

PRETRATAMIENTO CON MICROONDAS PARA LA MEJORA DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL RESIDUO DE INDUSTRIALIZACIÓN DE PIÑA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOETANOL. EFECTO SOBRE LA MATRIZ LIGNOCELULÓSICA Y ANÁLISIS DE LA LIBERACIÓN DE COMPUESTOS INHIBITORIOS DE LA FERMENTACIÓN.

Oriella Azaf Ferrari, Claudia Conesa Domínguez, Lucía Seguí Gil.

RESUMEN

La obtención de bioetanol a partir de biomasa residual de origen industrial es una alternativa sostenible de creciente interés. Sin embargo, la matriz lignocelulósica necesita ser pretratada e hidrolizada para liberar los azúcares fermentables. Por su parte, los pretratamientos y la hidrólisis pueden liberar al medio una cantidad importante de compuestos inhibitorios de la fermentación. En el presente trabajo se propone averiguar si los pretratamientos con microondas (MW) pueden mejorar la hidrólisis enzimática del residuo industrial de piña. Para tal fin, se aplicaron microondas a diferentes potencias (4,25, 6,375 y 8,5 W/g) y tiempos de exposición (1, 2, 5, 10 y 15 min) 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 estudiaron las temperaturas alcanzadas durante el pretratamiento mediante una cámara termográfica y se analizaron los cambios estructurales mediante microscopía (Cryo-SEM). Finalmente, se determinó la presencia de compuestos inhibitorios de la fermentación (fenoles totales, furfural e hidroximetilfurfural) en el residuo hidrolizado. Los resultados obtenidos indicaron que el tratamiento con MW, a las potencias y tiempos adecuados, puede favorecer la liberación de azúcares fermentables durante la hidrólisis enzimática posterior, y que a dichas potencias y tiempos no se liberan compuestos tóxicos en cantidades inhibitorias.

Palabras clave: bioetanol, biomasa lignocelulósica, residuo industrial de piña, microondas, compuestos inhibitorios.

RESUM

L'obtenció de bioetanol a partir de biomassa residual d'origen industrial és una alternativa sostenible de creixent interès. No obstant això, la matriu lignocel·lul·losica necessita ser pretractada i hidrolitzada per a alliberar els sucres fermentables. Per la seua banda, els pretractaments i la hidròlisi poden alliberar al mig una quantitat important de compostos inhibitoris de la fermentació. En el present treball es proposa esbrinar si els pretractaments amb microones (MW) poden millorar la hidròlisi enzimàtica del residu industrial de pinya. Per a tal fi, es

van aplicar microones a diferents potències (4,25, 6,375 i 8,5 W/g) i temps d'exposició (1, 2, 5, 10 i 15 min) i es va caracteritzar el residu abans i després de la hidròlisi en termes de sòlids solubles totals (SST), humitat (x_w) i pH. A més, es van estudiar les temperatures aconseguides durant el pretractament per mitjà d'una càmera termogràfica i es van analitzar els canvis estructurals per microscopia (Cryo-SEM). Finalment, es va determinar la presència de compostos inhibitoris de la fermentació (fenols totals, furfural i hidroximetilfurfural) en el residu hidrolitzat. Els resultats obtinguts van indicar que el tractament amb MW, a les potències i temps adequats, pot afavorir l'alliberament de sucres fermentables durant la hidròlisi enzimàtica posterior, i que a les dites potències i temps no s'alliberen compostos tòxics en quantitats inhibitories.

Paraules clau: bioetanol, biomassa lignocel·lulòsica, residu industrial de pinya, microones, compostos inhibitoris.

ABSTRACT

Obtaining bioethanol from industrial waste materials is a sustainable alternative of increasing interest. However, the lignocellulosic matrix needs to be pretreated and hydrolyzed to release fermentable sugars. On the other hand, pretreatment and hydrolysis can release a significant amount of fermentation inhibitory compounds. In this paper, microwaves (MW) are proposed as a pretreatment prior to enzymatic hydrolysis of industrial pineapple waste. To this end, different microwave powers (4.25, 6.375 and 8.5 W/g) and exposure times (1, 2, 5, 10 and 15 min) were applied. The residue was characterized before and after hydrolysis in terms of total soluble solids (TSS), moisture content (x_w) and pH. In addition, temperatures reached during pretreatment were determined by means of a thermographic camera, and structural changes were analyzed by microscopy (Cryo-SEM). Finally, the presence of fermentation inhibitory compounds (total phenols, furfural and hydroxymethylfurfural) in the hydrolyzates was evaluated. Results indicated that MW treatments, using the appropriate powers and times, may promote the release of fermentable sugars during the subsequent enzymatic hydrolysis step. The concentration of inhibitory compounds released during these specific treatments is below the values considered inhibitory for further fermentation.

Keywords: bioethanol, lignocellulosic biomass, industrial pineapple waste, microwaves, inhibitory compounds.

INTRODUCCIÓN

La preocupación por el impacto negativo que ejercen los combustibles fósiles sobre el medio ambiente, ha hecho crecer el interés por encontrar alternativas más sostenibles, promoviéndose el uso de materias primas renovables tales como la biomasa lignocelulósica (Itelima *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2011). El bioetanol es un biocombustible que puede obtenerse a partir de materias primas de distinta naturaleza tales como azúcares, almidón o lignocelulosa. En particular, el etanol producido a partir de la fermentación de materias primas azucaradas o amiláceas se conoce como de "primera generación" (Kang *et al.*, 2014), siendo la caña de azúcar (Brasil) y el maíz (EE.UU.) los sustratos más utilizados para producirlo. Sin embargo, existe cierta preocupación derivada de que esta materia prima también se utiliza para consumo humano (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006), por lo que la investigación se ha centrado cada vez más en emplear materias primas de desecho para obtener el denominado bioetanol de "segunda generación", obtenido a partir de biomasa residual de tipo lignocelulósico (Kang *et al.*, 2014).

El residuo de industrialización de la piña es un material lignocelulósico que contiene azúcares fermentables y polímeros hidrolizables que podrían utilizarse en la obtención de biocombustible (Hajar *et al.*, 2012; Mussatto y Teixeira, 2010; Nigam, 1999). La industria de zumos y la conservera son las dos principales industrias de transformación de la piña; durante su procesamiento, casi el 50% (m/m) del peso total del fruto resulta en material desechado (piel pelada, corona y pulpa central) (Saravanan *et al.*, 2012). Al utilizar el desecho de piña como sustrato para la producción de bioetanol, no solamente se estaría dando valor añadido a un producto de desecho, sino que se contribuye a la gestión de los residuos generados por la industria, reduciendo los costes de la eliminación de desperdicios (Hajar *et al.*, 2012; Ketnawa *et al.*, 2012; Nigam, 1999).

La lignocelulosa se compone principalmente de tres grupos de polímeros, lignina, celulosa y hemicelulosa, entrelazados entre sí, lo cual lo hace un material difícilmente degradable. La lignina está estrechamente vinculada a la celulosa y la hemicelulosa, formando una estructura cristalina compleja que proporciona soporte y protección a las células de la planta (Mooney *et al.*, 1999). Una degradación efectiva de la lignocelulosa requiere de pretratamientos con los cuales se pretende romper la estructura de la lignocelulosa, hidrolizar la hemicelulosa e incrementar el área expuesta, para así dar una mayor accesibilidad a las enzimas que hidrolizarán a la celulosa en una segunda etapa de hidrólisis enzimática (Sun y Cheng, 2002). Los azúcares simples obtenidos podrían ser entonces convertidos a etanol por microorganismos tales como la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, microorganismo etanológico de referencia, muy eficiente en la fermentación de glucosa a etanol y comúnmente utilizado por la industria (Banerjee *et al.*, 1981).

