

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Estudio de la viabilidad de empleo de la operación de impregnación a vacío para la mejora de la etapa de hidrólisis enzimática en el aprovechamiento de los residuos de industrialización de frutas y hortalizas.

TRABAJO FIN DE GRADO EN INGENIERÍA AGROALIMENTARIA Y DEL MEDIO RURAL

ALUMNA: Dña. RAQUEL SÁEZ GARCÍA

TUTORA: Dra. LUCÍA SEGUÍ GIL

COTUTORA: Dra. NOELIA BETORET VALLS

Curso Académico: 2014-2015

Valencia, 1 de Septiembre de 2015

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



Estudio de la viabilidad de empleo de la operación de impregnación a vacío para la mejora de la etapa de hidrólisis enzimática en el aprovechamiento de los residuos de industrialización de frutas y hortalizas.

RESUMEN

Debido a la gran cantidad de residuos que se generan en las industrias agroalimentarias, cada vez se presta mayor atención a la degradación y aprovechamiento de éstos. A día de hoy, una de las alternativas más desarrolladas es la utilización de estos residuos o subproductos para la producción energética de biocombustibles. Estudios previos demuestran que es posible la obtención de biocombustibles a partir de residuos lignocelulósicos de frutas y hortalizas. En particular el rendimiento del proceso de fermentación de estos residuos para la obtención de bioetanol, se ve condicionado en gran medida por el grado de hidrólisis y por el acceso de las bacterias a los sustratos sobre los que actúan. En el presente trabajo se estudia la viabilidad de la técnica de impregnación a vacío para la mejora de la etapa de hidrólisis enzimática, con el fin de mejorar el aprovechamiento de algunos de los residuos generados en la industria alimentaria.

Se han seleccionado 4 residuos (naranja, plátano, alcachofa, haba), teniendo en cuenta valores de producción de residuo total, disponibilidad de los residuos en el tiempo y sus características de porosidad. En todos los residuos se determinó la densidad aparente, actividad del agua, humedad, grados Brix y la capacidad de impregnación de los residuos troceados y triturados con diferentes disoluciones: hipotónica, isotónica con manitol e isotónica con fructosa. A continuación los residuos triturados, impregnados o no, se sometieron a un tratamiento de hidrólisis enzimática y se evaluó el nivel de hidrólisis mediante la medida de los grados Brix y los azúcares fructosa, glucosa y sacarosa, determinados por cromatografía de intercambio iónico.

Tanto los resultados obtenidos en la determinación de la capacidad de impregnación como los obtenidos en la etapa posterior de hidrólisis enzimática, revelan que, en general, la impregnación de los residuos es mayor cuando estos están triturados y en casi todos los casos mejora los resultados de la hidrólisis. Únicamente en el caso de los residuos de naranja, el empleo de una disolución que incluye manitol proporciona mejores resultados en los residuos sin impregnar.

Por lo tanto, como conclusión general del presente trabajo se obtiene que la optimización de la operación de impregnación a vacío aplicada previamente a la etapa de hidrólisis enzimática de determinados residuos agroindustriales, podría suponer un aumento del rendimiento de hidrólisis, lo que se traduciría en mejores rendimientos de producción de bioetanol.

Palabras clave: residuos industria agroalimentaria, biomasa lignocelulósica, impregnación a vacío, hidrólisis enzimática, bioetanol.

Viability of vacuum impregnation as an operation to improve the stage of enzymatic hydrolysis of some fruit and vegetable industrial residues

ABSTRACT

Due to the big amount of residues generated by the food industry, the interest in the degradation and use of these waste materials increases. Nowadays, one of the most developed alternatives is the use of agroindustrial residues or byproducts in biofuels production. Previous studies show that it is possible to obtain biofuels from fruit and vegetable lignocellulosic materials. Particularly, the yield of the fermentation stage is significantly influenced by degree of hydrolysis and the subsequent access of the fermenting bacteria to the fermentable substrates. In the present study, the viability of using vacuum impregnation to improve the stage of enzymatic hydrolysis is studied with the aim of improving the use of these residues generated in the food industry.

Four different residues (orange, banana, artichoke, bean), were selected taking into account production values of the total residues, availability during the progress of the present work and porosity characteristics. Apparent density, water activity, humidity, Brix degrees and impregnation capacity on the sliced and minced residues with different solutions: hypotonic, isotonic, with mannitol and isotonic with fructose, were determined for all residues. The minced residues, impregnated or not, were submitted to a treatment of enzymatic hydrolysis and degree of hydrolysis was evaluated by measuring Brix degrees and the sugars fructose, glucose and sucrose, which were determined by ion exchange chromatography.

Both, impregnation capacity and results of enzymatic hydrolysis suggest that, in general, the impregnation of the residues is more successful when these are minced and, in most cases, vacuum impregnation results in an improvement of the hydrolysis stage. Only in the case of the orange peel, the use of the isotonic solution prepared with mannitol provides better results when vacuum impregnation is not used.

Therefore, the general conclusion of the present work is that the optimization of the vacuum impregnation operation applied previously to the stage of enzymatic hydrolysis of certain agro-industrial residues, could imply an increase in the hydrolysis performance, which would result in an increase in the bioethanol production process.

Key words: food industry waste, lignocellulosic biomass, vacuum impregnation, enzymatic hydrolysis, bioethanol.

Alumna: Dña. Raquel Sáez García

Tutora: Dra. Lucía Seguí Gil

Cotutora: Dra. Noelia Betoret Valls

VALENCIA, 1 de Septiembre de 2015

Licencia Creative Commons “Reconocimiento no Comercial –Sin Obra Derivada”.



AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dedicar estas líneas expresando mi agradecimiento a todas aquellas personas sin la ayuda de las cuales no habría sido posible la realización de este Trabajo Final de Grado.

Especialmente a mis tutoras Lucia Seguí Gil y Noelia Betoret Valls, por su dedicación, supervisión y compromiso en el desarrollo de este trabajo. Por su incondicional ayuda a la hora de compartir conmigo sus conocimientos y experiencias para acercarme a un mayor conocimiento de la operación de impregnación a vacío.

Gracias a todos los profesores, que durante estos 4 años de mi vida me han dado las herramientas necesarias para seguir desarrollándome como persona y profesionalmente.

También quiero dar las gracias a toda mi familia, especialmente a mis padres. Ellos han sido un apoyo y una fuente de motivación constante. Gracias por sus consejos, paciencia y palabras de ánimo.

Gracias también a mis compañeros y profesores del Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IIAD), que pusieron a mi disposición las instalaciones y me enseñaron a usar los equipos y solucionar imprevistos.

Por último, agradecer también a mis amigos y compañeros de carrera su sincera amistad, el cariño recibido y el haber compartido juntos momentos inolvidables.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.....	5
3. MATERIAL Y MÉTODOS	6
3.A. GENERACIÓN DE RESIDUOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.	6
3.A.1. Criterios de búsqueda.....	6
3.B. ESTUDIO DE LA IMPREGNACIÓN A VACÍO COMO POSIBILIDAD DE MEJORA DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE RESIDUOS INDUSTRIALES DE FRUTAS Y HORTALIZAS.....	6
3.B.1. Material vegetal empleado.....	6
3.B.2. Obtención del residuo sólido.....	7
3.B.3. Caracterización fisicoquímica del residuo.....	7
3.B.3.1. Densidad aparente (ρ_{ap}).....	7
3.B.3.2. Actividad del agua (a_w).....	8
3.B.3.3. Humedad (x_w).....	8
3.B.3.4. Sólidos solubles totales (SST).....	8
3.B.3.5. Mecanismo hidrodinámico (HDM). Parámetros de impregnación a vacío (IV) ..	8
3.B.4. Diseño experimental: Descripción de los ensayos de IV e hidrólisis enzimática de los residuos.....	9
3.B.5. Determinaciones analíticas sobre las muestras sacarificadas.....	11
3.B.5.1. Sólidos solubles totales (SST).....	11
3.B.5.2. Perfil de azúcares.....	11
3.B.6. Análisis estadístico.....	11
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
4.A . RESULTADOS SOBRE LOS RESIDUOS QUE SE GENERAN EN LAS INDUSTRIAS AGROALIMENTARIAS.....	12
4.A.1. Composición del residuo e interés de sus aplicaciones. Posibilidad de hidrólisis enzimática.....	13
4.A.2. Posibilidad de aplicación de la impregnación a vacío para mejorar la hidrólisis enzimática de biomasa residual.....	14

4.B. ESTUDIO DE LA IMPREGNACIÓN A VACÍO COMO POSIBILIDAD DE MEJORA DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE RESIDUOS INDUSTRIALES DE FRUTAS Y HORTALIZAS.....	16
4.B.1. Caracterización fisicoquímica de los residuos.....	16
4.B.2. Mecanismo hidrodinámico (HDM) y capacidad de impregnación.....	16
4.B.3. Caracterización del residuo hidrolizado enzimáticamente.....	19
4.B.4. Determinación del perfil de azúcares en el residuo hidrolizado por cromatografía de intercambio iónico.	22
5. CONCLUSIONES	25
6. BIBLIOGRAFÍA	26

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de las disoluciones de impregnación utilizadas para la determinación de la capacidad de impregnación.....	10
Tabla 2. Diseño experimental de la hidrólisis enzimática con y sin IV previa.....	10
Tabla 3. Principales residuos que se producen en las industrias agroalimentarias. Valores de porcentaje de residuos, producción total (T) y producción de residuos total (T)	12
Tabla 4. Caracterización fisicoquímica de los diferentes residuos	16
Tabla 5. Resultados de los parámetros correspondientes al mecanismo hidrodinámico para los residuos troceados.....	17

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama del proceso de producción de bioetanol a partir de diferentes residuos de biomasa lignocelulósica.	2
Figura 2. Estructura de la biomasa lignocelulósica	13
Figura 3. Porcentaje de ganancia (%G) de cada uno de los líquidos de impregnación, para los residuos triturados.....	18
Figura 4. Porcentaje de ganancia (%G) de cada uno de los líquidos de impregnación, para los residuos troceados y triturados	19
Figura 5. Incremento de los grados Brix después de la hidrólisis enzimática del residuo de naranja para cada una de las disoluciones de impregnación y tratamientos.....	20
Figura 6. Incremento de los grados Brix después de la hidrólisis enzimática del residuo de plátano para cada una de las disoluciones de impregnación y tratamientos.....	21
Figura 7. Incremento de los grados Brix después de la hidrólisis enzimática del residuo de alcachofa para cada una de las disoluciones de impregnación y tratamientos.....	21
Figura 8. Cromatograma correspondiente al mix de patrones glucosa, fructosa, sacarosa y manitol (Concentración = 10 ppm)	22
Figura 9. Cromatograma correspondiente a la fase líquida separada del residuo hidrolizado de naranja (dilución 1:2000)	23
Figura 10. Concentraciones (mg/mL) de sacarosa, glucosa, fructosa y manitol en la fase líquida separada del residuo hidrolizado, para cada una de las disoluciones empleadas, en el caso de la naranja	24

