la matriz lignocelulósica es un paso previo indispensable que complementa la hidrólisis enzimática, facilitando el acceso de las enzimas dentro de la estructura y posibilita la obtención de altos rendimientos de azúcares (Sánchez *et al.*, 2010).

El principal objetivo es desintegrar la matriz, con el fin de que la celulosa reduzca su grado de cristalinidad, aumentando la celulosa amorfa, que es la más adecuada para el posterior ataque enzimático (Sánchez y Cardona, 2005), así como reducir el contenido de lignina, incrementar el área superficial (Krishna *et al.*, 2001) y disminuir la presencia de aquellas sustancias que dificulten la hidrólisis.

Además, un pretratamiento eficaz debe tener un bajo consumo energético, bajos costes de inversión, reactivos baratos y recuperables y debe ser aplicable a diversos sustratos (Sun y Cheng, 2002). En la Tabla 1. se resumen las principales características de los pretratamientos físicos, fisicoquímicos, químicos y biológicos más utilizados en la actualidad.

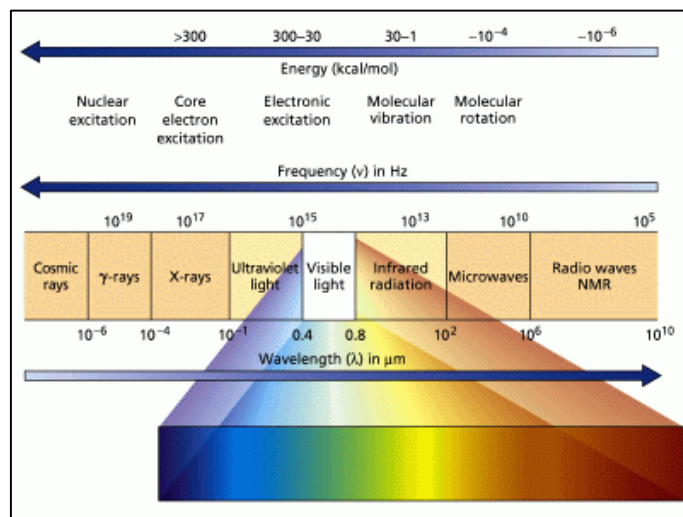
**Tabla 1.** Principales características de los pretratamientos físicos, fisicoquímicos, químicos y biológicos más utilizados en la actualidad (adaptada de Masiá et al., 2014).

<b>TRATAMIENTO FÍSICO (Cadoche y López, 1989)</b>			
<b>Pretratamiento</b>	<b>Condiciones operativas</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Inconvenientes</b>
<b>Triturado(astillado y molienda)</b>	Temperatura ambiente. Aporte de energía $\leq 30\text{kW}$ por tonelada de biomasa	Reduce la cristalinidad de la celulosa	Alto consumo energético
<b>TRATAMIENTO FISICOQUÍMICO</b>			
<b>Explosión de vapor (Duff y Murray, 1996)</b>	Material lignocelulósico sometido a $190\text{-}230^\circ\text{C}$ durante 1-10 min. Después rápida despresurización	Provoca la autohidrólisis de la hemicelulosa; permite extraer lignina que queda intacta; económico; apropiado para residuos y maderas duras	Destruye fracción de xilano; genera compuestos inhibidores de la fermentación;
<b>AFEX (Explosión por vapor con amoníaco) (Sun y Cheng, 2002)</b>	Material es impregnado con amoníaco líquido (1 - 2 kg amoníaco/kg biomasa seca) a $90^\circ\text{C}$ durante 30 min, seguido de una rápida descompresión	No se producen compuestos inhibidores; no requiere pequeños tamaños de partícula para aumentar su eficacia	No hidroliza la hemicelulosa; No elimina la lignina; bajo rendimiento biomasa; Amoníaco debe de ser reciclado
<b>Explosión de <math>\text{CO}_2</math> (Zheng et al., 1998)</b>	4 kg $\text{CO}_2$ /kg de fibra a 160 bar durante 90 min a $50^\circ\text{C}$ . El $\text{CO}_2$ forma ácido carbónico	No produce compuestos inhibidores de la fermentación; Proceso más económico que AFEX	Rendimiento bajo comparado con la explosión de vapor y el proceso AFEX
<b>TRATAMIENTO QUÍMICO</b>			
<b>Pretratamiento alcalino (Sun y Cheng 2002)</b>	Tratamiento con NaOH a bajas temperaturas y tiempos altos de exposición. Requiere de una concentración alta de NaOH	Saponificación de los enlaces éster intramoleculares. Aumenta área, superficie interna, desciende cristalinidad; elimina la lignina	Sales residuales presentes en la biomasa
<b>Organosolventes (Thring et al., 1990)</b>	Mezcla de solventes orgánicos o acuosos con un catalizador ácido a $150\text{-}200^\circ\text{C}$	Hidroliza la lignina y la hemicelulosa	Coste elevado de los solventes
<b>Oxidación húmeda (Klinke et al., 2002)</b>	Se somete a agua a $148\text{-}200^\circ\text{C}$ durante 30 min, en presencia de oxígeno	No genera compuestos inhibidores; baja demanda energética	Alto coste de oxígeno y catalizador alcalino
<b>Tratamiento con ozono (Vidal y Molinier, 1988)</b>	Temperatura ambiente	Eliminación de la lignina; no origina productos tóxicos	Hemicelulosa atacada; celulosa apenas afectada
<b>TRATAMIENTO BIOLÓGICO</b>			
	Hongos de la podredumbre blanca, marrón o blanda	Degradan la lignina y la hemicelulosa; requiere de poca energía	Bajo rendimiento



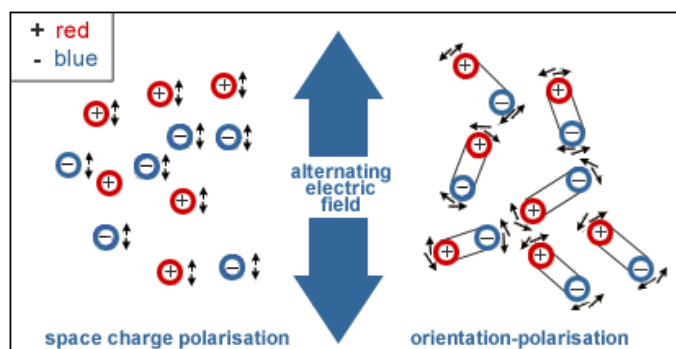
### 1.3.5. Pretratamientos con microondas

Una alternativa a estos métodos convencionales de calentamiento es la aplicación de microondas (Hu y Wen, 2008). Las microondas son radiaciones electromagnéticas no ionizantes que se hallan dentro de una gama de frecuencias de 300 MHz ( $\lambda = 1$  m) a 300 GHz ( $\lambda = 1$  mm), como se observa en la Figura 4.



**Figura 4.** Espectro electromagnético.  
(Universidad de Granada, 2004).

Al incidir sobre un cuerpo la radiación por microondas, se ve afectada la rotación de las moléculas de la sustancia que lo forman sin que su estructura molecular se vea alterada. La radiación por microondas se puede dividir en un componente de campo eléctrico y un componente de campo magnético, aunque solamente el campo eléctrico transfiere calor a la sustancia con la que dicha radiación entra en contacto mediante dos mecanismos (Figura 5.) (Lidström et al, 2001):



**Figura 5.** Mecanismos de calentamiento por microondas.  
(Ministerio de Economía y Competitividad, 2011).

- La orientación e inducción dipolar: Se trata de una interacción entre las moléculas polares que intentan alinearse sobre sí mismas a medida que el campo eléctrico de la radiación microondas cambia. El movimiento rotacional de las moléculas para orientarse en la dirección del campo genera fricción y colisiones moleculares, dando lugar a un calentamiento.

- La conducción iónica: Tiene lugar cuando hay especies iónicas libres o iones libres presentes en la disolución. El campo eléctrico genera un movimiento iónico mediante el cual las especies intentan orientarse al cambio del campo eléctrico, y de forma análoga a dipolar, se produce un supercalentamiento.

A diferencia de los mecanismos de calentamiento convencionales, las microondas permiten un calentamiento volumétrico, selectivo y más rápido del producto ya que existe un contacto directo entre éste y el campo electromagnético generado por el microondas. Esto se traduce en una mayor efectividad energética y facilidad de manejo con respecto a los pretratamientos convencionales (De la Hoz *et al.*, 2005).

Las microondas al interactuar con la biomasa generan cambios mecánicos y térmicos en la estructura de la misma (Talens *et al.*, 2013). Esto sucede al generarse una vibración en los enlaces polares de la biomasa, debido a que éstos se alinean con el campo magnético de las microondas, provocando la ruptura de dichos enlaces y acelerando las reacciones químicas, físicas y biológicas (Choudhary *et al.*, 2012). Este tipo de tratamiento puede cambiar la estructura de la celulosa y aumentar la susceptibilidad enzimática, favoreciendo el acceso de las enzimas al sustrato lignocelulósico (Kitchaiya *et al.* 2003; Zhu *et al.*, 2006).

Este tratamiento puede combinarse con reactivos químicos diluidos como el NaOH o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Binod *et al.*, 2012), con el fin de obtener un aprovechamiento sinérgico de los pretratamientos y obtener así un mayor rendimiento en azúcares (Binod *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2006).

## 2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El **objetivo principal** del presente trabajo es evaluar el potencial de los pretratamientos con microondas en medio alcalino para mejorar el rendimiento de la sacarificación de los residuos de piña en el proceso de obtención de bioetanol de segunda generación.

Para la consecución de dicho objetivo principal se plantean los **siguientes objetivos particulares**.

1. Realizar la revisión bibliográfica inherente al trabajo de investigación.
2. Hidrolizar enzimáticamente el residuo de piña habiendo sido éste pretratado en medio alcalino o bien sometido a un tratamiento de microondas en medio alcalino, a diferentes potencias y tiempos.
3. Caracterizar fisicoquímicamente el residuo de piña antes y después de la hidrólisis enzimática en términos de pH, humedad y sólidos solubles totales, y determinar el contenido en compuestos inhibitorios de la fermentación (fenoles totales, furfural e hidroximetilfurfural) en el residuo pretratado e hidrolizado.
4. Realizar un análisis por termografía de las temperaturas alcanzadas durante el pretratamiento por microondas, así como analizar los cambios estructurales producidos en el residuo pretratado mediante microscopía electrónica (cryo-SEM).