Existen numerosos pretratamientos del material lignocelulósico, los cuales se dividen en pretratamientos físicos, como la molienda o el calentamiento; químicos, como la adición de ácidos o bases; físico-químicos, como la auto-hidrólisis o

termo-hidrólisis; y biológicos, como sería el caso del empleo de enzimas capaces de degradar la lignina (ligninasas). La aplicación de microondas como pretratamiento se presenta como una alternativa al calentamiento convencional (Hu y Wen, 2008; Jackowiak *et al.*, 2011; Nomanbhay *et al.*, 2013), que permitiría un calentamiento volumétrico el cual provocaría un aumento instantáneo de la temperatura al existir un contacto directo entre el producto y el campo electromagnético generado por las microondas (De la Hoz *et al.*, 2005; Keshwani y Cheng, 2010). Este calentamiento volumétrico contrastaría con los procesos convencionales de calentamiento, ya que estos últimos transfieren la energía desde la superficie con la consecuente lenta penetración del calor (Liu *et al.*, 2014). Algunos autores afirman que el calentamiento volumétrico podría ahorrar energía al reducir los tiempos de procesamiento (Hu y Wen, 2008; Jackowiak *et al.*, 2011; Nomanbhay *et al.*, 2013). Según Lu *et al.* (2011), el pretratamiento con microondas puede mejorar los rendimientos de la hidrólisis enzimática hasta cuatro veces en comparación a la realizada sin pretratamiento; no obstante, para esto fue necesario alcanzar temperaturas superiores a los 160 °C, lo cual genera otros inconvenientes derivados de las altas temperaturas, tales como la formación de compuestos inhibitorios sobre los microorganismos productores de etanol (Cantarella *et al.*, 2004; Klinke *et al.*, 2004; Rasmussen *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2005).

Los compuestos inhibitorios pueden ser organizados en tres grupos principales, en función de su origen: ácidos orgánicos (principalmente ácido acético, ácido fórmico y ácido levulínico), derivados del furano (furfural (F) e hidroximetilfurfural (HMF)), y compuestos fenólicos (principalmente ácido cumárico, siringaldehído y la vainillina) (Chandel *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2011). Los compuestos fenólicos son productos de degradación de la lignina, mientras que el F y el HMF resultan de la degradación de la hemicelulosa y celulosa, respectivamente.

Los compuestos fenólicos afectan a las membranas biológicas causando pérdida de la integridad celular, así como a su capacidad para servir como barreras selectivas y matrices de enzimas, lo que influye sobre el crecimiento de las células y la asimilación del azúcar (Chandel *et al.*, 2011; Palmqvist y Hahn-Hagerdaal, 2000). Por su parte, el furfural inactiva la replicación celular reduciendo la tasa de crecimiento específico (Azhar *et al.*, 1981; Boyer *et al.*, 1992; Navarro, 1994), el rendimiento de la masa celular en ATP (Palmqvist *et al.*, 1999), la tasa de crecimiento volumétrico (Azhar *et al.*, 1981; Navarro, 1994), y la productividad específica del etanol (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000; Taherzadeh *et al.*, 1999). Entre los efectos del HMF se ha estudiado que afecta negativamente la tasa de crecimiento, la velocidad de fermentación y la composición celular de *S. cerevisiae* (Taherzadeh *et al.*, 2000). Sin embargo, varios investigadores han demostrado que los compuestos fenólicos son más tóxicos para la fermentación de microorganismos que los compuestos furanos (Chandel *et al.*, 2011; Palmqvist y Hahn-Hagerdaal, 2000).

En el presente trabajo se plantea como objetivo general estudiar las microondas como pretratamiento de la biomasa lignocelulósica que constituye el

residuo de industrialización de piña. Para tal fin, se analizará el efecto de las microondas sobre el calentamiento experimentado por el residuo y la microestructura del mismo, aspectos que van a determinar los compuestos presentes en el hidrolizado. De este modo, se evaluará cómo el calentamiento y las modificaciones estructurales influyen sobre la composición del residuo sacarificado mediante la caracterización fisicoquímica del residuo pretratado e hidrolizado, incluyendo el análisis de compuestos inhibitorios de la fermentación tales como los compuestos fenólicos y el furfural e hidroximetilfurfural.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y preparación de la muestra

Se trabajó con piñas (*Ananas comosus* [L.] Merr., MD-2 cv.), seleccionadas basándose en factores externos tales como la ausencia de defectos, el estado de madurez y el peso.

Para obtener el residuo o muestra de estudio, el material vegetal se lavó en una disolución de hipoclorito de sodio (0,1%) durante 5 minutos. Posteriormente, se separaron la corona y la pulpa del corazón y la corteza mediante un cortador de piña (GEFU). Estos últimos se trocearon y prensaron utilizando una prensa hidráulica a 2,5 bar (Vincent Corporation, modelo CP-4) con una relación de prensado de 0,49. La fase líquida obtenida se desechó por no ser objeto del presente estudio, mientras que la torta de prensado se trituró en una batidora americana durante 5 min a velocidad máxima (Philips, modelo Avance Collection HR2096, 800 W). Por último, el resultado de estas operaciones (en adelante, residuo triturado) se introdujo en frascos de vidrio (40 g/frasco) y se mantuvo congelado a -22 °C, hasta su posterior uso en los experimentos.

La preparación de la muestra a partir del residuo triturado y congelado se realizó descongelando dicho residuo a temperatura ambiente durante 1 h, y mezclándolo con agua bidestilada en proporción de 1:1 (m/m) con el fin de mejorar el rendimiento del pretratamiento con microondas (Azuma *et al.*, 1984; Ooshima *et al.*, 1984). De este modo a 40 g de residuo triturado descongelado se adicionaron 40 ml de agua bidestilada, lo que se denominará en adelante residuo reconstituido.

Pretratamiento con microondas

El pretratamiento se llevó a cabo usando un horno microondas doméstico provisto de un plato giratorio (LG MH6340FS) con una frecuencia de 2,45 GHz. Las muestras se trataron en recipientes circulares de polipropileno (PP) de uso especial para microondas provistos de tapa (Ø interno 75 mm), a las siguientes potencias nominales: 340, 510 y 680 W, lo que se traduce en las siguientes potencias aplicadas: 4,25; 6,375 y 8,5 W/g, y a intervalos de tiempo de 1, 2, 5, 10 y 15 minutos. Se determinaron y ajustaron las pérdidas de masa como

consecuencia del pretratamiento, reconstituyendo con agua bidestilada hasta los 80 g originales. Finalmente, se ajustó el pH del residuo a 5 mediante la adición de NaOH 1 N (Panreac Química, S.L.U.) para la posterior hidrólisis enzimática. 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 de piña reconstituido y con el pretratado con microondas, en frascos de cristal de 100 ml. La mezcla se llevó a estufa de incubación (mod. Incudigit, JP Selecta, España) 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).

Estudio del calentamiento por microondas mediante termografía

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. Las muestras fueron expuestas al tratamiento por microondas en recipientes cerrados a potencias de 4,25 W/g, 6,375 W/g y 8,5 W/g y tiempos entre 1 y 15 minutos. Inmediatamente al terminar el tratamiento, se tomaron fotografías de la parte inferior del recipiente con la cámara termográfica. El análisis se realizó con el software Testo IRSoft. Las pérdidas de temperatura al sacar el recipiente del microondas y tomar la imagen se consideraron despreciables (Liu *et al.*, 2014; Pitchai *et al.*, 2012; Tang y Cavalieri, 2001; Zhou *et al.*, 1995).

Análisis de las propiedades fisicoquímicas

Se determinaron la humedad (x_w), el pH, los Sólidos Solubles Totales (SST) y el perfil de azúcares, en el residuo de piña sacarificado sin pretratar y en cada residuo de piña sacarificado pretratado con microondas a los diferentes tiempos y potencias del tratamiento. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD, PH Y SÓLIDOS SOLUBLES TOTALES

El contenido en humedad (x_w) se determinó mediante el método gravimétrico de doble pesada 20.103 (AOAC, 1990) para frutas ricas en azúcar, basado en la determinación de la pérdida de peso de una muestra cuando se coloca en una estufa (JP Selecta, España) a una temperatura constante de 60 °C, hasta alcanzar

peso constante. El contenido en humedad (g agua/g muestra) se determina por diferencia de pesada entre el peso de la muestra antes y después del periodo en estufa.

El pH se determinó con un pH-metro digital con electrodo de contacto (modelo S20, Mettler Toledo, España), previamente calibrado con disoluciones tampón de referencia.

El contenido en SST se determinó por refractometría (refractómetro modelo: NAR T3, Atago, Japan) a 20 °C según el método ISO 1743:1982. Las determinaciones se realizaron sobre la fase líquida separada del residuo mediante una prensa manual.