Figura 11. Concentraciones (mg/mL) de sacarosa, glucosa, fructosa y manitol en la fase líquida separada del residuo hidrolizado, para cada una de las disoluciones empleadas, en el caso del plátano 24

Figura 12. Concentraciones (mg/mL) de sacarosa, glucosa, fructosa y manitol en la fase líquida separada del residuo hidrolizado, para cada una de las disoluciones empleadas, en el caso de la alcachofa. 24

1. INTRODUCCIÓN

Los cambios socioeconómicos de las últimas décadas, las altas concentraciones de población en núcleos urbanos, el desarrollo de la industria agroalimentaria, la intensificación de las explotaciones ganaderas, las prácticas consumistas, etc., han propiciado la producción de grandes cantidades de residuos orgánicos que ocasionan graves problemas ambientales. Una primera clasificación de los residuos se puede realizar en función de su origen, distinguiendo los residuos procedentes del sector primario, residuos agrícolas, ganaderos y forestales, los procedentes del sector secundario, residuos industriales (agroalimentarios, textiles, etc.) y finalmente los procedentes del sector terciario o de servicios, constituidos por residuos sólidos urbanos (RSU) y lodos de estaciones depuradoras de aguas residuales (Pomares, 1998).

El sector agroindustrial está caracterizado por un importante consumo energético y una fuerte producción de desechos orgánicos. Una gestión eficaz de ambos aspectos resulta crucial, particularmente para las pequeñas y medianas industrias agroalimentarias (<http://actualidad.ainia.es>). Por lo tanto, existe la necesidad de gestionar los residuos producidos en las plantas de procesado de alimentos ya que éstos generan un problema operacional grave y son una amenaza constante para el medio ambiente (Goula y Lazarides, 2015).

El almacenamiento final en vertederos no es una opción sostenible, por lo que la mejor solución sigue consistiendo en prevenir la producción de residuos, en reintroducirlos en el ciclo económico y de producción mediante la reutilización y el reciclado de la mayor cantidad posible de sus componentes, y en su valorización energética (Ojeda, 2009).

En general, una gestión eficaz requiere realizar acciones en tres ámbitos: 1) reducción del residuo en origen; 2) aplicación de tratamientos con el fin de conseguir un nivel de calidad acorde con el destino final; y 3) planificación y control del destino y uso del producto. Estos planes de gestión deben establecerse, siempre que sea posible, con la finalidad de obtener un producto de calidad que pueda ser aplicado al suelo como enmienda o abono orgánico o que sea adecuado para la formulación de sustratos de cultivo (valorización agronómica). Cuando esta valorización no sea posible se planificará la viabilidad de su valorización energética. Si ninguna de las anteriores alternativas resulta viable se procederá a programar su aislamiento final en vertederos controlados (www.infoagro.com).

La utilización de residuos o subproductos para la producción energética tiene un enorme interés, ya que en los últimos años se ha producido un aumento considerable de la demanda de energía, que trae consigo un agotamiento de los recursos de combustibles fósiles, un aumento de los precios del combustible, un aumento de las emisiones de los gases efecto invernadero (GEI), etc.

Contamos con una amplia gama de residuos agrícolas, como por ejemplo, rastrojo de maíz, cascarilla de arroz, paja de trigo, bagazo de caña, subproductos de plátano, etc., que se pueden emplear para la obtención de biocombustibles a través de vía bioquímica, es decir pretratamiento, hidrólisis y fermentación de biomasa lignocelulósica. Estos combustibles presentan unos importantes beneficios para el medio ambiente si se comparan con los combustibles derivados del petróleo. Algunas de las ventajas que presentan son: la reducción

de las emisiones de compuestos orgánicos volátiles, menor toxicidad a la hora de su manipulación y su mayor biodegradabilidad.

En definitiva, los biocombustibles son promovidos como un medio para lograr la seguridad energética y reducir las emisiones de gases de efecto invernadero. Los biocombustibles derivados de la biomasa lignocelulósica, sobre todo a partir de cultivos agrícolas, están siendo apoyados masivamente en todo el mundo para mitigar el cambio climático, asegurar la disponibilidad energética y promover el desarrollo de la economía rural. Por tanto, la bioenergía es comprendida como un recurso prometedor con sus ventajas ambientales y económicas, que cada vez son más perceptibles debido a las mejoras en la tecnología (Sonil *et al.*, 2015).

La biomasa incluye restos de residuos agrícolas, forestales y sólidos urbanos, así como residuos agroindustriales de la industria de alimentos y de otras industrias (Cardona y Sánchez, 2005). Representa una fuente renovable de energía, con gran potencial para la producción de biocombustibles, cuyo uso permitiría reducir el consumo de combustibles fósiles y limitar las emisiones de CO₂, NO_x y SO_x a la atmósfera y la contaminación por metales pesados. Además, se encuentra mucho mejor distribuida sobre la superficie de la tierra que los combustibles fósiles y puede ser explotada usando tecnologías más económicas (Salcedo *et al.*, 2011).

La utilización de biomasa para la producción de biocombustibles, requiere la hidrólisis de las cadenas lignocelulósicas largas en azúcares simples, de forma que puedan ser utilizados por las bacterias fermentativas. A continuación se representa el proceso de obtención de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica (**figura 1**).