Los objetivos particulares anteriormente expuestos definen el **plan trabajo** diseñado para llevar a cabo el presente estudio.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAL VEGETAL Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las piñas (*Ananas comosus* [L.] Merr., MD-2 cv.) utilizadas fueron seleccionadas basándose en factores externos como la ausencia de defectos, estado de madurez y peso.

Para la preparación de las muestras, el material vegetal se lavó en una disolución de hipoclorito de sodio (0,1%) durante 5 minutos como se muestra en la Figura 6. Posteriormente, se separó la corona y la pulpa del corazón y la corteza mediante un cortador de piña (GEFU). A continuación la corteza y el corazón se prensaron con una prensa de tornillo a 2,5 bar (Vincent Corporation, modelo CP-4) con una relación de prensado de 0.49. La fase líquida obtenida se desechó y la torta de prensado se trituró en una batidora americana (Solac Profesional Mixer 1000W Inox). Por último el residuo triturado se introdujo en frascos de vidrio y se mantuvo congelado a -22 °C, hasta su posterior uso en los experimentos.



**Figura 6.** Diagrama del proceso de obtención de las muestras de residuo de piña triturado.

#### 3.2. PRETRATAMIENTO DEL RESIDUO SÓLIDO DE PIÑA

##### 3.2.1. Pretratamiento alcalino

Se mezclaron 40 g de residuo sólido descongelado y 40 ml de NaOH 0.5 N (Panreac Química, S.L.U.) durante 1 h. Finalmente se ajustó el pH del residuo a 5 mediante la adición de HCl al 37% (Panreac Química, S.L.U.) para su posterior hidrólisis enzimática.

##### 3.2.2. Pretratamiento con microondas en medio alcalino

Se introdujeron, como en el apartado anterior, 40 g de residuo sólido descongelado y 40 ml de NaOH 0.5 N (Panreac Química, S.L.U.) en recipientes de plástico especiales para microondas durante 1 h. A continuación se filtró a vacío el residuo con un matraz kitasatos unido a un embudo Buchner y a una bomba de vacío (modelo N86KN.18, KNF LAB LABOPOINT). El refinado (fase sólida) se pretrató usando un microondas doméstico provisto de un plato giratorio (LG MH63340F / MH6340FS) y con una frecuencia de 2,45 GHz. Las muestras fueron tratadas a 170, 340 y 510 W durante 5, 10, 20, 40 y 60 s, lo que se traduce a las siguientes potencias nominales en W/g: 2,125, 4,25 y 6,375. A continuación, se reconstituyó de nuevo el residuo mezclando el extracto de salida del filtrado (fase líquida) y el refinado (fase sólida). Finalmente se ajustó el pH del residuo a 5 mediante la adición de HCl al 37% (Panreac Química, S.L.U.) para su posterior hidrólisis enzimática.

La potencia absorbida por la muestra a estos tres niveles de potencia nominal se estimó de acuerdo con la norma IEC 60705 (2010). Los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados mostraron un promedio (desviación estándar) de 129 (3) W para el 170 W, 247,4 (1,2) para la W 340 W, 336 (2) W para el 510 W. Correspondiendo estas potencias en W/g a 1,61 (0,04), 3,09 (0,02), 4,2 (0,03).

### 3.3. 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 sólido inicial, el pretratado en medio alcalino y el pretratado con microondas en medio alcalino, en frascos de cristal de 100 ml. La mezcla se llevó a estufa de incubación (PSelecta, modelo Incudigit) a 50 °C durante 24 h. Las condiciones de la etapa de hidrólisis enzimática se fijaron teniendo en cuenta resultados obtenidos previamente en el mismo laboratorio (Hurtado *et al.*, 2013).

Todos los experimentos, pretratamiento más etapa de hidrólisis enzimática, se realizaron por triplicado.

### 3.4. CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DEL RESIDUO DE PIÑA

Todos los análisis fisicoquímicos del residuo de piña se realizaron por triplicado.

#### 3.4.1. Determinación del contenido en Sólidos Solubles totales (SST)

El contenido de SST en la fase líquida del residuo se determinó mediante refractometría a través de la medida de los grados Brix (°Brix). Para ello, se utilizó un refractómetro de mesa (ABBE ATAGO 3T) termostatado a 20 °C según el método ISO 1743:1982 (Figura 7.). La fase líquida se obtuvo por prensado.



**Figura 7.** Refractómetro de mesa

#### 3.4.2. Determinación del contenido en humedad ( $x_w$ )

Se determinó el contenido en humedad del residuo de piña mediante el método gravimétrico de doble pesada 934.06 (AOAC, 2000). La humedad de la muestra se obtuvo a partir de la ecuación 1. Las muestras se secaron en estufa (J.P. Selecta) a 63 °C hasta peso constante (Figura 8.). Las pesadas se realizaron con una balanza analítica (Metler Toledo modelo MS304S).

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

Donde:

- $M_0$  se corresponde con la masa del crisol vacío
- $M_{0+mh}$  se corresponde a la masa del crisol con una pequeña cantidad de muestra húmeda
- $M_{0+ms}$  se corresponde a la masa del crisol con la muestra secada en estufa.



**Figura 8.** Deseccador y estufa a 63 °C.

### 3.4.3. Determinación del pH

El pH se determinó con un pH-metro digital con electrodo de contacto (Mettler, modelo Toledo Inlab) previamente calibrado con disoluciones tampón (pH 4,01; pH 7,2 y pH 9,21) (Figura 9).



**Figura 9.** pHmetro digital con electrodo de contacto.

## 3.5. DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS INHIBITORIOS DE LA FERMENTACIÓN

Las determinaciones de los compuestos inhibitorios de la fermentación del residuo de piña se realizaron por triplicado.

### 3.5.1. Contenido en fenoles totales

El contenido en fenoles totales se determinó espectrofotométricamente con el método de Folin-Ciocalteu modificado (Sakanaka *et al.*, 2005). Se añadieron 0,125 ml de la fase líquida del residuo analizado a una cubeta y se adicionaron 0,5 ml de agua destilada y 0,125 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, Co.) dejándolos reposar durante 6 min. Transcurrido este tiempo, se añadieron 1,25 ml de una solución de carbonato de sodio al 7%

(m/v) (Sigma-Aldrich, Co.) y 1 ml de agua destilada. La muestra preparada se dejó reposar a temperatura ambiente y en total oscuridad durante 90 min antes de medir la absorbancia a 760 nm (Thermo Scientific, modelo Helios Zeta) (Figura 10.). La concentración en fenoles totales se determinó utilizando una curva estándar de ácido gálico (5-50 mg/ml) (Sigma-Aldrich, Co.). El contenido en fenoles totales se expresó como mg de equivalentes de ácido gálico por ml de fase líquida de residuo sólido de piña (mg EAG/ml).



**Figura 10.** Espectrofotómetro.

### 3.5.2. Contenido en Furfural e Hidroximetilfurfural

Se determinó el contenido en Furfural (F) e Hidroximetilfurfural (HMF) presentes en la fase líquida del residuo mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, por sus siglas en inglés), utilizando el método expuesto por Blanco Gomis et al. (1991). Para ello, se empleó un equipo HPLC (modelo Alliance®, Waters, Co.) equipado con desgasificador, módulo de separación Waters 2695 y detector de matriz de fotodiodos Waters 2996 (Figura 11.). La columna utilizada fue Kromasil® 100 C-18 (3  $\mu\text{m}$ ×250×4,6mm i.d.) (Sigma-Aldrich, Co.). Los análisis se realizaron a 25 °C y con un volumen de inyección de 25  $\mu\text{L}$ . Para la fase móvil se utilizó una disolución de acetonitrilo:agua (8:92, v/v), mediante un procedimiento de elución isocrática con una velocidad de flujo de 1 ml/min y con una longitud de onda de 280 nm. Las disoluciones estándar de F (0-5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) e HMF (1-100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) se prepararon disolviendo los patrones (Sigma-Aldrich, Co.) en agua con 10% de metanol (Panreac Química, S.L.U.).



**Figura 11.** HPLC equipado con desgasificador, módulo de separación y detector de matriz de fotodiodos.

### 3.6. ESTUDIO DEL CALENTAMIENTO POR MICROONDAS MEDIANTE IMÁGENES TERMOGRÁFICAS

Con el fin de conocer la temperatura alcanzada durante los pretratamientos con microondas, se empleó una cámara termográfica Testo 870-1i (Instrumentos Testo S.A.) con un

rango espectral infrarrojo de longitud de onda de 7,5 a 14 mm, frecuencia de imagen de 9 Hz y tamaño de detector de 160 x 120 píxeles (Figura 12.).



**Figura 12.** Cámara termográfica.

### 3.7. CAMBIOS ESTRUCTURALES

Se estudiaron los cambios microestructurales producidos por los pretratamientos en los residuos de piña con la técnica de Microscopía Electrónica de Barrido a bajas temperaturas (Cryo-SEM) con un equipo Cryostage CT-1500C (Oxford Instruments) acoplado a un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-5410 (Figura 13.). El tiempo de sublimación en la cámara del microscopio fueron 20 min con las siguientes condiciones de trabajo: -90 °C y -5 KV de voltaje de aceleración. Posteriormente, se retira la muestra de la cámara SEM a la cámara de preparación de muestras donde se recubre con oro durante 1,5 min. Una vez recubierta, la observación de la muestra se realiza a 15 KV y 15 mm de distancia de trabajo.



**Figura 13.** Equipo de Cryo-SEM acoplado a un microscopio electrónico de barrido.

### 3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos, se analizaron estadísticamente realizando análisis de la varianza (ANOVA) mono y multifactorial, con un nivel de confianza del 95% ( $p$ -valor  $\leq 0,05$  indica significancia estadística) con el paquete informático Statgraphics Centurion XVI. Asimismo, el paquete estadístico SPSS se utilizó para obtener la matriz de correlaciones entre todas las variables estudiadas.