Análisis de compuestos inhibitorios de la fermentación

De entre los compuestos inhibitorios de la fermentación que pueden generarse durante los pretratamientos e hidrólisis, se determinaron el contenido en Fenoles Totales (FT), Furfural (F) e Hidroximetilfurfural (HMF), partiendo sobre la base de que están frecuentemente presentes y de que sus concentraciones son generalmente más altas que las de otros compuestos formados (Cantarella *et al.*, 2004). Se analizó la concentración de dichos compuestos en el residuo de piña sacarificado sin pretratar, así como en cada residuo de piña sacarificado y pretratado con microondas, a las diferentes potencias y tiempos del tratamiento. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

CONTENIDO EN FENOLES TOTALES

El contenido en fenoles totales se determinó espectrofotométricamente con el método de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999, Wolfe *et al.*, 2003). Se añadieron 0,125 ml de la fase líquida del residuo 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, dejando reposar el conjunto a temperatura ambiente y en total oscuridad durante 90 minutos antes de medir la absorbancia a 760 nm (Thermo Scientific, mod. Helios Zeta). La concentración en fenoles totales se determinó utilizando una curva estándar de ácido gálico (5-50 mg/ml) (Sigma-Aldrich, Co.), de modo que el contenido en fenoles totales se expresó como mg de equivalentes de ácido gálico por ml de fase líquida del residuo sólido de piña (mg EAG/ml).

CONTENIDO EN FURFURAL E HIDROXIMETILFURFURAL

El contenido en Furfural (F) e Hidroximetilfurfural (HMF) presentes en la fase líquida del residuo se determinó 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. La columna utilizada fue Kromasil® 100 C-18 (3 µm×250×4,6 mm i.d.) (Sigma-Aldrich, Co.). Los análisis se realizaron a 25 °C y con un volumen de inyección de 10 µl. 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 µg/ml) e HMF (1-100 µg/ml) se prepararon disolviendo los patrones correspondientes (pureza ≥ 98%, Sigma-Aldrich, Co.) en agua con 10% (v/v) de metanol (Panreac Química, S.L.U.).

Análisis estructural - Cryo SEM

Se estudiaron los cambios microestructurales producidos por los pretratamientos en el residuo de piña con la técnica de Microscopía Electrónica de Barrido a bajas temperaturas (Cryo-SEM). Para ello, se hizo uso de un equipo Cryostage CT-1500C (Oxford Instruments) acoplado a un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-5410. El tiempo de sublimación en la cámara del microscopio fue de 20 min a -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 metaliza a vacío 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. Se realizaron micrografías del residuo antes y después de ser sometido a distintos pretratamientos con microondas.

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 ≤ 0,05) con el paquete informático Statgraphics Centurion XVI.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis por termografía. Evolución de la temperatura durante el pretratamiento con microondas

El análisis de la evolución de la temperatura durante el pretratamiento por microondas se muestra en la Figura 1. En cada termografía, la cruz indica el punto más caliente (PC) y se adjunta la escala de temperaturas.

El análisis demuestra que un incremento de la potencia y tiempo aplicados implica alcanzar mayores temperaturas. La irradiación por MW provoca el calentamiento selectivo de las moléculas polares del material lignocelulósico, lo que resulta en una distribución heterogénea de temperaturas. Según apuntan Hu y

Wen (2008), la aparición de puntos calientes podría provocar un efecto de explosión que contribuiría a la disrupción de la lignocelulosa. Conforme avanza el proceso de calentamiento se alcanza mayor homogeneidad en las muestras, lo que ocurre a distintos tiempos en función de la potencia aplicada. Estos resultados son similares a los obtenidos por Kumar *et al.* (2014), que indicaron que bajas potencias requieren de tiempos mayores para alcanzar un calentamiento homogéneo. Por otro lado, cabe destacar que el punto caliente se localiza centrado mientras la distribución de temperaturas es homogénea, mientras que se encuentra desplazado al principio y final del tratamiento, coincidiendo con una mayor heterogeneidad de calentamiento en la muestra. Al final del tratamiento, este desplazamiento podría ser consecuencia de la pérdida de agua en la parte central de la muestra debida a la evaporación, quedando modificado de este modo el punto de energía máxima que se localizaría en otras regiones donde todavía existe cierto contenido de humedad (Liu *et al.*, 2014; Pitchai *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 1995). De hecho, se comprobó la aparición de calcinaciones en muestras sometidas a 6.375 W/g y superiores, a tiempos largos.

En la figura 2 se presentan las temperaturas máxima, mínima y promedio registradas en el residuo, en función del tiempo de tratamiento y a las diferentes potencias aplicadas. En todos los casos, un aumento de la potencia y tiempo supone un incremento de la temperatura alcanzada, lo que confirma los resultados obtenidos por otros autores (Liu *et al.*, 2014, Pitchai *et al.*, 2012, Wang *et al.*, 2001 y Zhou *et al.*, 1995). Los gráficos que se muestran confirman la existencia de diferentes periodos durante el calentamiento por MW: un periodo inicial o de inducción, en el que la temperatura se encuentra por debajo del punto de ebullición del agua; un periodo constante, en el que la temperatura ronda los 100 °C; y un último periodo, en el que la temperatura alcanza valores superiores a los 100 °C, y hasta 160 °C, en el que se habría perdido de nuevo homogeneidad del calentamiento en el residuo. Según puede apreciarse en la figura, los valores de temperatura alcanzados, así como la duración de cada uno de los periodos, depende de la potencia aplicada. El análisis estadístico realizado sobre los resultados (ANOVA multifactorial), indicó que tanto el tiempo como la potencia aplicada, así como la interacción entre ambos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre las tres temperaturas (p -valor < 0,05).

Según Kumar *et al.* (2014) la potencia de microondas resultaría más eficiente a tiempos cortos que a largos debido a que es donde mayores cambios de temperatura se registran, lo cual coincide con los resultados del presente trabajo. No obstante, cabe recordar que el calentamiento no es el único efecto que pueden ejercer las microondas sobre la estructura del residuo, ya que el campo electromagnético aplicado puede crear efectos no-térmicos que también aceleran la destrucción de las estructuras cristalinas (De la Hoz *et al.*, 2005).

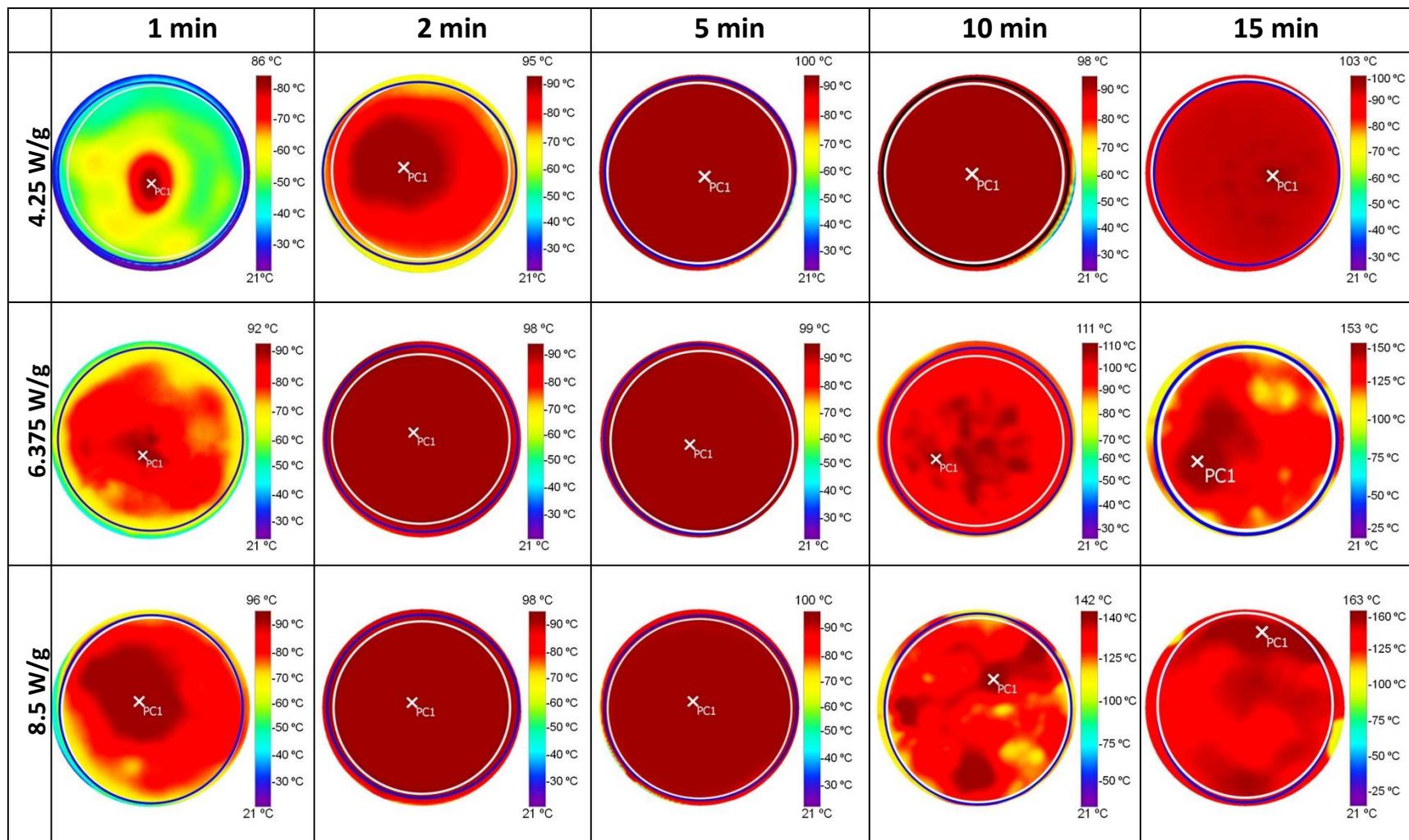


FIGURA 1. Termografías correspondientes a la base del recipiente conteniendo el residuo de piña pretratado con microondas a distintas potencias (4,25; 6,375 y 8,5 W/g) y tiempos (1; 2; 5; 10 y 15 min). PC1: Punto más caliente.