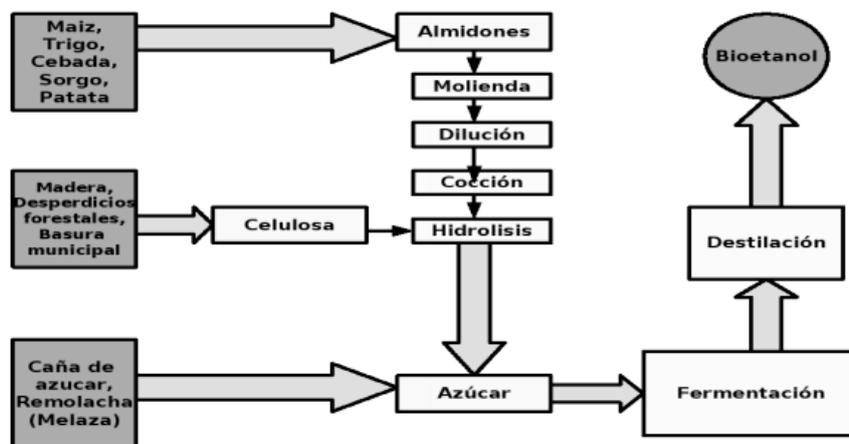


Figura 1. Diagrama del proceso de producción de bioetanol a partir de diferentes residuos de biomasa lignocelulósica. Elaboración propia a partir de: *Ministerio Agropecuario y Forestal. Republica de Nicaragua. APPA (2006) Asociación de productores de energías renovables. "Una estrategia de biocarburantes para España (2005-2010). "http://www.appa.es/09documentos/documentos01.htm*

El rendimiento del proceso de fermentación se ve condicionado en gran medida por el grado de hidrólisis y por el acceso de las bacterias a los sustratos sobre los que actúan. Según un estudio realizado por García y Primo (1989), el grado de hidrólisis alcanzado en cada residuo lignocelulósico depende del contenido en lignina de éste. En general, la celulosa de los residuos con contenido en lignina inferior al 10% respecto a materia seca inicial, se hidroliza bien (más del 80%); por ejemplo es el caso de los zuros de maíz y de los tallos de sorgo dulce.

Los materiales cuyo contenido en lignina es más elevado tienen unos rendimientos de hidrólisis más bajos; como por ejemplo la paja de arroz y los sarmientos de vid con más del 20% de lignina con respecto a la materia seca inicial.

En muchos casos, las características estructurales de los residuos dificultan el acceso de las hidrolasas a las cadenas de celulosa y hemicelulosa, disminuyendo en gran medida el rendimiento del proceso.

Actualmente se están investigando diversos pretratamientos para el procesado de biomasa lignocelulósica, que complementan la hidrólisis enzimática y posibilitan la obtención de altos rendimientos de esta etapa. Se hace necesario, principalmente, porque la lignina en las paredes celulares de la planta forma unas barreras contra el ataque enzimático. Un pretratamiento ideal es reducir el contenido de lignina, disminuir la cristalinidad de la celulosa e incrementar el área superficial. Entre los tratamientos que se pueden aplicar podemos distinguir: tratamientos físicos (molienda, ultrasonidos, etc.), físico-químicos (termo hidrólisis), químicos (hidrólisis ácida, oxidación húmeda, tratamientos con ozono, hidrólisis con álcalis, etc.), tratamiento con microondas, etc. (Krishna *et al.*, 2001). Los objetivos de dichos tratamientos son:

- Degradar la estructura lignocelulósica haciéndola más accesible a los enzimas.
- Modificar la estructura (incrementar la porosidad o exponer más área del residuo a la acción enzimática).

Según estudios publicados por Arantes y Saddler (2011), una de las características que va a determinar el buen rendimiento de la hidrólisis enzimática, es la accesibilidad de los enzimas al sustrato. Al aumentar la accesibilidad de los enzimas al residuo triturado se favorece la entrada de enzimas a éste. Esta accesibilidad está íntimamente relacionada con factores tales como área superficial disponible (porosidad, topología, tamaño de partícula, volumen de poro, grado de polimerización, etc.), la velocidad y el tiempo de la reacción de hidrólisis enzimática. En particular, en el tratamiento de termo hidrólisis, se consigue evaporar una gran cantidad de agua desde el interior, con el fin de expandir la estructura y por tanto aumentar el tamaño de los poros.

Unas de las desventajas más importantes a las que nos enfrentamos a la hora de aplicar estos tratamientos son: su elevado coste, sus bajos rendimientos, la generación de productos secundarios no deseados por el efecto de la temperatura, etc. Por ejemplo, en el caso de la trituración mecánica (molienda), una desventaja evidente es que se trata de una operación que requiere un alto consumo energético, a pesar de que sea ideal tanto para el metano y la producción de etanol. Por el contrario, una de las ventajas cruciales de esta técnica es que al reducir el tamaño de las partículas se consigue un aumento de la superficie específica y una reducción del grado de polimerización, éste es un factor que incrementa los rendimientos de la hidrólisis entre un 5-25% (Delgenés *et al.*, 2003). En el pretratamiento químico de la hidrólisis ácida se encuentra su mayor ventaja en sus altos rendimientos de hidrólisis (superiores al 90%) en ácidos concentrados y en ácidos diluidos del 80-100%. Por el contrario, su desventaja más importante es el efecto corrosivo de los ácidos concentrados que conllevan a altas inversiones en los equipamientos (Krishna *et al.*, 2001).