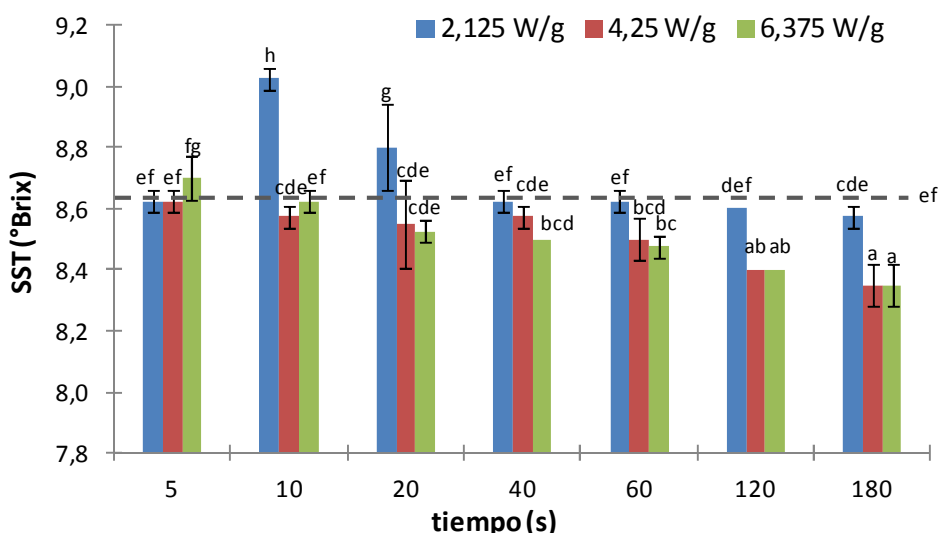


## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA

#### 4.1.1. Contenido en sólidos solubles totales (SST)

En primer lugar, se muestran los resultados correspondientes a la caracterización fisicoquímica en términos de SST (°Brix) de los residuos pretratados (Figura 14.). Los SST pueden considerarse una medida indirecta de los azúcares fermentables presentes en el medio, ya que la mayoría de sólidos solubles presentes en dicho medio se corresponderán con la glucosa, fructosa y sacarosa. En la figura se muestran los resultados de analizar la fase líquida separada de los residuos pretratados con microondas en medio alcalino (MMA) y sacarificados, así como el resultado de aplicar únicamente un tratamiento alcalino (MA) (línea discontinua).



**Figura 14.** Contenido en SST del residuo pretratado con microondas en medio alcalino (MMA) y posteriormente sacarificado. La línea discontinua representa el valor correspondiente al residuo pretratado en medio alcalino y sacarificado.<sup>a,b,c...</sup> Superíndices similares indican grupos estadísticamente homogéneos con un intervalo de confianza del 95%.

Según puede observarse, la aplicación de microondas a tiempos cortos de exposición (10-20 s) incrementa el contenido en SST en el residuo sacarificado cuando se aplican potencias bajas de microondas (2,125 W/g). Sin embargo, tiempos de exposición mayores o potencias más elevadas implican un descenso progresivo de la concentración de SST en el medio. Estos resultados son coherentes con respecto a los valores publicados en la bibliografía (Gabhane *et al.*, 2013) en los que se aplican tratamiento similares a los residuos de banana y a los valores obtenidos en trabajos anteriores realizados en el mismo laboratorio para el residuo de piña. Estos sugieren que la aplicación de microondas podría mejorar el rendimiento de un pretratamiento alcalino únicamente cuando se aplican bajas potencias y tiempos de exposición cortos (Masiá, 2014). Por su parte, Zhu *et al.* (2005) que aplican un tratamiento similar a paja de trigo, también concluyen que un tratamiento con microondas aumenta la concentración de etanol con respecto al tratamiento alcalino, siempre y cuando la temperatura alcanzada en el residuo no sea muy elevada. En línea con estos resultados, Hong *et al.* (2015) constatan que la

aplicación de concentraciones bajas de NaOH (0,25-0,75 M) a bajas temperaturas (60-90 °C) producen una deslignificación del rastrojo de maíz y un consiguiente incremento del contenido de azúcares liberados de la biomasa. Por el contrario, a tiempos de exposición o potencias mayores, se produciría una disminución del rendimiento de la etapa de sacarificación, lo cual podría deberse a una menor efectividad de los enzimas durante dicho proceso, o bien a una degradación previa de los componentes que darían lugar a los azúcares fermentables.

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial (nivel de confianza 95%), escogiendo como variables respuesta el contenido en SST (°Brix) cada tratamiento, y como factores, el tiempo de exposición a las microondas y la potencia aplicada. Los resultados del análisis estadístico muestran que todos los factores y su interacción tienen un efecto estadísticamente significativo ( $p\text{-valor} \leq 0,005$ ) sobre los SST (°Brix).

#### 4.1.2. Humedad ( $x_w$ ) y pH

En la Tabla 2. se muestran los resultados de la caracterización fisicoquímica en términos de humedad ( $x_w$ ) y pH de los residuos pretratados con MMA y sacarificados, así como el residuo pretratado en MA y sacarificado, utilizado como referencia.

Según puede observarse, tanto el pH como la humedad de las muestras se ven afectados por las variables de proceso (tiempo y potencia aplicada), siendo dichos factores y su interacción estadísticamente significativos ( $p\text{-valor} < 0,05$ ) para el caso de la humedad, y únicamente el tiempo de exposición a las microondas, en el caso del pH.

El pH podría verse modificado en función de las especies liberadas al medio, aunque no se observa una tendencia clara en la modificación de dicha variable. Con respecto a la humedad, sí se observa un incremento progresivo de este parámetro conforme se incrementa la potencia aplicada y el tiempo de exposición, lo cual vendría a indicar una mayor fluidificación del residuo sacarificado debido a la aplicación de microondas. Cabe recordar en este punto, que el agua perdida durante el pretratamiento es reincorporada a la muestra tras su enfriamiento, por lo que las diferencias encontradas se deberían a diferencias en el proceso de sacarificación, causadas por el pretratamiento aplicado. En este sentido, parece ser que el pretratamiento MMA estaría facilitando la degradación de la estructura aunque, a tenor de los resultados de SST, esto no siempre se traduciría en un incremento del contenido en azúcares, o bien éstos o los compuestos de los que se obtienen se degradarían debido a la aplicación de potencias superiores a 2,125 W/g o tiempos mayores a 20 s. Los valores de humedad se encuentran dentro del intervalo de los publicados por otros autores (Tejada *et al.*, 2010) para el mismo residuo pero otro tratamiento, quienes refieren una humedad alrededor del 84%.

**Tabla 2.** Contenido  $x_w$  y pH del residuo pretratado en medio alcalino y sacarificado y del residuo pretratado con microondas en medio alcalino y sacarificado, según las diferentes potencias y tiempos aplicados. <sup>a,b,c...</sup> Superíndices similares indican grupos estadísticamente homogéneos con un intervalo de confianza del 95%.

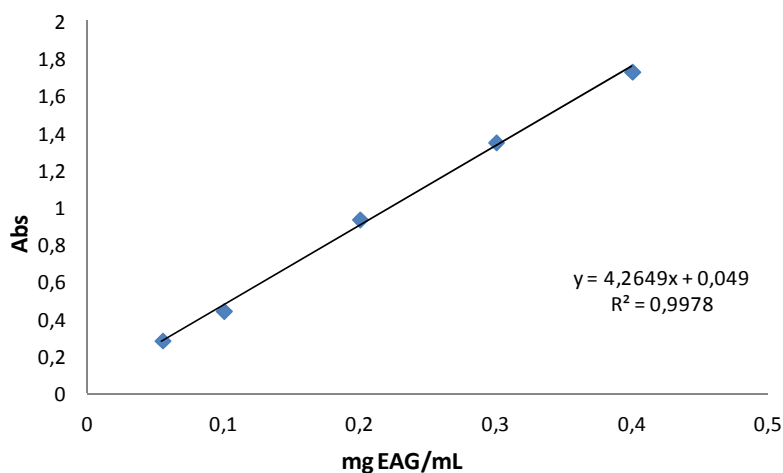
POTENCIA APLICADA	Tiempo de exposición (s)	$x_w$	pH
Alcalino	-	$0,887 \pm 0,003^{bcd}$	$4,56 \pm 0,06^{bcd}$
2,125 W/g	5	$0,8857 \pm 0,0015^{abc}$	$4,89 \pm 0,04^{ef}$
	10	$0,878 \pm 0,002^a$	$5,22 \pm 0,07^g$
	20	$0,8829 \pm 0,0012^{ab}$	$4,570 \pm 0,014^{bcd}$
	40	$0,886 \pm 0,003^{abc}$	$4,91 \pm 0,06^{ef}$
	60	$0,8874 \pm 0,0014^{bcde}$	$4,8 \pm 0,3^{cdef}$
	120	$0,891 \pm 0,002^{bcdef}$	$4,15 \pm 0,07^a$
	180	$0,8966 \pm 0,0006^f$	$4,35 \pm 0,07^{ab}$
4,25 W/g	5	$0,884 \pm 0,004^{ab}$	$4,8 \pm 0,2^{cdef}$
	10	$0,888 \pm 0,013^{bcde}$	$4,90 \pm 0,08^{ef}$
	20	$0,891 \pm 0,004^{bcdef}$	$4,81 \pm 0,18^{cdef}$
	40	$0,895 \pm 0,005^{def}$	$4,65 \pm 0,08^{bcde}$
	60	$0,8959 \pm 0,0008^f$	$4,78 \pm 0,02^{cdef}$
	120	$0,886 \pm 0,003^{ef}$	$4,85 \pm 0,07^{def}$
	180	$0,8967 \pm 0,0005^f$	$4,55 \pm 0,08^{bcd}$
6,375 W/g	5	$0,886 \pm 0,004^{abc}$	$4,77 \pm 0,04^{cdef}$
	10	$0,8917 \pm 0,0019^{cdef}$	$4,83 \pm 0,09^{cdef}$
	20	$0,8922 \pm 0,0010^{def}$	$4,55 \pm 0,13^{bcd}$
	40	$0,895 \pm 0,002^{def}$	$4,7 \pm 0,3^{bcde}$
	60	$0,8971 \pm 0,0003^f$	$4,5 \pm 0,3^{bc}$
	120	$0,896 \pm 0,006^f$	$4,68 \pm 0,11^{cde}$
	180	$0,897 \pm 0,002^f$	$5,1 \pm 0,2^{fg}$

## 4.2. COMPUESTOS INHIBITORIOS DE LA FERMENTACIÓN

Entre los productos inhibitorios de la fermentación se encuentran los fenoles, compuestos antioxidantes que se hallan naturalmente en las frutas y que también pueden proceder de la degradación de la lignina como consecuencia de la aplicación de un pretratamiento. Como se ha comentado anteriormente dichos compuestos se consideran más tóxicos que el furfural (F) y el hidroximetilfurfural (HMF) para los microorganismos etalogénicos (Oliva, 2003).