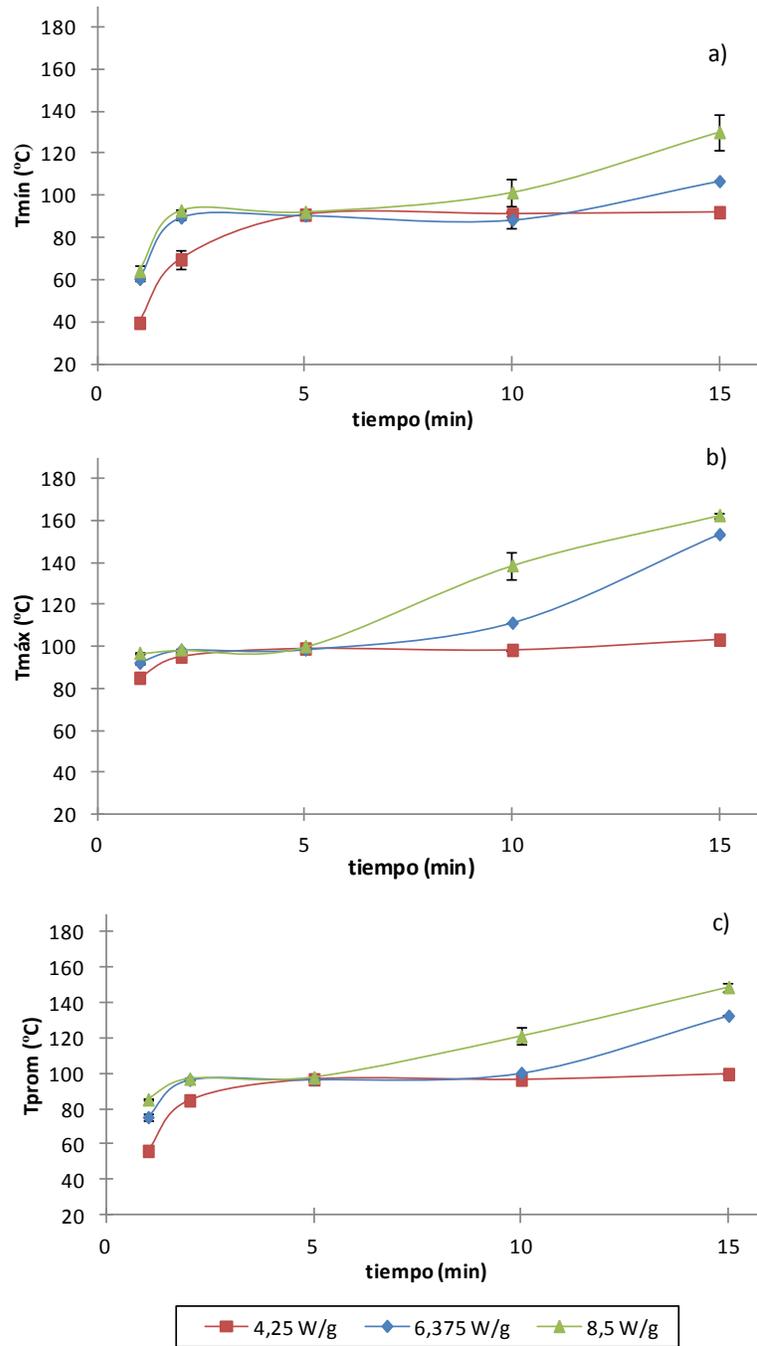


FIGURA 2. Evolución de la temperatura mínima (Tmín) (a), temperatura máxima (Tmáx) (b) y temperatura promedio (Tprom) (c), para las diferentes potencias y tiempos de exposición aplicados.

Caracterización fisicoquímica del residuo hidrolizado

CONTENIDO EN HUMEDAD Y PH

Las figuras 3 y 4 muestran los resultados correspondientes a la caracterización fisicoquímica en términos de humedad (x_w) y pH de los residuos pretratados y sacarificados, respectivamente. En ambos casos, los resultados se comparan el residuo hidrolizado enzimáticamente sin pretratamiento previo (línea discontinua).

El análisis estadístico mostró que la potencia nominal, el tiempo de exposición a las microondas y su interacción tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el contenido en humedad de la muestra (p -valor < 0,05). No obstante, el único resultado que aparece estadísticamente separado del resto corresponde al tratamiento que aplica la máxima potencia y tiempo (figura 3). Si bien el agua eliminada durante la etapa de microondas se reincorpora a la muestra una vez terminada ésta, este valor estaría indicando una menor disponibilidad de la misma en esta muestra al finalizar la etapa de sacarificación. Con respecto al pH (figura 4), los resultados indican que existen diferencias estadísticamente significativas (p -valor < 0,05) entre los distintos tratamientos, aunque no se aprecia una tendencia clara. Las diferencias registradas no son notables y responderían a las distintas especies liberadas al medio durante la hidrólisis enzimática de residuo (azúcares), así como a los compuestos de degradación que pudieran aparecer como consecuencia del pretratamiento por microondas y posterior sacarificación (compuestos fenólicos, furfural e hidroximetilfurfural, entre otros).

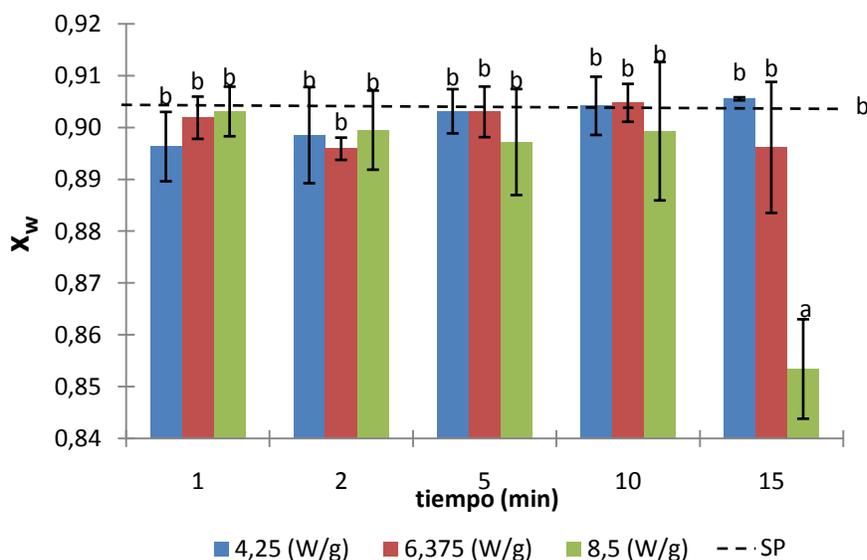


FIGURA 3. Humedad (x_w) del residuo pretratado con microondas y posteriormente sacarificado. La línea discontinua representa el valor correspondiente al residuo hidrolizado enzimáticamente y sin pretratamiento (SP). ^{a,b,c} Superíndices similares indican grupos estadísticamente homogéneos con un intervalo de confianza del 95%.