La aplicación de tecnologías que favorecieran el proceso de hidrólisis permitiría mejorar la producción de energía.

En este sentido, la técnica de impregnación a vacío podría ser utilizada para incluir las enzimas hidrolíticas en el interior de la estructura de subproductos porosos, facilitando el acceso de las enzimas al sustrato sobre el que actúan.

La impregnación a vacío (IV) se considera como una técnica útil para introducir rápidamente líquidos externos en las estructuras porosas de tejidos animales y vegetales, de manera controlada. Es un método en el procesado de alimentos que permite que una disolución de impregnación reemplace una parte del aire contenido inicialmente en la estructura porosa de los alimentos, como resultado de la creación de gradientes de presión en el sistema constituido por el alimento sumergido en la disolución de impregnación (Guillemin *et al.*, 2008). Esta técnica se basa en las transferencias de masas promovidas por los cambios de presión entre una fase líquida y una estructura sólida porosa, como puede ser una fruta o verdura (Castagnini *et al.*, 2015).

La impregnación a vacío es una operación unitaria en la que productos porosos se sumergen en disoluciones de diferentes composiciones y/o concentraciones y se someten a un gradiente de presión de dos etapas: en primer lugar, el material poroso se sumerge en una disolución y es expuesto a presión subatmosférica durante un tiempo determinado para asegurar la eliminación del aire atrapado en los poros por expansión de éste. En segundo lugar, se procede a restablecer la presión atmosférica, de esta forma la disolución externa penetra en la estructura de los poros del material poroso, comprimiendo el gas residual hasta que se alcanza el equilibrio de presión (etapa de impregnación) (Fito 1994; Fito *et al.*, 1996).

La impregnación a vacío es una técnica usada principalmente para acelerar procesos industriales. El primer modelo matemático para el proceso de impregnación a vacío en materiales porosos, más específicamente en alimentos porosos, fue propuesto por Fito y sus colaboradores (Fito, 1994; Fito y Pastor, 1994; Fito *et al.*, 1996). El modelo fue llamado mecanismo hidrodinámico (HDM), el cual está afectado por la deformación y relajación de la matriz de los alimentos debido a los cambios de presión (Badillo *et al.*, 2011; Guillemin *et al.*, 2006).

El resultado de la impregnación está influenciado por las propiedades mecánicas, la porosidad, el tamaño y la forma del alimento. También, por la viscosidad de la disolución de impregnación o solución externa, las propiedades físicas y químicas de los compuestos fisiológicamente activos, las presiones y los tiempos de vacío (www.alimentarnos.com).

Por lo anteriormente expuesto, en el presente trabajo se pretende estudiar la viabilidad de la técnica de impregnación a vacío para la mejora de la etapa de hidrólisis enzimática, con el fin de mejorar el aprovechamiento de algunos de los residuos generados en la industria alimentaria.

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO.

El objetivo general del presente Trabajo Final de Grado consiste en evaluar la influencia de la técnica de impregnación a vacío en la hidrólisis enzimática de diferentes residuos agroalimentarios.

Para la consecución del objetivo planteado se estableció el siguiente plan de trabajo:

1. Realizar una revisión bibliográfica sobre la producción de residuos en las industrias agroalimentarias y el aprovechamiento de éstos para la producción de bioetanol.
2. Caracterización fisicoquímica de los diferentes residuos. Se determinará densidad aparente (ρ_{ap}), actividad del agua (a_w), humedad (x_w), sólidos solubles totales (SST) y capacidad de impregnación (IV).
3. Tratamiento de impregnación a vacío de los diferentes residuos con disoluciones de impregnación que incluyan las enzimas celulasa y hemicelulasa.
4. Valoración cuantitativa de la hidrólisis enzimática en los residuos impregnados y sin impregnar.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.A. GENERACIÓN DE RESIDUOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

Con el fin de conocer los datos actuales de generación de residuos en la industria agroalimentaria se realizó una búsqueda bibliográfica basada fundamentalmente en bases de datos de producción e industrialización de frutas y hortalizas. Las bases de datos consultadas se listan a continuación:

- www.magrama.gob.es: Página web del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente de España. En ella se muestran valores de superficie, rendimientos, precio medio, producción agrícola y valor de producción.
- www.mercasa.es: Sociedad Estatal de Participaciones Industriales. Se trata de una entidad pública empresarial española donde se obtienen valores de producción de las principales frutas cítricas.
- www.fen.org.es: Fundación española de la nutrición. Muestra la estacionalidad, valoración nutricional y composición nutricional de los diferentes productos.
- www.infoagro.com: Información técnica agrícola, destino de producción agrícola e información general de los principales productos que se producen en las industrias agroalimentarias.

3.A.1. Criterios de búsqueda.

Para realizar la búsqueda bibliográfica se han utilizado como palabras clave: residuos industrias agroalimentarias, residuos agrícolas, subproductos industrias agroalimentarias. En todos los casos, se consultó la información del último año disponible (2010-2012), para cada base de datos.

3.B. ESTUDIO DE LA IMPREGNACIÓN A VACÍO COMO POSIBILIDAD DE MEJORA DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE RESIDUOS INDUSTRIALES DE FRUTAS Y HORTALIZAS.