### 4.2.1. Contenido en fenoles totales

En la Figura 15. se presenta la curva patrón del ácido gálico, la cual permite relacionar los valores de absorbancia en mg EAG por mL de la muestra.

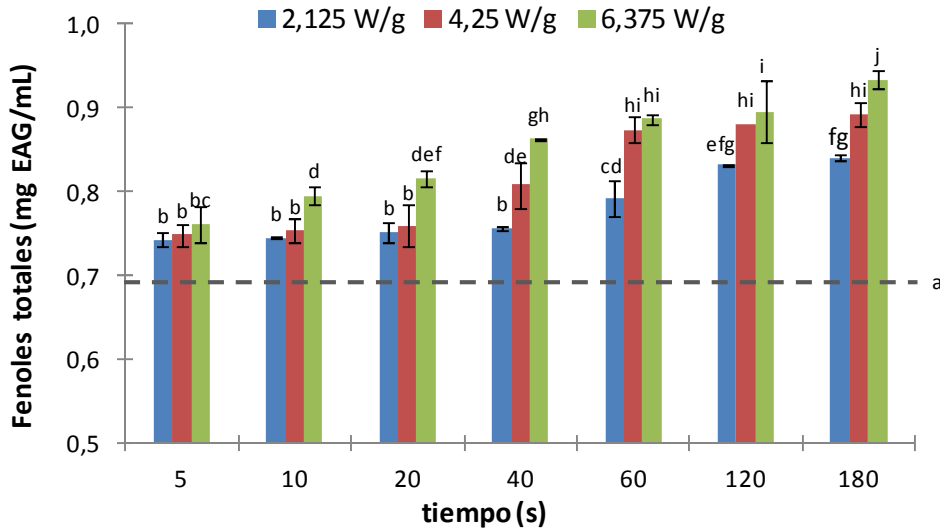


**Figura 15.** Curva patrón de Acido gálico

En la Figura 16. se muestra el contenido en fenoles totales, expresados en mg EAG, presentes en la fase líquida extraída de los residuos pretratados y posteriormente sacarificados. Como referencia se presenta el valor correspondiente al residuo pretratado en MA (línea discontinua). Los resultados indican que el contenido en fenoles aumenta progresivamente a medida que se incrementa el tiempo de exposición y la potencia aplicada. En concreto, a potencias de 2,125 W/g y tiempos de exposición menores a 40 s ó a potencias de 4,25 W/g y tiempos de exposición menores a 20 s, se observa un menor contenido de este producto inhibitorio de la fermentación. Los resultados son similares a los obtenidos en la bibliografía (Hu y Wen, 2008) que constatan que el aumento de la temperatura favorece la degradación de la lignina, por lo que aumenta el contenido en fenoles totales. El trabajo realizado por Vázquez-Gutiérrez *et al.*, (2013), aplicando altas presiones sobre residuo de cebollas, también refiere que el aumento de la severidad del tratamiento provoca un aumento de contenido total de fenoles.

Por otro lado, cabe destacar que la aplicación de microondas genera un incremento del contenido en fenoles totales en todos los casos, comparado con el residuo pretratado únicamente con un medio alcalino. Los resultados del análisis estadístico (ANOVA multifactorial) indican que tanto el tiempo de exposición a las microondas como la potencia nominal aplicada y la interacción entra ambos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre los fenoles totales ( $p$ -valor < 0,005).

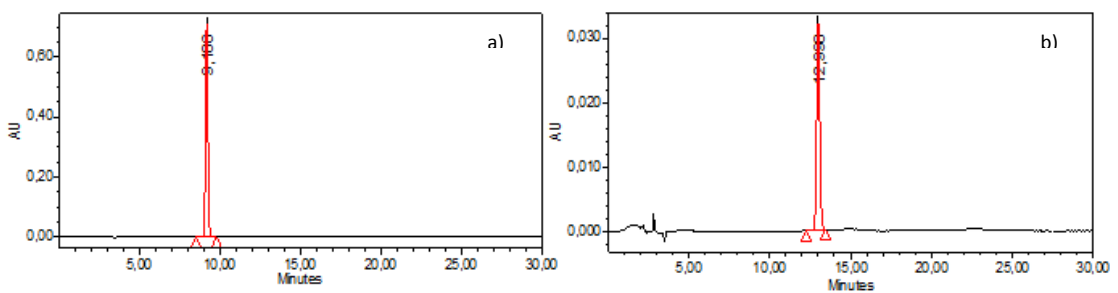
De la bibliografía consultada, no se extraen conclusiones claras respecto al efecto de los compuestos fenólicos sobre el rendimiento de la *S. cerevisiae*: Ando *et al.*, (1986) demostraron una reducción del 30% del rendimiento de la levadura al añadir 1 g/L de ácido 4-hidroxibenzoico mientras que Palmqvist y Hahn-Hägerdal (2000) sugieren una ausencia de efectos significativos al añadir 2 g/L de este compuesto fenólico. En cualquier caso habida cuenta de que las concentraciones en fenoles totales en las muestras pretratadas con microondas son marcadamente inferiores a dichos valores, no es de esperar descensos del rendimiento por este motivo.



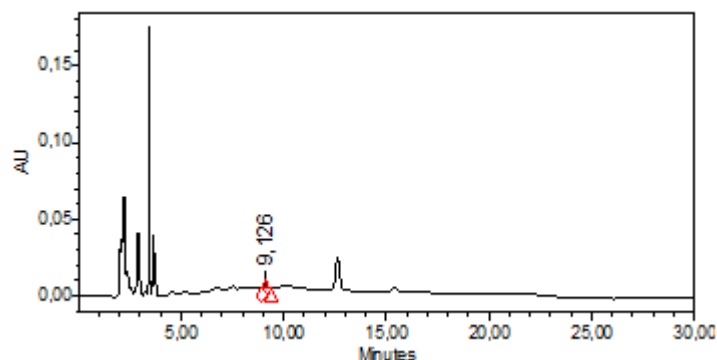
**Figura 16.** Contenido en fenoles totales (mg EAG/mL) del residuo pretratado con microondas en medio alcalino (MMA). La línea discontinua representa el residuo pretratado en medio alcalino (MA) y sacarificado. <sup>a,b,c...</sup> Superíndices similares indican grupos estadísticamente homogéneos con un intervalo de confianza del 95%.

#### 4.2.2. Contenido en furfural (F) e hidroximetilfurfural (HMF)

A partir de los cromatogramas correspondientes a los patrones de F e HMF (Figuras 17.a. y 17.b.) y a los de las muestras (Figura 18.), se deduce que el pretratamiento con microondas en medio alcalino solamente genera pequeñas concentraciones de HMF. Se constata que las temperaturas alcanzadas por la combinación potencia aplicada y tiempo de exposición no son suficientemente elevadas para favorecer la degradación de las pentosas y la consiguiente formación de F. Cabe indicar que a la hora de pasar la muestra por el HPLC se tuvieron que diluir en metanol en proporción 1:10 (m:v) para evitar la interferencia del frente de NaOH que no permitía leer correctamente el cromatograma.

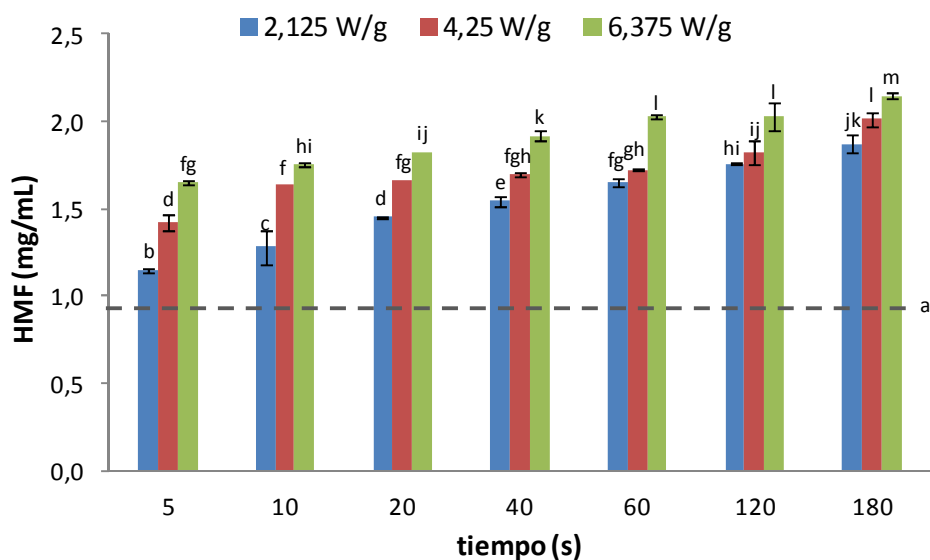


**Figura 17.** Cromatogramas correspondientes a: a) patrón de 100 ppm de HMF y b) patrón de 5 ppm de F.



**Figura 18.** Cromatograma correspondiente a la muestra pretratada en MMA a 4,25 W/g – 60 s y sacarificado. Dilución metanol/agua 1:10 (m:v)

El contenido en HMF de los residuos pretratados y sacarificados se resume en la Figura 19., donde puede observarse que el pretratamiento con microondas produce un incremento notable del contenido en este compuesto, resultando significativos tanto la potencia nominal aplicada como el tiempo de exposición ( $p$ -valor  $< 0,05$ ). La interacción entre ambos factores también resulta significativa, puesto que las diferencias debidas a aplicar distinta potencia se ven reducidas conforme se incrementa el tiempo de exposición. Todos los valores resultan significativamente superiores al obtenido cuando no se aplican microondas al residuo. Estos valores son coherentes con los con los publicados en otros trabajos. En concreto, Gabhane *et al.* (2013) observaron que a medida que aumenta el tiempo de aplicación y la potencia del pretratamiento con microondas a los residuos de bananas se produce un incremento de la temperatura que resulta en una mayor degradación de las pentosas a HMF (Zheng *et al.*, 2009).