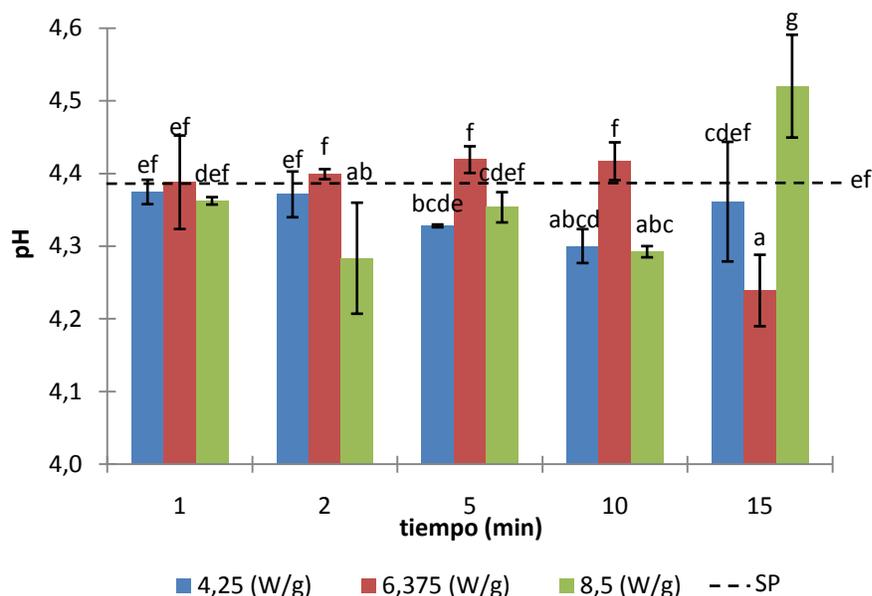


FIGURA 4. Valores de pH del residuo pretratado con microondas y posteriormente sacarificado. La línea discontinua representa el valor correspondiente al residuo hidrolizado enzimáticamente y sin pretratamiento (SP). ^{a,b,c} Superíndices similares indican grupos estadísticamente homogéneos con un intervalo de confianza del 95%.

CONTENIDO EN SÓLIDOS SOLUBLES TOTALES (SST)

En la figura 5 se muestran los resultados correspondientes a los SST (° Brix) medidos sobre la fase líquida del residuo sólido pretratado con microondas a las diferentes potencias y tiempos de exposición, y posteriormente sacarificado. La línea discontinua representa el valor correspondiente al residuo hidrolizado sin pretratar. Los SST se han utilizado como 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.

El análisis estadístico realizado indicó que la potencia nominal aplicada, el tiempo de exposición a las microondas y la interacción entre ambos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el contenido en SST del residuo pretratado (p -valor < 0,05). En general, a potencias nominales bajas (4,25 W/g), aumentar el tiempo de exposición a las microondas no genera un cambio significativo del contenido en SST con respecto al residuo sin pretratar. Sin embargo, pretratar con microondas el residuo de piña a potencias intermedias y altas (6,375 y 8,5 W/g, respectivamente) y tiempos de exposición cortos (hasta 5 y 2 min, respectivamente) provoca un incremento estadísticamente significativo en el contenido en SST con respecto al residuo sin pretratar. Tratamientos más largos implican un descenso del contenido en SST, siendo estadísticamente significativo a los 15 min de tratamiento para ambas potencias nominales.

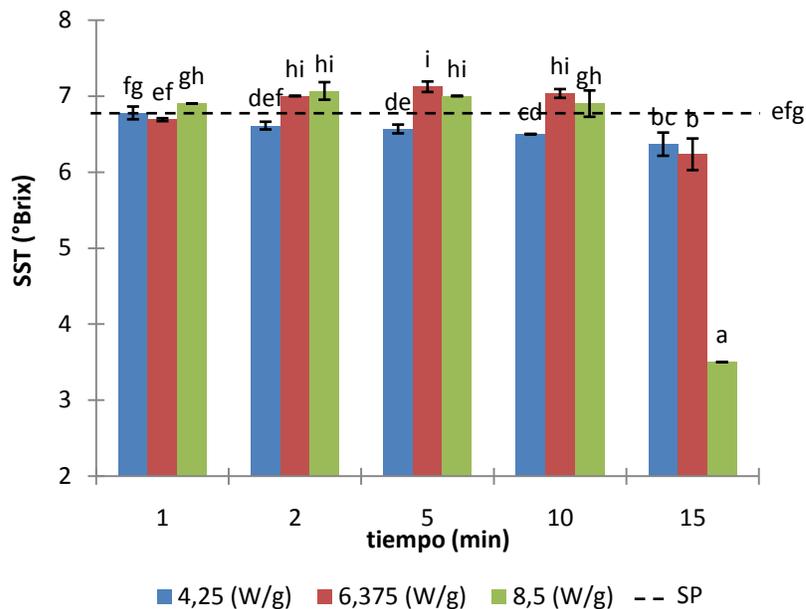


FIGURA 5. Contenido en SST del residuo pretratado con microondas y posteriormente sacarificado. La línea discontinua representa el valor correspondiente al residuo hidrolizado enzimáticamente y sin pretratamiento (SP).
^{a,b,c} Superíndices similares indican grupos estadísticamente homogéneos con un intervalo de confianza del 95%.

Los resultados obtenidos sugieren que pretratar con microondas el residuo de piña a potencias nominales intermedias y altas (6,375 y 8,5 W/g) y tiempos de exposición moderados (de 2 hasta 10 y 5 min, respectivamente) podría mejorar el rendimiento de la hidrólisis enzimática. Estos resultados coinciden con otros trabajos realizados en el mismo laboratorio (Bernat-Senent, 2013), en los que se habría confirmado además un aumento en el contenido en azúcares fermentables (glucosa, fructosa y sacarosa, determinados por cromatografía) en las muestras sacarificadas que habían sido pretratadas con microondas aplicando tratamientos moderados. Por otra parte, mayores potencias y tiempos de exposición provocarían una degradación de los azúcares presentes en el medio, como sugieren Binod *et al.* (2012). La degradación de los azúcares puede producirse como consecuencia de las altas temperaturas alcanzadas durante el tratamiento con microondas (Zhu *et al.*, 2005). Sin embargo, puesto que existe una separación de la fase líquida previa al pretratamiento por microondas con el fin de minimizar la cantidad de azúcares originalmente presentes en el residuo sólido, este resultado sugiere una degradación de los polímeros susceptibles de la acción enzimática posterior (celulosa, hemicelulosa), bien directamente, o bien de los azúcares liberados a partir de éstos por acción de las MW. Todo esto, unido a una posible modificación de la estructura que limite la acción enzimática posterior.

Componentes inhibitorios de la fermentación

CONTENIDO EN FENOLES TOTALES (FT)

En la Figura 6, se muestra el contenido en fenoles totales presentes en la fase líquida de los residuos pretratados, frente al contenido fenólico del residuo sacarificado sin pretratar SP (línea discontinua). En primer lugar, se puede observar que cualquier pretratamiento por microondas produce un incremento del contenido en fenoles totales en el residuo sacarificado, siendo éste más notable a medida que se incrementa el tiempo de exposición y la potencia de microondas aplicada. A los 15 min de tratamiento con las potencias intermedia y alta (6,375 W/g y 8,5 W/g), se produjo un aumento particularmente notable de FT. Estos compuestos fenólicos generados aparecen como consecuencia de la derivación de la lignina, por efecto del tratamiento por microondas. Los resultados del análisis estadístico (ANOVA multifactorial) indicaron que tanto el tiempo de exposición a las microondas como la potencia aplicada y la interacción entre ambos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el contenido en FT (p -valor < 0,005). De hecho, mayores potencias y tiempos de exposición implican mayores temperaturas alcanzadas durante el pretratamiento, según ha reflejado el análisis de la evolución de la temperatura, lo cual favorece la degradación de la lignina. Hu y Wen (2008) obtuvieron resultados similares con respecto a la generación de compuestos fenólicos por degradación térmica de la lignina.

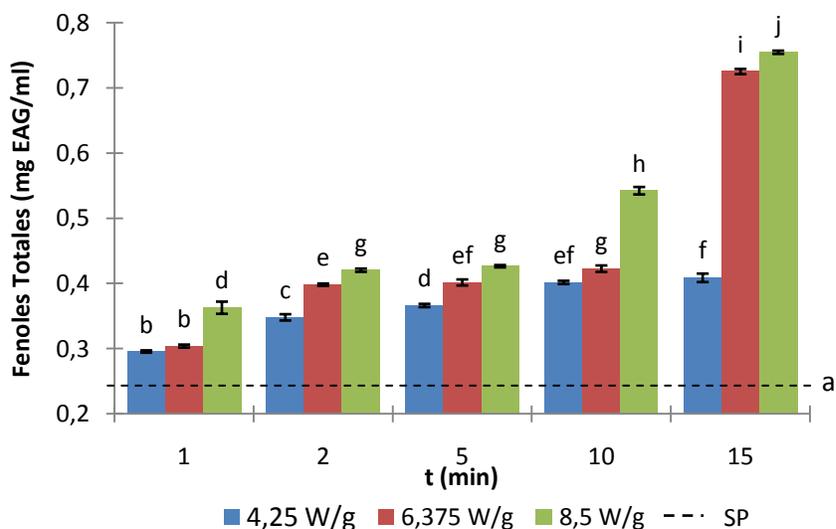


FIGURA 6. Contenido en fenoles totales (mg EAG/ml) del residuo de piña pretratado con microondas a distintas potencias 4,25 W/g, 6,375 W/g y 8,5 W/g y tiempos 1, 2, 5, 10 y 15 min. La línea discontinua representa el valor correspondiente al residuo hidrolizado enzimáticamente y sin pretratamiento (SP).
^{a,b,c} Superíndices similares indican grupos estadísticamente homogéneos con un intervalo de confianza del 95%.