Previo al diseño experimental, se realizó la revisión bibliográfica inherente a cualquier trabajo de investigación. En este caso, la búsqueda bibliográfica se centró en los siguientes aspectos:

- Hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos para la obtención de bioetanol. Limitaciones de la operación, pretratamientos para mejorar la eficiencia de la conversión de carbohidratos complejos a azúcares fermentables.
- La operación de impregnación a vacío. Aplicaciones de la operación y antecedentes de impregnación a vacío de enzimas en tejidos de frutas u hortalizas.

3.B.1. Material vegetal empleado.

De entre los productos agrícolas que se consideraron interesantes por su nivel de producción y/o generación de residuos durante su industrialización, se escogieron aquellos cuatro que presentaron valores de porcentaje de residuo total más elevados, teniendo en

cuenta su disponibilidad durante el periodo de ejecución del trabajo y sus características de porosidad: naranjas, plátanos, alcachofas y habas.

Todas las materias primas utilizadas en el presente trabajo, fueron adquiridas en un supermercado local. El material vegetal se seleccionó visualmente de acuerdo a su tamaño, color, peso, aspecto y grado de madurez, con el fin de trabajar con una muestra lo suficientemente homogénea.

3.B.2. Obtención del residuo sólido.

En el presente trabajo, la muestra de estudio consistió en las partes no comestibles de cada uno de los productos seleccionados, conocida también como bagazo. Para la obtención de dicha muestra, se lavaron las diferentes frutas, se eliminó todo aquello que era comestible y las partes restantes se sometieron a un troceado y posterior triturado a máxima velocidad con una batidora Philips AvanceCollection, hasta obtener una muestra homogénea. Además, para el caso particular de la caracterización con respecto a la operación de impregnación a vacío, se obtuvo el residuo troceado para cada una de las frutas/hortalizas seleccionadas, según se indica más adelante.

3.B.3. Caracterización fisicoquímica del residuo.

La caracterización fisicoquímica consistió en el análisis de la densidad aparente (ρ_{ap}), actividad del agua (a_w), humedad (x_w) y sólidos solubles totales (SST). Las determinaciones analíticas que se listan a continuación se realizaron sobre muestra troceada y/o triturada, según se indique en cada caso. Todas las determinaciones se efectuaron, como mínimo, por triplicado.

3.B.3.1. Densidad aparente (ρ_{ap}).

La densidad aparente se determinó utilizando un picnómetro y agua como líquido de referencia, a partir de la relación entre la masa de la muestra y el volumen de agua desplazado por la misma. Para ello se efectuaron las siguientes medidas, utilizando muestra troceada.

- $M_{(\text{picnómetro})}$ = masa del picnómetro vacío y con su tapón (g)
- $M_{(\text{picnómetro+agua})}$ = masa del picnómetro lleno de agua (g)
- $M_{(\text{picnómetro+muestra})}$ (g)
- $M_{(\text{picnómetro+muestra+agua})}$ (g)

La densidad aparente (ρ) en g/cm^3 , se calculó a partir de la siguiente ecuación (**Ecuación 1**).

$$\rho = \frac{M_{\text{picnómetro+muestra}} - M_{\text{picnómetro}}}{\left(M_{\text{picnómetro+muestra}} - M_{\text{picnómetro}} - (M_{\text{picnómetro+muestra+agua}} - M_{\text{picnómetro+agua}}) \right)} \quad (\text{Ec. 1})$$

3.B.3.2. Actividad del agua (a_w).

La actividad del agua (a_w) de la materia prima triturada y troceada se determinó con un higrómetro de punto de rocío (Aqualab 4TE) con una precisión de $\pm 0,003$, previamente calibrado con disoluciones saturadas de referencia.

3.B.3.3. Humedad (x_w).

Se determinó el contenido en agua (x_w) de los diferentes residuos mediante el método gravimétrico de doble pesada 934.06 (AOAC, 2000). La humedad de la muestra se obtuvo a partir de la **ecuación 2**. Las muestras se secaron en estufa (J.P. Selecta) a 63 °C hasta peso constante. Las pesadas se realizaron con una balanza analítica (Metler Toledo modelo MS304S).

$$x_w(\%) = \frac{M_{0+mh} - M_{0+ms}}{M_{0+mh} - M_0} \quad (\text{Ec. 2})$$

Dónde:

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.

3.B.3.4. Sólidos solubles totales (SST).

Se midieron los sólidos solubles totales (SST) de cada uno de los residuos por refractometría, mediante la determinación de los grados Brix. Para ello, se utilizó un refractómetro de mesa modelo ABBE ATAGO, 3-T termostatado a 21 °C. La medición de los grados Brix de cada residuo se realizó añadiendo entre 8-10 mL de agua a la muestra.

3.B.3.5. Mecanismo hidrodinámico (HDM). Parámetros de impregnación a vacío (IV).

El equipo para el estudio de la capacidad de impregnación consta de una cámara de vacío, conectada a una bomba (Sterling SIHI), y una balanza de precisión con sensibilidad de 0,01 g (Mettler PJ 3600 Delta Range) que permite registrar el peso de la muestra a lo largo del proceso de impregnación.

Para estudiar la respuesta de los diferentes residuos al mecanismo hidrodinámico, cada uno de los cuatro residuos seleccionados fue pesado y sumergido en un recipiente conteniendo la disolución, dentro de la cámara de impregnación. El proceso de impregnación a vacío consistió en someter el sistema a una presión de vacío de 50 mbar durante 10 minutos, y restablecer la presión atmosférica una vez transcurrido ese tiempo, manteniéndose las muestras sumergidas en la disolución de impregnación durante 10 minutos más.