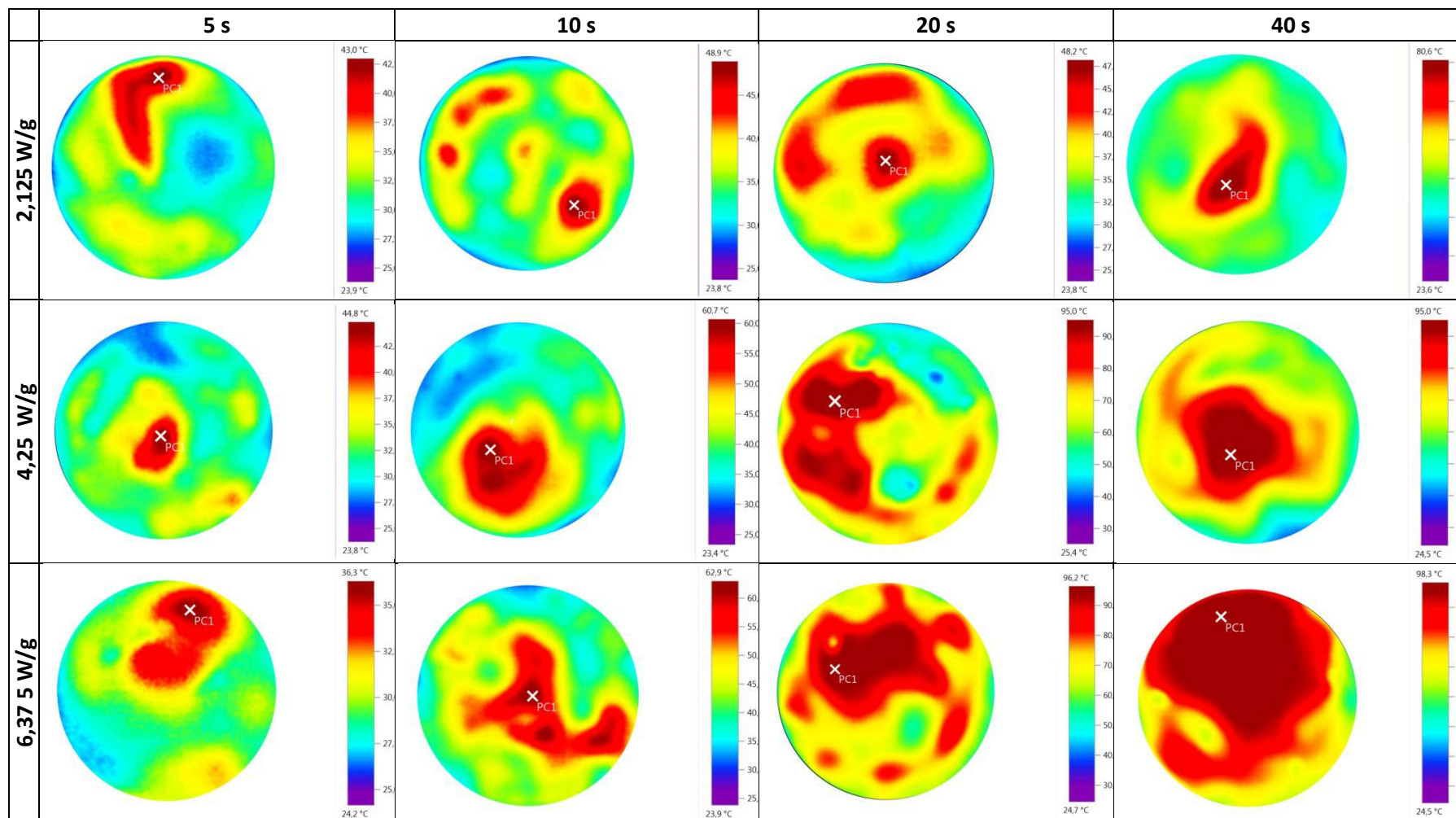
**Figura 19.** Contenido en hidroximetilfurfural del residuo pretratado con microondas en medio alcalino (MMA) y posteriormente sacarificado. La línea discontinua representa el valor correspondiente al residuo pretratado en medio alcalino y sacarificado. <sup>a,b,c...</sup> Superíndices similares indican grupos estadísticamente homogéneos con un intervalo de confianza del 95%.

#### 4.3. ANÁLISIS POR TERMOGRAFÍA. EVOLUCIÓN DE LA TEMPERATURA DURANTE EL PRETRATAMIENTO CON MICROONDAS.

En primer lugar, se presenta la evolución de la temperatura de las muestras durante el pretratamiento con microondas en medio alcalino, a través de las termografías obtenidas fotografiando la base del recipiente que contiene el residuo según se ha indicado en el apartado 3.6. de material y métodos (Tabla 3.). En cada figura incluida en la tabla se presenta la termografía obtenida acompañada de la escala correspondiente a dicha termografía facilitada por el software IRSoft. Además, el software ofrece un histograma de distribución de temperaturas para cada fotografía según se muestra en la Figura 20.

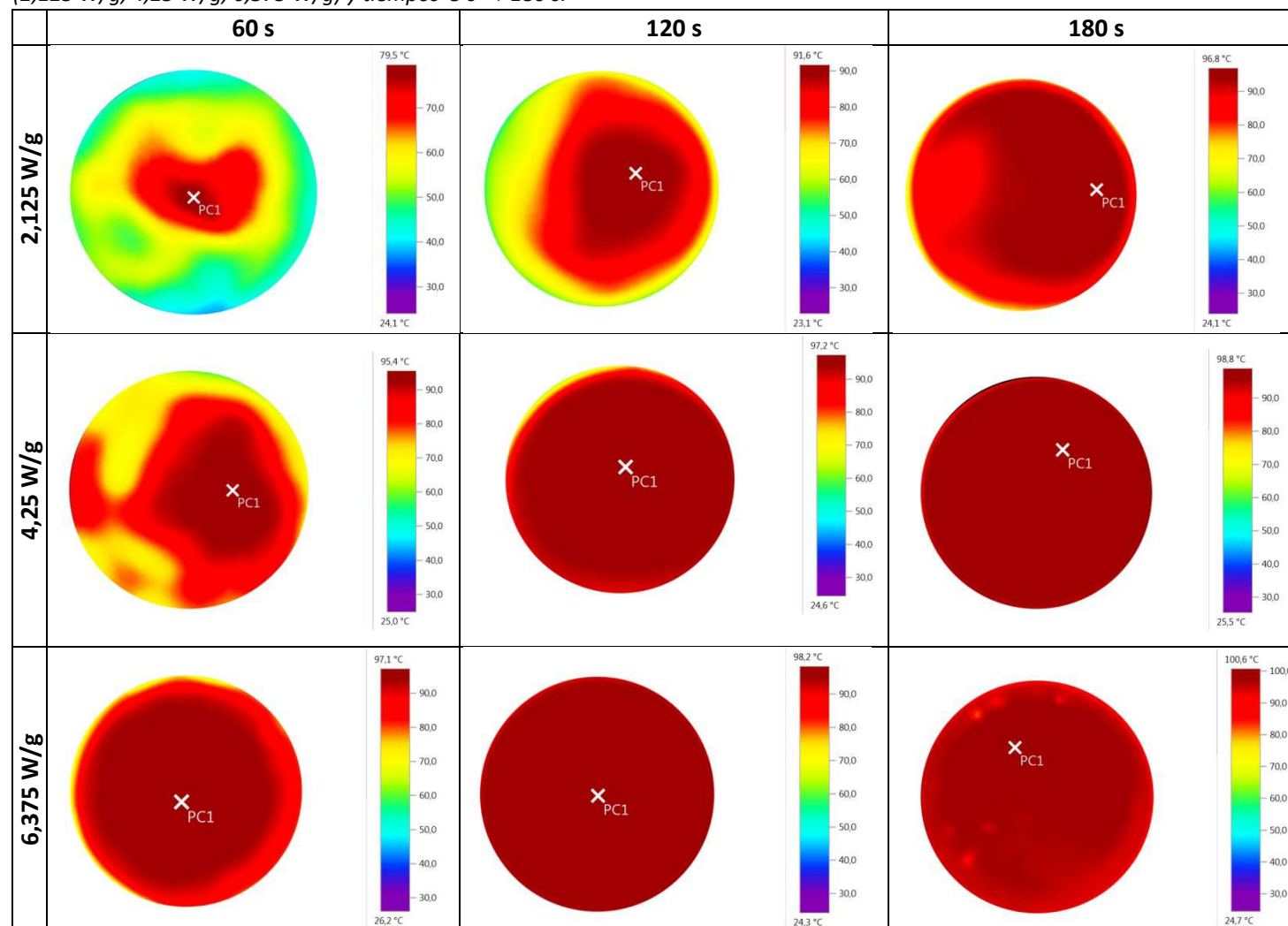
En todos los casos se observa cómo aparece uno o varios puntos calientes a partir de los cuales se origina el calentamiento de la muestra, originando un calentamiento inicialmente no homogéneo provocado por la acción de las microondas, al que sigue un calentamiento por conducción a partir de dichos puntos. Este tipo de evolución es característica del calentamiento por microondas (Hu y Weng, 2008; Lidström *et al*, 2001).

**Tabla 3.** Termografías correspondientes a la base del recipiente conteniendo el residuo de piña pretratado con microondas a distintas potencias (2,125 W/g, 4,25 W/g, 6,375 W/g) y tiempos 5 s → 180 s.



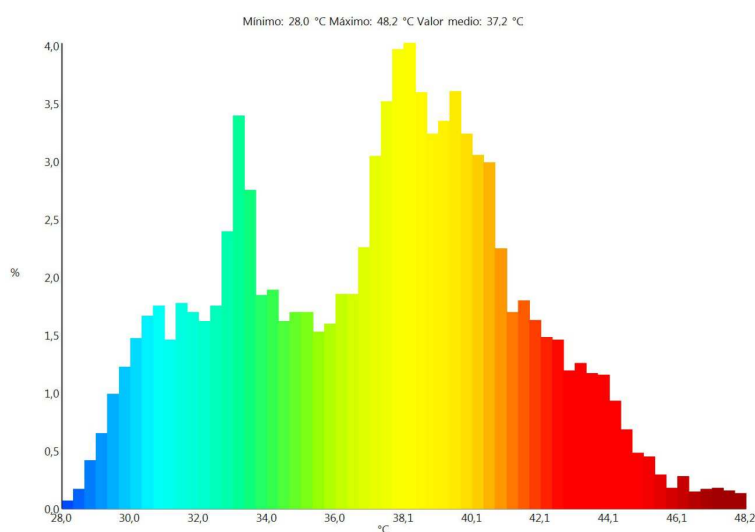


**Tabla 3. (continuación).** Termografías correspondientes a la base del recipiente conteniendo el residuo de piña pretratado con microondas a distintas potencias (2,125 W/g, 4,25 W/g, 6,375 W/g) y tiempos 5 s → 180 s.