En cualquier caso, a pesar del aumento del contenido en FT, éste no llegaría a ser perjudicial para *S. cerevisiae*. Algunos autores (Ando *et al*, 1986) informaron de que la presencia del contenido total en fenoles de 1 g/l causó una reducción del 30% en el rendimiento de etanol con *S. cerevisiae*; por el contrario, Palmqvist *et al.* (2000) reportaron que 2 g/l de compuestos fenólicos no mostraron efectos negativos en términos de fermentación. Las concentraciones obtenidas en este estudio fueron notablemente inferiores. En consecuencia, se deduce que pretratamientos con microondas a las potencias y tiempos de exposición aplicados no liberarían concentraciones de compuestos fenólicos suficientemente elevadas como para inhibir esta levadura etanológica.

CONTENIDO EN FURFURAL (F) E HIDROXIMETILFURFURAL (HMF)

A continuación se muestra el contenido en F (Figura 7a) e HMF (Figura 7b) de los residuos pretratados con microondas a diferentes potencias y tiempos, y posteriormente sacarificados. El F e HMF podrían aparecer en las muestras sacarificadas debido a la degradación térmica de los azúcares liberados de las cadenas de celulosa y hemicelulosa durante el tratamiento por microondas, y posteriormente degradados térmicamente debido a un tratamiento térmico prolongado. Los resultados obtenidos indican que ambos compuestos aparecen a tiempos largos (10 y 15 min) cuando se emplean potencias intermedias 6,375 W/g y elevadas 8,5 W/g, lo que indicaría a potencias bajas y/o tiempos cortos, no se favorece a la degradación de las pentosas y hexosas responsables de la formación de furfural e HMF respectivamente.

Varios autores han estudiado los efectos del F y el HMF sobre la tasa de crecimiento, la velocidad de fermentación y la composición celular en *Saccharomyces cerevisiae*, llegando algunos a conclusiones contrarias. Lee *et al.* (2011) informaron de que, en la misma concentración el HMF resulta más tóxico que el F. En particular, concentraciones de hasta 5 g/l de furfural no tuvieron un efecto nocivo para la fermentación, mientras que 5 g/l de HMF empezaban a tener un efecto tóxico sobre *S. cerevisiae*. Por el contrario, Taherzadeh *et al.* (2000) concluyeron que a una misma concentración el furfural tiene un mayor efecto inhibitorio que el HMF sobre la fermentación llevada a cabo por *S. cerevisiae*. Por otra parte, Banerjee *et al.* (1981), demostraron que a partir de 4 g/l el furfural inhibe el crecimiento de *S. cerevisiae* en un 80% y la producción de etanol en un 97%. Un resultado similar obtuvieron Taherzadeh *et al.* (1999), que observaron una reducción de la tasa de fermentación cuando la concentración de furfural superó 4 g/l. Por otro lado, diversos autores confirman que concentraciones de furfural e HMF por debajo de 2 g/l no son lo suficientemente altas como para inhibir la levadura *S. cerevisiae* (Banerjee *et al.*, 1981; Cantarella *et al.*, 2004; Gu *et al.*, 2014; Klinke *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2011; Palmqvist *et al.*, 1999; Taherzadeh *et al.*, 1999 y Taherzadeh *et al.*, 2000).

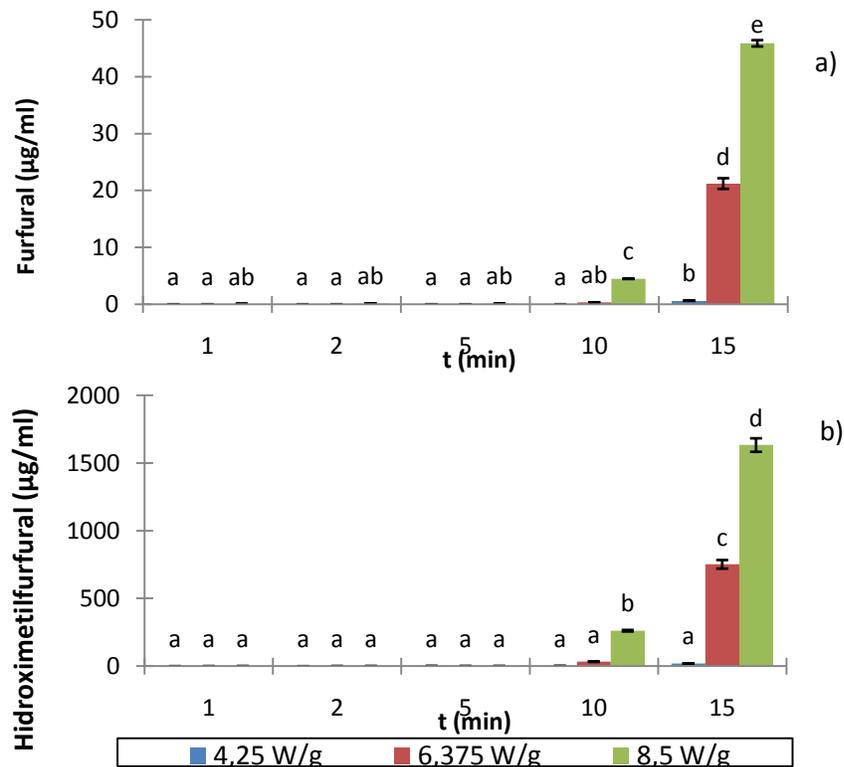


FIGURA 7. Contenido en furfural (a) e hidroximetilfurfural (b) ($\mu\text{g/ml}$) del residuo de piña pretratado con microondas a distintas potencias y tiempos. ^{a,b,c...} Superíndices similares indican grupos estadísticamente homogéneos con un intervalo de confianza del 95%.

Por lo tanto, se concluye que los valores obtenidos en este estudio se encuentran por debajo de los que podrían causar un efecto nocivo en la levadura *S. cerevisiae*, inhibiendo el proceso de fermentación. Por otro lado, los tratamientos que se ha visto liberan una mayor cantidad de azúcares al medio, no coinciden con los que registran una mayor producción de compuestos inhibitorios.

Estudio de la microestructura por microscopía electrónica de barrido de congelación (Cryo-SEM)

Para estudiar los cambios estructurales debidos al tratamiento por MW se seleccionaron dos de los tratamientos más significativos y se compararon con la muestra sin pretratar para poder identificar los cambios ocurridos (Figura 8). Se estudió la muestra sin pretratamiento, la muestra con tratamiento 6,375 W/g – 5 min, debido a que resulto en mejor rendimiento de azúcares y la muestra con tratamiento 8,5 W/g - 15 min, que resultó en un menor rendimiento de azúcares.

En la muestra sin pretratamiento (Figura 8 izquierda), se observan células redondeadas características del tejido parenquimático, en las que se distingue perfectamente la pared celular y el protoplasto.