Diferentes pesadas de cada una de las muestras a lo largo del proceso de impregnación, permiten determinar los parámetros de impregnación: fracción volumétrica de líquido incorporado al final del proceso por unidad de volumen de muestra [X] (m^3 de líquido incorporado/ m^3 de muestra), fracción volumétrica de líquido incorporado al final de la etapa

de vacío [X_1] y la porosidad efectiva [ε]. Dichos parámetros se obtuvieron utilizando diferentes disoluciones de impregnación con el fin de averiguar si la presencia de los enzimas en el medio producía alguna diferencia en la respuesta al mecanismo hidrodinámico (HDM), principal mecanismo responsable del flujo de masa durante el proceso de impregnación. De este modo, los líquidos de impregnación empleados fueron disoluciones isotónicas de manitol, y disoluciones isotónicas de manitol a las que se les adicionaron los enzimas (celulasa y hemicelulasa) en la concentración indicada en el apartado 3.B.4. Con respecto a la isotonicidad, se tuvieron en cuenta los resultados de a_w obtenidos para los residuos troceados, y se calculó la cantidad de manitol correspondiente mediante la ecuación de Norrish (**Ecuación 3**). Dicha cantidad, se añadió tanto a la disolución isotónica de manitol como a la disolución de manitol y enzimas, puesto que se comprobó que la cantidad de enzima incorporada no afecta a la actividad del agua.

$$a_w = (1 - x_s) * e^{(-K*x_s^2)} \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde:

a_w : actividad del agua de la muestra triturada.

x_s : fracción molar de soluto

K : constante de Norrish siendo $K=0,906$ para el manitol.

Los parámetros de impregnación que se citan en el párrafo anterior se determinaron para las muestras troceadas, mientras que para los residuos triturados únicamente se pudo determinar el porcentaje de ganancia de disolución de impregnación. Dicho porcentaje de ganancia se obtuvo por doble pesada, antes y después de la IV, utilizando una balanza (Mettler PJ 3600 Delta Range).

3.B.4. Diseño experimental: Descripción de los ensayos de IV e hidrólisis enzimática de los residuos.

Para comprobar si la IV tiene un efecto positivo sobre la hidrólisis enzimática se realizaron una serie de ensayos utilizando la IV como pretratamiento, utilizando en este caso los residuos triturados, ya que esta forma es la que permite que se sometan a la etapa de sacarificación posterior. Puesto que es habitual aplicar dicha operación utilizando un medio isotónico con el fin de discriminar el efecto exclusivo del mecanismo hidrodinámico, se prepararon disoluciones acuosas de manitol o fructosa isotónicas con el residuo utilizado. Además, la IV también se realizó con disoluciones acuosas de los enzimas, lo que resultó en disoluciones hipotónicas con respecto a la a_w de los residuos. Para el cálculo de la cantidad de manitol y fructosa necesarios para obtener las disoluciones isotónicas correspondientes, se hizo uso de la ecuación de Norrish (**Ecuación 3**), teniendo en cuenta los valores de a_w obtenidos para las muestras trituradas, y las constantes de Norrish $K=0,906$ para el manitol y $K=2,25$ para la fructosa.

Teniendo en cuenta lo anterior, la composición de las disoluciones de impregnación resultantes se muestran en la **tabla 1**. La cantidad de disolución de impregnación utilizada en cada caso fue diferente, puesto que se tuvo en cuenta el volumen de líquido necesario para cubrir cada residuo.

Tabla 1. Composición de las disoluciones de impregnación utilizadas para la determinación de la capacidad de impregnación.

COMPOSICIÓN DE LA DISOLUCIÓN DE IMPREGNACIÓN				
TIPO DE DISOLUCIÓN	Residuo de naranja	Residuo de plátano	Residuo de haba	Residuo de alcachofa
Hipotónica	62,72 g agua 0,16 g celulasa 0,04 g hemicelulasa	46,25 g agua 0,16 g celulasa 0,04 g hemicelulasa	46,25 g agua 0,16 g celulasa 0,04 g hemicelulasa	130,34 g agua 0,16 g celulasa 0,04 g hemicelulasa
Isotónica manitol (con enzima)	62,72 g agua 12,29 g manitol (0,16 g celulasa 0,04 g hemicelulasa)	46,25 g agua 3,75 g manitol (0,16 g celulasa 0,04 g hemicelulasa)	46,25 g agua 2,28 g manitol (0,16 g celulasa 0,04 g hemicelulasa)	130,34 g agua 9,66 g manitol (0,16 g celulasa 0,04 g hemicelulasa)
Isotónica fructosa (con enzima)	62,76 g agua 12,23 g fructosa (0,16 g celulasa 0,04 g hemicelulasa)	46,28 g agua 3,71 g fructosa (0,16 g celulasa 0,04 g hemicelulasa)		130,31 g agua 9,67 g fructosa (0,16 g celulasa 0,04 g hemicelulasa)

Por lo que respecta a la etapa de hidrólisis enzimática, ésta se llevó a cabo mediante la adición de 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) a 40 g de residuo en un vaso de precipitados de vidrio, teniendo en cuenta los resultados de otros estudios realizados en el mismo laboratorio (Hurtado, 2013). Una vez añadidos los enzimas, las muestras se sometieron a IV según se ha indicado anteriormente, o bien fueron introducidas directamente en estufa (PSelecta modelo Incudigit) para llevar a cabo la etapa de hidrólisis enzimática. La sacarificación de los residuos se realizó a 50 °C durante 24 h (Hurtado, 2013). En los ensayos en los que no se aplicó la IV como pretratamiento, la hidrólisis enzimática se realizó utilizando las mismas disoluciones, es decir: hipotónica, isotónica con manitol e isotónica con fructosa (**tabla 1**).