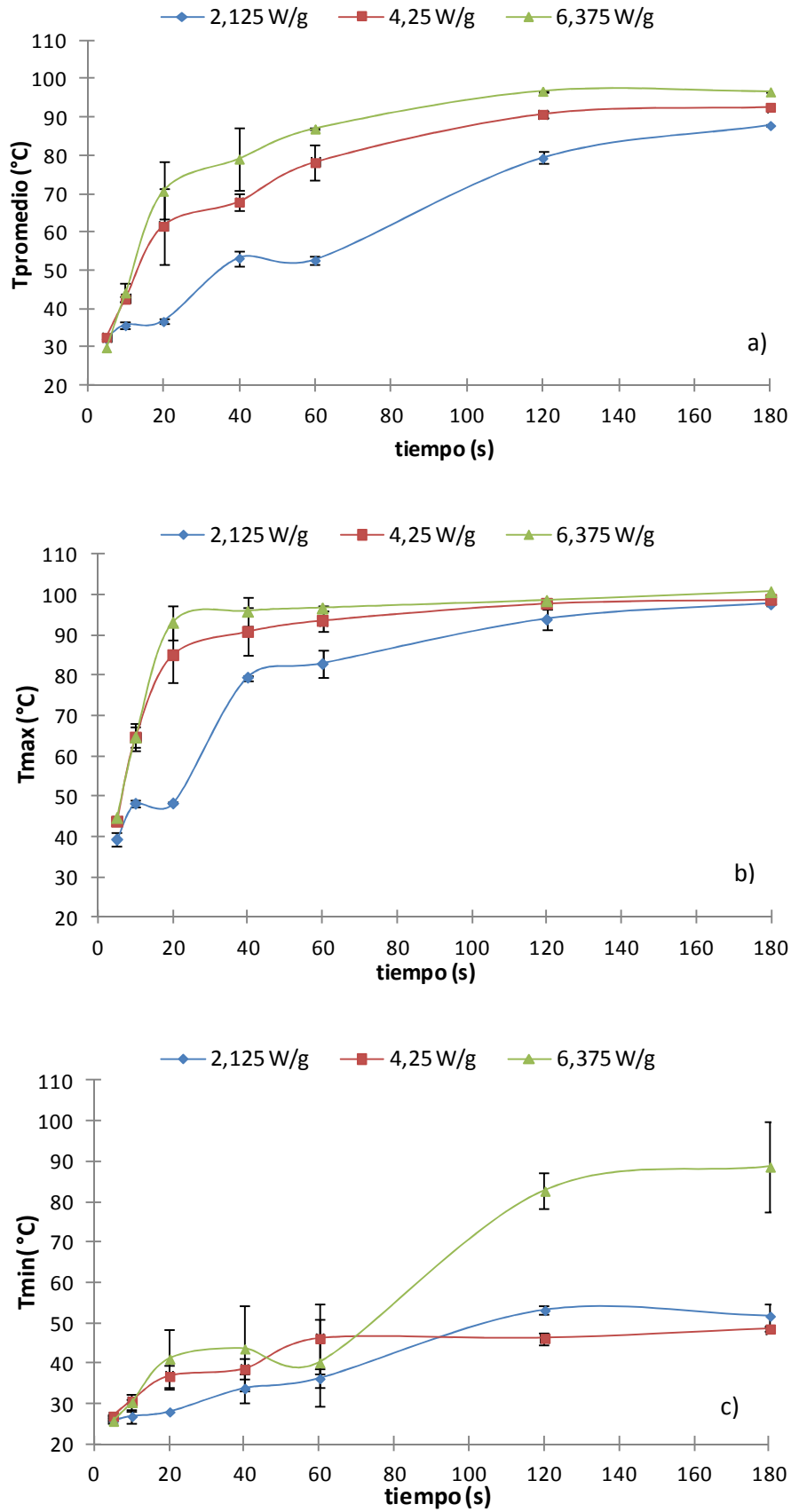
A pesar del calentamiento inicialmente heterogéneo, la homogeneidad en toda la muestra se alcanza a los pocos minutos, siendo necesario más tiempo en el caso de aplicar potencias menores. En particular, se necesitan más de 180 s a la potencia más baja (2,125 W/g), más de 120 s a la potencia intermedia (4,25 W/g) y más de 60 s a la potencia más elevada (6,375 W/g). Los resultados son similares a los de Kumar *et al.* (2014), donde a potencias pequeñas se requiere de mayores tiempos de exposición, en su caso 150 s, habiendo aplicado una potencia de 100 W para encontrar una temperatura homogénea en el residuo.

En la Figura 20. se puede ver el histograma correspondiente al residuo de piña que fue sometido a 20 s en el microondas con una potencia aplicada de 2,125 W/g. Se ha escogido esta fotografía respecto de todas ya que se corresponde con el tratamiento que produjo un mayor incremento de azúcares. Como se puede apreciar la temperatura es este punto no es homogénea y se alcanza una máxima temperatura de 48,2 °C.



**Figura 20.** Histograma correspondiente al residuo de piña en medio alcalino y pretratado con microondas a una potencia aplicada de 2,125 W/g y un tiempo de exposición de 20 s.

En la Figura 21. se presenta la evolución de la temperatura a lo largo del tratamiento, en función de las diferentes potencias aplicadas ( 2,125 W/g, 4,25 W/g y 6,375 W/g). Para cada caso, se muestran la temperatura promedio (Figura 21.a), la temperatura máxima (Figura 21.b) y la temperatura mínima (Figura 21.c).



**Figura 21.** Gráficos de evolución de: a) la temperatura promedio ( $T_{prom}$ ), b) la temperatura máxima ( $T_{max}$ ) y c) la temperatura mínima ( $T_{min}$ ) para las diferentes potencias aplicadas y los diferentes tiempos de exposición

La evolución de la temperatura promedio y la temperatura máxima es bastante similar para todas las potencias. Por un lado, cuando se aplican potencias de 4,25 y 6,375 W/g se produce un incremento más pronunciado de la temperatura hasta alcanzar los 40 s de tratamiento y, a partir de este tiempo, la temperatura evoluciona de manera más moderada hasta el final del tratamiento. Con respecto a la menor potencia aplicada (2,125 W/g), el mayor incremento de temperatura se observa entre los 20 y 40 s, siendo la evolución considerablemente más lenta que en los casos anteriores. Por lo que se puede apreciar, la potencia del microondas resultaría más eficiente a tiempos cortos que a largos, ya que es donde mayor cambio de temperatura se registran (Kumar *et al.*, 2014). Este calentamiento inicialmente más rápido se debería a la aparición de puntos calientes, mientras que la evolución lenta posterior se solaparía con el calentamiento por conducción. De hecho, en la figura correspondiente a la temperatura máxima, puede observarse que ésta no se ve modificada a partir de los 20 s para la potencia más alta, de los 20-40 s para la potencia intermedia, y asciende relativamente poco a partir de los 40 s para la potencia más baja. Por otro lado, aunque las temperaturas finales son significativamente diferentes en función de la potencia aplicada ( $p$ -valor  $< 0,05$ ), es entre los 10 y los 120 s de tratamiento donde se aprecian mayores diferencias entre las distintas potencias. Finalmente, mientras que la temperatura promedio y la temperatura máxima muestran una evolución similar, la temperatura mínima difiere bastante en su evolución, lo cual podría deberse al hecho de que la temperatura mínima puede verse afectada por el área escogida para analizar las temperaturas.

El análisis estadístico realizado sobre los resultados (ANOVA multifactorial) considerando los factores tiempo y potencia aplicadas, concluye que tanto el tiempo como la potencia aplicada y la interacción entre ambos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la temperatura (máxima, mínima y promedio) ( $p$ -valor  $< 0,05$ ).

#### 4.4. ANÁLISIS DE LA CORRELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES DE ESTUDIO.

En la siguiente tabla (Tabla 4.) se presentan los coeficientes de correlación de Pearson y la significancia estadística de dicha correlación para todas las variables analizadas en el presente estudio. Según puede observarse, existe una correlación significativa ( $p$ -valor  $< 0,01$ ) para todos los casos, excepto para la variable pH, que no estaría relacionada con ningún otro parámetro estudiado.

Como se puede apreciar en la tabla, los SST tienen una correlación negativa con todas las variables estudiadas ya que un mayor contenido en SST indica una mayor generación y/o menor degradación de azúcares fermentables, lo que significaría una menor concentración de HMF, lo cual se consigue alcanzando menores temperaturas. Estos valores tienen coherencia con lo esperado ya que el HMF se obtiene por la degradación de los azúcares y hay una mayor degradación de éstos conforme aumentan las temperaturas a las que se somete el residuo. El resto de variables correlacionadas con las temperaturas tienen una correlación positiva. Por su parte, los Fenoles Totales (FT) muestran una correlación positiva con el HMF y las temperaturas, debido a que al aumentar las temperaturas hay una mayor degradación de la estructura y por tanto de la lignina, y éstos aumentan al igual que el HMF. Todas las temperaturas están relacionadas entre sí.