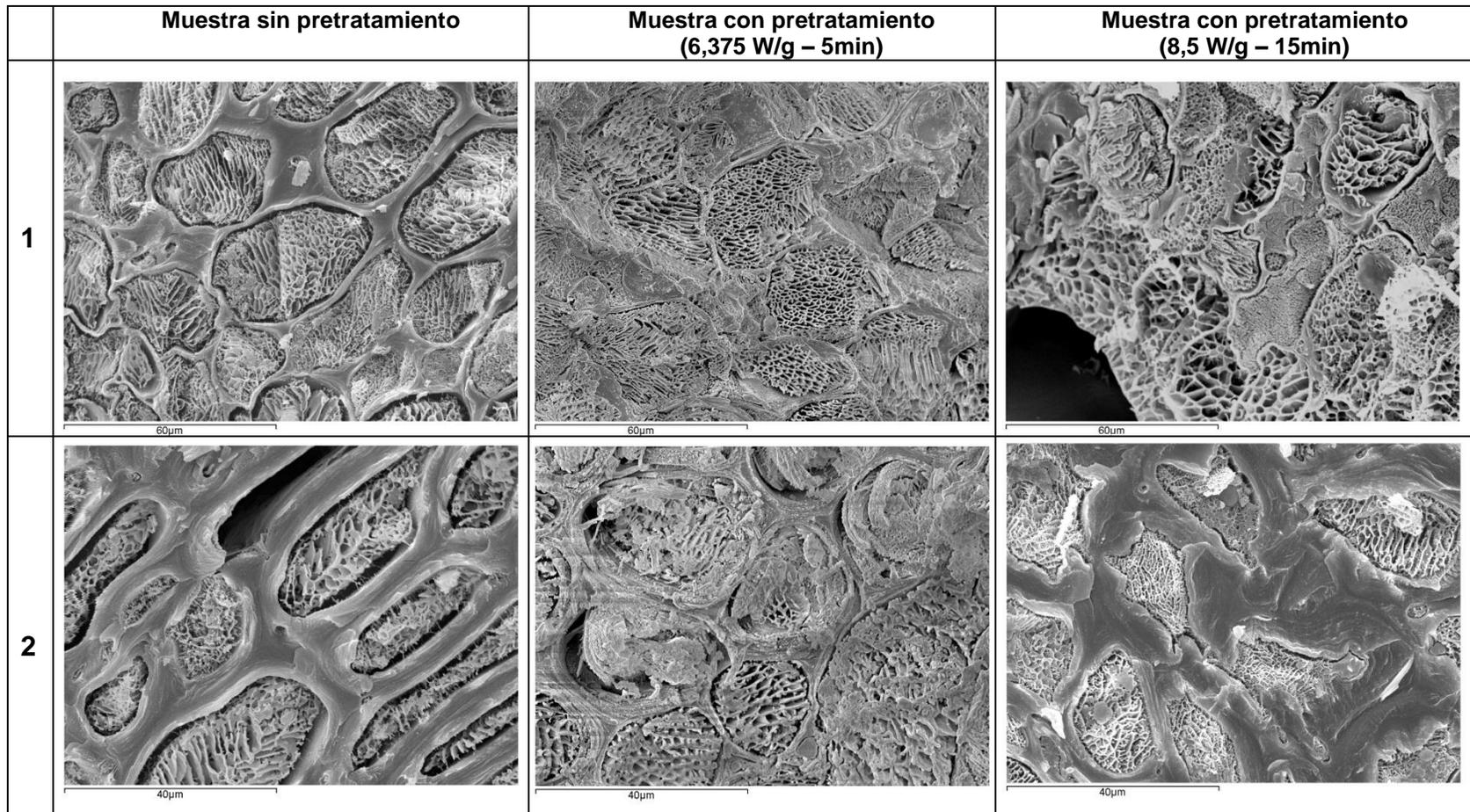


FIGURA 8. Muestras de residuo de piña observadas por Cryo-SEM: muestra sin pretratamiento (1 y 2); muestra sometida a pretratamiento con microondas 6,375 W/g – 5 min (1 y 2) y muestra sometida a pretratamiento con microondas 8,5 W/g - 15 min (1 y 2).

En el residuo sometido a pretratamiento intermedio (Figura 8 centro), se observa cierta degradación de la estructura celular, ya que es posible apreciar una mayor rugosidad de las paredes celulares, así como la separación del protoplasto celular de la pared. Por otro lado, a pesar de no ser fácilmente observable con esta técnica, los signos de desestructuración identificados (plasmólisis, mayor rugosidad de la pared celular) sugieren que también podría existir degradación de las membranas celulares. Estos cambios evidencian que el pretratamiento por MW estaría afectando a la estructura del residuo, lo cual, teniendo en cuenta los resultados de SST para esta combinación potencia-tiempo, estarían repercutiendo positivamente en la hidrólisis enzimática posterior.

Finalmente, a medida que aumentan la potencia y tiempos aplicados (Figura 8 derecha), los cambios estructurales son más manifiestos, evidenciándose una mayor rugosidad celular, indicativa de la deshidratación del tejido. No obstante, no aparece en este caso una separación del protoplasto de la pared celular, sino más bien un encogimiento celular que conllevaría la compactación del tejido en general. Dicha compactación podría ser responsable de la menor efectividad del tratamiento enzimático, puesto que se estaría viendo reducida el área superficial y, por lo tanto, el sustrato susceptible de ser degradado enzimáticamente (Arantes y Saddler, 2011). Por otro lado, se sabe que la deshidratación tiene un efecto negativo sobre la accesibilidad de las enzimas al sustrato debido a una compactación de las fibras de celulosa (Laivins y Scallan, 1996).

Los resultados observados coinciden con efectos observados en otros trabajos (Binod *et al.*, 2012; Hu y Wen, 2008), que refieren que los tratamientos con microondas producen alteraciones de la estructura celular, pudiendo beneficiar la acción enzimática posterior.

CONCLUSIONES

En el contexto de la producción de bioetanol, existe un interés creciente por los pretratamientos de la biomasa lignocelulósica con el fin de mejorar la etapa de sacarificación, de modo que las microondas se han sugerido como una alternativa a los pretratamientos convencionales. Por otro lado, la industria del procesado de la piña produce cantidades significativas de residuos que deben ser gestionados apropiadamente. Obtener valor añadido de esos residuos no sólo contribuiría a reducir su impacto, sino que representaría un mayor beneficio para la industria.

En el presente trabajo, el calentamiento por microondas se ha estudiado con el fin de mejorar el resultado de la hidrólisis enzimática del residuo de piña. Los resultados de aplicar diferentes potencias y tiempos al material residual indican que el pretratamiento con microondas puede mejorar el rendimiento de la sacarificación siempre y cuando se empleen potencias y tiempos intermedios. Por un lado, tratamientos excesivamente suaves no modifican la cantidad de azúcares liberados al medio, mientras que tratamientos agresivos resultan en un descenso en el contenido de azúcares presentes en el hidrolizado. El estudio por termografía y las observaciones microscópicas realizadas sugieren que tanto la degradación

térmica de azúcares como la mayor compactación del tejido pueden ser responsables de un menor rendimiento en este último caso.

Se ha confirmado la liberación de compuestos inhibitorios al medio como consecuencia del pretratamiento con microondas al alargar excesivamente la exposición a las microondas, especialmente cuando se emplean potencias elevadas. No obstante, las concentraciones de dichos compuestos no superan los límites que causarían inhibición según la bibliografía consultada. Por otro lado, empleando condiciones más suaves no sólo se reduce o elimina la liberación de compuestos inhibitorios, sino que la explosión en los puntos calientes, así como las modificaciones estructurales que tienen lugar como consecuencia de las microondas favorecen la acción enzimática posterior.

Como conclusión general del presente trabajo se extrae que el tratamiento con microondas, utilizando la energía y tiempos de exposición apropiados, permite mejorar la eficiencia de la sacarificación enzimática de la lignocelulosa, lo que supondría una mayor producción de bioetanol en un paso posterior. Esto ha sido probado para el residuo industrial de piña, aunque sería potencialmente aplicable a otros residuos de la industria agroalimentaria.

REFERENCIAS

- 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(1), 1-17.
- Azhar, A. F., Bery, M. K., Colcord, A. R., Roberts, R. S., & Corbitt, G. V. (1981, January). Factors affecting alcohol fermentation of wood acid hydrolysate. In *Biotechnol. Symp.*, 293-300
- Azuma, J., Tanaka, F., & Koshijima, T. (1984). Enhancement of enzymatic susceptibility of lignocellulosic wastes by microwave irradiation. *Journal of Fermentation Technology*, 62(4), 377-384.
- Banerjee, N., Bhatnagar, R., & Viswanathan, L. (1981). Inhibition of glycolysis by furfural in *Saccharomyces cerevisiae*. *European journal of applied microbiology and biotechnology*, 11(4), 226-228.
- Bernat Senent, I. G. (2013). Efecto del pretratamiento con microondas en la hidrólisis enzimática de los residuos industriales de la piña para la obtención de bioetanol.
- Boyer, L. J., Vega, J. L., Klasson, K. T., Clausen, E. C., & Gaddy, J. L. (1992). The effects of furfural on ethanol production by *saccharomyces cerevisiae* in batch culture. *Biomass and Bioenergy*, 3(1), 41-48.
- Binod, P., Satyanagalakshmi, K., Sindhu, R., Janu, K. U., Sukumaran, R. K., & Pandey, A. (2012). Short duration microwave assisted pretreatment enhances the enzymatic saccharification and fermentable sugar yield from sugarcane bagasse. *Renewable Energy*, 37(1), 109-116.
- Cantarella, M., Cantarella, L., Gallifuoco, A., Spera, A., & Alfani, F. (2004). Effect of Inhibitors Released during Steam-Explosion Treatment of Poplar Wood on Subsequent Enzymatic Hydrolysis and SSF. *Biotechnology progress*, 20(1), 200-206.
- Chandel, A. K., Chan, E. S., Rudravaram, R., Narasu, M. L., Rao, L. V., & Ravindra, P. (2007). Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 2(1), 14-32.
- Chandel, A. K., Singh, O. V., & da Silva, S. S. (2011). Detoxification of lignocellulosic hydrolysates for improved bioethanol production. INTECH Open Access Publisher.