**Tabla 4.** Coeficientes de correlación de Pearson y significancia estadística para las distintas variables de estudio.

	SST	x <sub>w</sub>	pH	FT <sup>1</sup>	HMF	Tprom <sup>1</sup>	Tmax <sup>1</sup>	Tmin <sup>1</sup>
SST	1,000	-0,753**	0,208	-0,698**	-0,659**	-0,712**	-0,649**	-0,616**
x <sub>w</sub>	-0,753**	1,000	-0,216	0,729**	0,730**	0,781**	0,736**	0,622**
pH	0,208	-0,261	1,000	-0,178	-0,198	-0,286	-0,268	-0,109
FT	-0,698**	0,729**	-0,178	1,000	0,874**	0,923**	0,847**	0,785**
HMF	-0,659**	0,730**	-0,198	0,847**	1,000	0,866**	0,875**	0,721**
Tprom	-0,712**	0,781**	-0,286	0,923**	0,866**	1,000	0,944**	0,813**
Tmax	-0,649**	0,736**	-0,268	0,847**	0,875**	0,944**	1,000	0,697**
Tmin	-0,616**	0,622**	-0,109	0,785**	0,721**	0,813**	0,697**	1,000

\*\* La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

<sup>1</sup> FT: fenoles Totales; Tprom: Temperatura Promedio; Tmax: Temperatura máxima; Tmin: Temperatura mínima.

#### 4.5. ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA DEL RESIDUO PRETRATADO MEDIANTE MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA (Cryo-SEM)

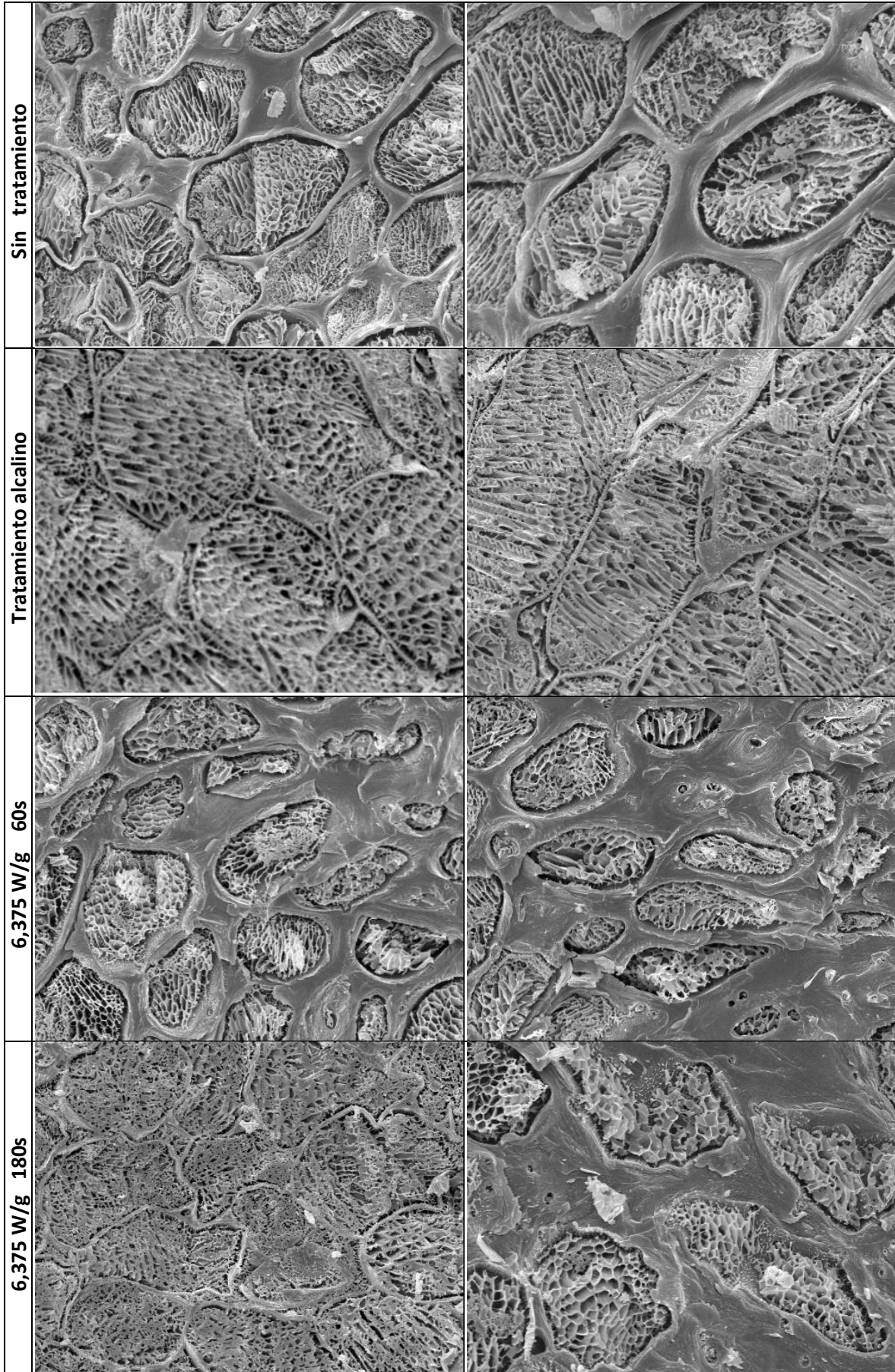
Los pretratamientos tienen como finalidad modificar la estructura lignocelulósica con el fin de facilitar la acción enzimática (Sánchez *et al.*, 2010). Dicha acción puede verse facilitada por modificación de los componentes presentes en el residuo debido al efecto de la temperatura o a un tratamiento químico, por ejemplo, o bien por una mayor accesibilidad al sustrato gracias a una modificación de la porosidad.

En la tabla 5. se presentan micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido de congelación (cryo-SEM) del residuo sin pretratar, residuo pretratado en medio alcalino y residuo pretratado en medio alcalino y microondas a distintas potencias y tiempos.

En primer lugar, cabe destacar que debido a la heterogeneidad de la muestra es difícil obtener micrografías de partes similares del tejido, por lo que mientras algunas micrografías corresponden a tejido de tipo parenquimático por pertenecer a restos de pulpa, otras micrografías muestran zonas más leñosas, con mayor proporción de fibra o pared celular, por corresponder a zonas de la corteza o bien al corazón del fruto. Sí puede observarse, no obstante, que el aplicar un pretratamiento con microondas en medio alcalino produce un mayor grado de afectación de la estructura. En concreto, se observa cierta separación del protoplasto de las paredes celulares y aumento de la rugosidad del perfil celular, lo que podría ser indicativo de una deshidratación. Si bien es cierto que la desestructuración podría facilitar la acción enzimática posterior, una compactación excesiva del tejido debida a una deshidratación podría provocar una disminución de la accesibilidad de los enzimas al sustrato, implicando una menor efectividad del tratamiento enzimático (Arantes y Saddler, 2011). De hecho, esta compactación es evidente en las micrografías correspondientes al residuo pretratado a 6,375 W – 180 s, tratamiento para el que la liberación de SST al medio durante la sacarificación se veía sustancialmente reducida.

En definitiva, se podría afirmar que mientras que tiempos y potencias cortos de microondas en medio alcalino modifican la estructura de manera favorable con respecto a la posterior hidrólisis enzimática, tratamientos más agresivos provocan una compactación no deseada del tejido, que podría disminuir la accesibilidad enzima-sustrato.

**Tabla 5.** Micrografías correspondientes al residuo de piña con diferentes tratamientos.



## 5. CONCLUSIONES

1. El pretratamiento combinado microondas-medio alcalino permite mejorar el rendimiento de la hidrólisis enzimática posterior con respecto al empleo de un pretratamiento exclusivamente alcalino, siempre y cuando se empleen potencias bajas y tiempos de exposición cortos.
2. El contenido en compuestos inhibitorios de la fermentación tales como los fenoles totales o el hidroximetilfurfural aumenta a medida que se incrementa la potencia de microondas y tiempo de exposición. Dicho aumento sería resultado de la degradación de la lignina y los azúcares, respectivamente, como consecuencia del mayor incremento de la temperatura registrado en dichos casos. No obstante, a las potencias y tiempos de exposición que ofrecen un incremento de SST dicho aumento no resulta excesivo.
3. El análisis de los cambios estructurales en el residuo sometido al tratamiento por microondas parece indicar que un aumento en la severidad del tratamiento provocaría una compactación de la estructura impidiendo el buen acceso de las enzimas, lo que se traduciría en una reducción de los azúcares liberados al medio.
4. Los resultados del presente trabajo indican que la optimización del pretratamiento con microondas en medio alcalino podría mejorar el rendimiento de la etapa de hidrólisis enzimática para la obtención de bioetanol a partir de residuo industrial de piña.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- ANDO, S; ARAI, I; KIYOTO, K; HANAI, S. (1986). Identification of aromatic monomers in steam-exploded poplar and their influence on ethanol fermentation. *J. Ferment. Technol.*, 64: 567–570
- ARANTES, V.; SADDLER, J.N. (2011). Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. *Biotechnology for Biofuels*, 4:3.
- AOAC (2000). AOAC Official Method 934.06 Moisture in Dried Fruits. *Methods of analysis of the association of official analytical chemists*, Washington, D.C.
- BALAT, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway. A review. *Energy Conversion and Management*, 52: 858-875.
- BINOD, P.; SATYANAGALAKSHMI, K.; SINDHU, R.; JANU, K.U.; SUKUMARAN, R.; PANDEY, A. (2012). Short duration microwave assisted pretreatment enhances the enzymatic saccharification and fermentable sugar yield from sugarcane bagasse. *Renewable Energy*, 37: 109-116.
- BJERRE, A.B.; OLESEN, A.B.; FERNQVIST, T. (1996). Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicellulose. *Biotechnology Bioengineering*, 49: 568-577.
- CADOUCHE, L.; 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.
- CHEN, H.Z.; QIU, W.H. (2010). Key technologies for bioethanol production from lignocellulose. *Biotechnology Advances*, 28: 556-562.
- CHOUDHARY, R.; LOKU, U.A.; LIANG, Y.; SIDDARAMU, T.; HADDOCK, J.; MARKEVIVIUS, G. (2012). Microwave pretreatment for enzymatic saccharification of sweet sorghum bagasse. *Biomass and bioenergy*, 39: 218-226.
- CLAASSEN, P.A.M.; VAN LIER, J.B.; LÓPEZ, A.M.; VAN NIEL, E.W.J.; SIJTSMA, L.; STAMS, A.J.M.; DE VRIES, S.S.; WEUSTHUIS, R.A. (1999). Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 741-755.
- DELEGENES, J.P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J.M. (1996). Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentation of glucose and xilose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 19: 220-225.
- 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.
- DIRECTIVA 2003/30/CE (2003). 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.