- De la Hoz, A., Diaz-Ortiz, A., & Moreno, A. (2005). Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects. *Chemical Society Reviews*, 34(2), 164-178.
- Gomis, D. B., Alvarez, M. G., Naredo, L. S., & Alonso, J. M. (1991). High-performance liquid chromatographic determination of furfural and hydroxymethylfurfural in apple juices and concentrates. *Chromatographia*, 32(1-2), 45-48.
- Gu, H., Zhang, J., & Bao, J. (2014). Inhibitor analysis and adaptive evolution of *Saccharomyces cerevisiae* for simultaneous saccharification and ethanol fermentation from industrial waste corncob residues. *Bioresource technology*, 157, 6-13.
- Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M. F., Lidén, G., & Zacchi, G. (2006). Bioethanol—the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in biotechnology*, 24(12), 549-556.
- Hajar, N., Zainal, S., Atikah, O. & Tengku E. (2012). Optimization of Ethanol Fermentation from Pineapple Peel Extract Using Response Surface Methodology (RSM).
- Hu, Z., & Wen, Z. (2008). Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment. *Biochemical Engineering Journal*, 38(3), 369-378.
- 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.
- Itelima, J., Onwuliri, F., Onwuliri, E., Onyimba, I., & Oforji, S. (2013). Bio-ethanol production from banana, plantain and pineapple peels by simultaneous saccharification and fermentation process. *International Journal of Environmental Science and Development*, 4(2), 213-216.
- Jackowiak, D., Frigon, J. C., Ribeiro, T., Pauss, A., & Guiot, S. (2011). Enhancing solubilisation and methane production kinetic of switchgrass by microwave pretreatment. *Bioresource technology*, 102(3), 3535-3540.
- Kang, Q., Appels, L., Tan, T., & Dewil, R. (2014). Bioethanol from lignocellulosic biomass: current findings determine research priorities. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Keshwani, D. R., & Cheng, J. J. (2010). Microwave-based alkali pretreatment of switchgrass and coastal bermudagrass for bioethanol production. *Biotechnology progress*, 26(3), 644-652.
- Ketnawa, S., Chaiwut, P., & Rawdkuen, S. (2012). Pineapple wastes: a potential source for bromelain extraction. *Food and bioproducts processing*, 90(3), 385-391.
- Klinke, H. B., Thomsen, A. B., & Ahring, B. K. (2004). Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied microbiology and biotechnology*, 66(1), 10-26.
- Kumar, C., Joardder, M. U. H., Karim, A., Millar, G. J., & Amin, Z. (2014). Temperature redistribution modelling during intermittent microwave convective heating. *Procedia Engineering*, 90, 544-549.
- Laivins, G. V., & Scallan, A. M. (1996). The influence of drying and beating on the swelling of fines. *Journal of pulp and paper science*, 22(5), J178-J184.
- Lee, H., Cho, D. H., Kim, Y. H., Shin, S. J., Kim, S. B., Han, S. O., ... & Park, C. (2011). Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* K35 to lignocellulose-derived inhibitory compounds. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 16(4), 755-760.
- Liu, S., Ogiwara, Y., Fukuoka, M., & Sakai, N. (2014). Investigation and modeling of temperature changes in food heated in a flatbed microwave oven. *Journal of Food Engineering*, 131, 142-153.
- Liu, Z. L., Slininger, P. J., Dien, B. S., Berhow, M. A., Kurtzman, C. P., & Gorsich, S. W. (2004). Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2, 5-bis-hydroxymethylfuran. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31(8), 345-352.
- Lu, X., Xi, B., Zhang, Y., & Angelidaki, I. (2011). Microwave pretreatment of rape straw for bioethanol production: focus on energy efficiency. *Bioresource technology*, 102(17), 7937-7940.
- Mussatto, S. I., & Teixeira, J. A. (2010). Lignocellulose as raw material in fermentation processes. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* (Méndez-Vilas, A., Ed.), 2, 897-907.

- Mooney, C. A., Mansfield, S. D., Beatson, R. P., & Saddler, J. N. (1999). The effect of fiber characteristics on hydrolysis and cellulase accessibility to softwood substrates. *Enzyme and Microbial Technology*, 25(8), 644-650.
- Navarro, A. R. (1994). Effects of furfural on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Mathematical models. *Current Microbiology*, 29(2), 87-90.
- Nigam, J. N. (1999). Continuous ethanol production from pineapple cannery waste. *Journal of biotechnology*, 72(3), 197-202.
- Nomanbhay, S. M., Hussain, R., & Palanisamy, K. (2013). Microwave-assisted alkaline pretreatment and microwave assisted enzymatic saccharification of oil palm empty fruit bunch fiber for enhanced fermentable sugar yield.
- Ooshima, H., Aso, K., Harano, Y., & Yamamoto, T. (1984). Microwave treatment of cellulosic materials for their enzymatic hydrolysis. *Biotechnology Letters*, 6(5), 289-294.
- Palmqvist, E., Almeida, J. S., & Hahn-Hägerdal, B. (1999). Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. *Biotechnology and bioengineering*, 62(4), 447-454.
- Palmqvist, E., & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource technology*, 74(1), 25-33.
- Pitchai, K., Birla, S. L., Subbiah, J., Jones, D., & Thippareddi, H. (2012). Coupled electromagnetic and heat transfer model for microwave heating in domestic ovens. *Journal of Food Engineering*, 112(1), 100-111.
- Rasmussen, H., Sørensen, H. R., & Meyer, A. S. (2014). Formation of degradation compounds from lignocellulosic biomass in the biorefinery: sugar reaction mechanisms. *Carbohydrate research*, 385, 45-57.
- Saravanan, P., Muthuvelayudham, R., & Viruthagiri, T. (2012). Enhanced production of cellulase from pineapple waste by response surface methodology. *Journal of Engineering*, 2013.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299, 152-178.
- Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource technology*, 83(1), 1-11.
- Taherzadeh, M. J., Gustafsson, L., Niklasson, C., & Lidén, G. (1999). Conversion of furfural in aerobic and anaerobic batch fermentation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 87(2), 169-174.
- Taherzadeh, M. J., Gustafsson, L., Niklasson, C., & Lidén, G. (2000). Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 53(6), 701-708.
- Tang, J., & Cavalieri, R. P. (2001). Heat and mass transport in microwave drying of porous materials in a spouted bed. *AIChE Journal*, 47(7), 1499.
- Wang, S., Tang, J., & Cavalieri, R.P. (2001). Modeling fruit internal heating rates for hot air and hot water treatments. *Postharvest Biology and Technology* 22 (3), 257-270
- Wolfe, K., Wu, X., & Liu, R. H. (2003). Antioxidant activity of apple peels. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(3), 609-614.
- Zhou, L., Puri, V. M., Anantheswaran, R. C., & Yeh, G. (1995). Finite element modeling of heat and mass transfer in food materials during microwave heating—model development and validation. *Journal of food engineering*, 25(4), 509-529.
- Zhu, S., Wu, Y., Yu, Z., Chen, Q., Wu, G., Yu, F., ... & Jin, S. (2006). Microwave-assisted alkali pre-treatment of wheat straw and its enzymatic hydrolysis. *Biosystems Engineering*, 94(3), 437-442.
- Zhu, S., Wu, Y., Yu, Z., Wang, C., Yu, F., Jin, S., ... & Zhang, Y. (2006). Comparison of three microwave/chemical pretreatment processes for enzymatic hydrolysis of rice straw. *Biosystems Engineering*, 93(3), 279-283.
- Zhu, S., Wu, Y., Yu, Z., Zhang, X., Li, H., & Gao, M. (2005). The effect of microwave irradiation on enzymatic hydrolysis of rice straw. *Bioresource technology*, 97(15), 1964-1968.