- DIX, N.J. (1979). Inhibition of fungi by gallic acid in relation to growth on leaves and litter. *Transactions of the British Mycological Society*, 73: 329-336.
- DUFF, S.J.B.; MURRAY, W.D. (1996). Bioconversion of forest products industry waste cellulosic to fuel ethanol: a review. *Bioresour. Technol.*, 55: 1-33.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. (1984). *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Walter de Gruyter. Berlín.
- GABHANE, J.; WILLIAM, P.; GADHE, A.; RATH, R.; NARAYAN, A.; WATE, S. (2013). Pretreatment of banana agricultural waste for bio-ethanol production: Individual and interactive effects of acid and alkali pretreatments with autoclaving, microwave heating and ultrasonication. *Waste Management*, 34: 498-503.
- GONZALEZ-GARCIA, S.; GASOL, C.M.; GABARRELL, X.; RIERADEVALL, J.; MOREIRA, M.T.; FEIJOO, G. (2009). Environmental aspects of ethanol-based fuels from *Brassica carinata*: A case study of second generation ethanol. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 13: 2613-2620.
- HAHN-HAGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. (2007). Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 74: 1207-1209.
- HARMSSEN, P.F.H.; HUIJEN, W.J.J.; BERMÚDEZ-LÓPEZ, L.M.; BAKKER, R.R.C. (2010). Literature Review of Physical and chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass, in Wageningen UR, *Food & Biobased Research*, 1: 54.
- HONG, E.; KIM, D.; KIM, J.; KIM, J.; YOON, S.; RHIE, S.; HA, S.; RYU, Y. (2015). Optimization of alkaline pretreatment on corn stover for enhanced production of 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* AJ4. *Biomass and bioenergy*, 77: 177-185.
- HU, Z.; 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.
- HURTADO, A.L. (2013). Hidrólisis enzimática de los residuos industriales de piña para la obtención de bioetanol. Trabajo Final de Carrera. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural. Universitat Politècnica de València.
- IEC (2010). IEC 60705:2010. Hornos microondas para uso doméstico. Métodos de medida de la aptitud para la función. Comité AEN/CTN 213 - Aptitud para la función de los aparatos electrodomésticos
- ISO (1982). ISO 1743:1982. Glucose syrup -- Determination of dry matter content -- Refractive index method.

- 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: 217-225.
- KLINKE, H.B.; AHRING, B.K.; SCHMIDT, A.S.; THOMSEN, A.B. (2002). Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. *Bioresource Technology*, 82:15-26.
- KOOTSTRA, A.M.J.; BEEFTINK, H.H.; SCOTT, E.L.; SANDERS, J.P.M. (2009). Comparison of dilute mineral and organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Biochemical Engineering Journal*, 46: 126-131.
- KRISHNA, S.H.; REDDY, J.; CHOWDARY, G.V. (2001). Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. *Bioresource Technology*. 77, 193-196.
- KUMAR, C.; JOARDDER, M.; KARIM, A.; MILLAR, G.J.; AMIN, Z. (2014). Temperature redistribution modelling during intermittent microwave connective heating. *Procedia Engineering*, 90: 544-549.
- LAUREANO-PEREZ, L.; TEYMOURI, F.; ALIZADEH, H.; DALE, B.E.; (2005). Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1081-1099.
- LAWFORD, H.; ROUSSEAU, J. (1998). Improving fermentation performance of recombinant zymomonas in acetic acid-containing media. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 70-72: 161-172.
- LIDSTRÖM, P.; TIERNEY, J.; WATHER, B.; WESTMAN, L. (2001). Microwave assisted organic synthesis. A review. *Tetrahedron*, 57: 9225-9283.
- MARQUES, A.P.; EVTUGUIN, D.V.; MAGINA, S.; AMADO, F.M.L.; PRATES, A. (2009). Chemical Composition of Spent Liquors from Acidic Magnesium-Based Sulphite Pulping of Eucalyptus globulus. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 29: 322-336.
- MARTÍN-ALONSO, D.; WETTSTEIN, S.G.; DUMESIC, J.A. (2012). Bimetallic catalysts for upgrading of biomass to fuels and chemicals. *Chem. Soc. Rev.*, 41: 8075-8098
- MASIÁ, A. (2014). Pretratamiento con microondas para la obtención de bioetanol a partir de residuos industriales de piña: Una propuesta de mejora de la hidrólisis enzimática. Trabajo Final de Carrera. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural. Universitat Politècnica de València.
- MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.; KODAKI, T.; SAWAYAMA, S. (2009). Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84: 37-53.
- MINISTERIO DE ECONOMÍA Y COMPETITIVIDAD (2011). *Subprograma INNPACTO 2011*, Madrid, visto el 1 de Julio de 2015 <http://cmicrowaves.com/objetivos.html>

- MUSSATO, S.I.; ROBERTO, I.C. (2004). Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: A review. *Bioresource Technology*, 93: 1-10.
- MUSSATTO, S.I.; DRAGONE, G.; GUIMARAES, P.M.R.; SILVA, J.P.A.; CARNEIRO, L.M.; ROBERTO, I.C.; VICENTE, A.; DOMINGUES, L.; TEIXERA, J.A. (2010). Technological trends, global market, and challenges of bioethanol production. *Biotechnology Advances*, 28: 1873-1899.
- OLIVA, J.M. (2003). Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre *Kluyveromyces marxianus*. (Tesis Doctoral). Universidad Complutense De Madrid (España).
- PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 74: 25-33.
- PANIZZI, L.; CAPONI, C.; CATALANO, S.; CIONI, P.L.; ÑORELLI, I. (2002). In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. *Journal of Ethnopharmacology*, 79: 165-168.
- PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. (1998). Biotechnological production of xylitol. Part. 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. *Bioresource Technology*, 66: 25-40.
- REAL DECRETO 61/2006 (2006). Real Decreto 61/2006 de 31 de enero, por el que se determinan las especificaciones de gasolinas, gasóleos, fuelóleos y gases licuados del petróleo y se regula el uso de determinados biocarburantes.
- RESHAMWALA, S.; SHAWKY, B.T.; DALE, B.E. (1995). Ethanol production from enzymatic hydrolysates of AFEX-treated coastal Bermuda grass and switchgrass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51/52: 43-55.
- SAKANAKA, S.; TACHIBANA, Y.; OKADA, Y. (2005). Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (Kakinohacha) *Food Chemistry*, 89: 569-575.
- SÁNCHEZ, A.M.; GUTIÉRREZ, A.I.; MUÑOZ, J.A.; RIVIERA, C.A. (2010). Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. *Revista Tumbaga*, 1: 61-91.
- SANCHEZ, O.J.; CARDONA, C.A. (2005). Producción biotecnológica de alcohol carburante I: obtención a partir de diferentes materias primas. *INCI*, 30.
- SANCHEZ, O.J.; CARDONA, C.A. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*, 99: 5270-5295.
- SEHNEM, N.T.; BITTENCOURT, L.R.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A.J.P. (2006). Cellulase production by *Penicillium echinulatum* on lactose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72:163-167.
- SUN, Y.; CHENG, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83:1-11.

- 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*.
- TEJADA, L.P.; TEJADA, C.; VILLABONA, A.; ALVEAR, M.R.; CASTILLO, C.R.; HENAO, D.L.; MARIMÓN, W.; MADARIAGA, N.; TARÓN, A. (2010). Producción de bioetanol a partir de la fermentación alcohólica de jarabes glucosados derivados de cáscaras de naranja y piña. *Revista Educación en Ingeniería*, 10: 120-125.
- THRING, R.W.; CHORNET, E.; OVEREND, R.P. (1990). Recovery of a solvolytic lignin: effects of spent liquor/acid volume ratio, acid concentration and temperature. *Biomass* 23:289-305.
- UNE-EN 228:2013 (2013) UNE-EN 228:2013, Combustibles para automoción. Gasolina sin plomo. Requisitos y métodos de ensayo.
- UNIVERSIDAD DE GRANADA (2004). *Proyecto de Innovación de Recursos Educativos de Química Orgánica 2002-2004 (QUIORED)*, visto el 1 de Julio de 2015, <http://www.ugr.es/~quiorred/espec/espec.htm>
- UPADHYAY, G.; GUPTA, S.P.; PRAKASH, O.; SINGH, M.P. (2010). Pyrogallol-mediated toxicity and natural antioxidants. Triumphs and pitfalls of preclinical findings and their translational limitations. *Chemico-Biological Interactions*, 183: 333-340.
- VANZYL, C.; PRIOR, B.A.; DUPREEZ, J.C. (1991). Acetic-Acid Inhibition of D-Xylose Fermentation by *Pichia-Stipitis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 13: 82-86.
- VÁZQUEZ-GUTIÉRREZ, J.L.; PLAZA, L.; HERNANDO, I.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; QUILES, A.; DE ANCOS, B.; CANO, M.P. (2013). Changes in the structure and antioxidant properties of onions by high pressure treatment. *Food Funct*, 4: 586.
- VIDAL, P.F.; MOLINIER, J. (1988). Ozonolysis of lignin-improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust. *Biomass*, 16: 1-17.
- WYMAN, C.E.; SPLINDER, D.D.; GROHMANN, K. (1992). Simultaneous saccharification and fermentation of several lignocellulosic feedstocks to fuel ethanol. *Biomass Bioenerg.*, 3: 301-307.
- WYMAN, C.E. (2007). What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. *Trends in Biotechnology*, 25: 153-157.
- XAVIER, A.M.R.B.; CORREIRA M.F.; PEREIRA, S.R.; EVITUGUIN, D.V. (2010). Second-generation bioethanol from eucalypt sulphites spent liquor. *Bioresource Technology*, 101: 1873-2976
- ZHENG, Y.Z.; LIN, H.M.; TSAO, G.T. (1998). Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion. *Biotechnol. Prog.*, 14: 890-896.
- ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R. (2009). Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *Int. Agric. Biol. Eng.*, 2: 51.

- ZHU, S.D. (2005). Pretreatment by microwave/alkali of lignocellulosic materials and their saccharification and fermentation for ethanol production. PhD Thesis. Wuhan, PR China: Huazhong Agriculture University.
- ZHU, S.S.; WU, Y.X.; YU, Z.N. (2006). Microwave-assisted alkali pre-treatment of wheat straw and its enzymatic hydrolysis. *Biosystems Engineering*, 94: 437-442.