De este modo, el diseño experimental queda como sigue (**tabla 2**). Se realizaron tres series experimentales de cada combinación y, sobre cada repetición, las determinaciones analíticas que se presentan a continuación (3.B.5) se realizaron por triplicado, tomándose el valor promedio de los tres replicados como resultado de la repetición correspondiente.

Tabla 2. Diseño experimental de la hidrólisis enzimática con y sin IV previa.

TIPO DE DISOLUCIÓN		Hidrólisis enzimática
SIN IV	Hipotónica	
	Isotónica manitol	
	Isotónica fructosa	
CON IV	Hipotónica	
	Isotónica manitol	
	Isotónica fructosa	

3.B.5. Determinaciones analíticas sobre las muestras sacarificadas.

3.B.5.1. Sólidos solubles totales (SST).

Se midieron los sólidos solubles totales (SST) de cada uno de los residuos por refractometría, mediante la determinación de los grados Brix, antes y después de la operación de hidrólisis enzimática. Para ello, se utilizó un refractómetro de mesa modelo ABBE ATAGO, 3-T termostatado a 21 °C. La medición de los °Brix se realizó sobre la fase líquida extraída de cada muestra, utilizando una prensa manual antes de la hidrólisis enzimática, y homogeneizando y extrayendo fase líquida con una pipeta Pasteur tras incubación en estufa.

3.B.5.2. Perfil de azúcares.

La identificación y cuantificación de los azúcares se realizó mediante cromatografía líquida de intercambio iónico de alta resolución con detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD, por sus siglas en inglés), utilizando un cromatógrafo modelo 716 Compact IC (Metrohm) con columna MetrospCarb 1 250/4.6 (250mmL x 4,6mmLD) equipada con una precolumna. Se utilizaron los siguientes potenciales de pulso del detector: t_1 : 400/E₁=+0,05 (detección); t_2 : 200/E₂=+0,75 (limpieza); t_3 : 400/E₃=-0,15 (regeneración). Los análisis se realizaron a 32 °C y 8,8 MPa, con un volumen de inyección de 20 µl y utilizando como fase móvil una disolución de NaOH 0,1 M (1 mL/min). Los patrones utilizados (Sigma-Aldrich, Co.) para la cuantificación del contenido en azúcares del residuo fueron glucosa (pureza ≥ 99,5 %), fructosa (pureza ≥ 99 %) y sacarosa (pureza ≥ 99,5 %), preparados en diluciones de 2,5; 5; 10; 15; 25 y 50 ppm. Para la interpretación de los resultados se utilizó el software ICnet 2.0 y la lectura de los cromatogramas se realizó mediante el programa IC NET 2.3 (Metrohm).

3.B.6. Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo empleando el programa StatgraphicsCenturion XVI.II (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, Va, USA). Para evaluar las diferencias existentes entre las muestras, se efectuaron análisis de la varianza (ANOVA) de carácter simple y multifactorial con un nivel máximo de interacción de orden dos. Para ambos análisis se consideró un nivel de confianza del 95%.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.A . RESULTADOS SOBRE LOS RESIDUOS QUE SE GENERAN EN LAS INDUSTRIAS AGROALIMENTARIAS.

En la **tabla 3** se muestran en orden decreciente con respecto a la producción total, los principales residuos que se generan en las industrias agroalimentarias. Estos son: naranja, mandarina, pimiento morrón, tomate, melocotón, plátano, haba, espárrago y alcachofa.

Tabla 3. Principales residuos que se producen en las industrias agroalimentarias. Valores de porcentaje de residuos, producción total (T) y producción de residuos total (T).

Fruta / Hortaliza	Tipo de residuo que genera	% Residuos	Producción total (T)	Producción de residuos total (T)
Naranja	Cortezas, hollejos, vesícula, semillas, pulpa	63%	5.700.000	3.591.000
Mandarina	Cortezas, hollejos, vesícula, semillas, pulpa	43%	5.700.000	2.451.000
Pimiento morrón	Corazones, restos de piel, semillas	63%	1.024.000	645.120,0
Tomate	Pieles, pepitas, podrido	15%	4.007.000	601.050,0
Melocotón	Pieles, huesos	25%	1.034.974	258.744
Plátano	Pseudo tallo, raquis y pieles	35%	371.013	129.854,55
Haba	Vaina	47%	187.047	87.912,09
Espárrago	Pieles	51%	53.999	27.539,5
Alcachofa	Pencas/brácteas externas, hojas	65%	178.450	20.475

Conociendo los datos de porcentaje de residuo y la producción de cada uno de los productos (T), se ha calculado el valor de producción de residuos total (T).

De estos 10 productos (**tabla 3**), se seleccionaron los 4 en los que se centra este trabajo. Para realizar la selección se tuvieron en cuenta los valores de producción de residuo total (T), la disponibilidad de los residuos durante el periodo de ejecución del trabajo (temporalidad) y sus características de porosidad, puesto que se trata de una de las propiedades principales para el estudio de la impregnación a vacío que es la base de este trabajo.

Así pues, el estudio se centró en cuatro productos: naranja, plátano, alcachofa y haba. No obstante, durante la realización del trabajo el haba dejó de estar disponible, por lo que no se pudieron obtener algunos resultados para este residuo en particular.

4.A.1. Composición del residuo e interés de sus aplicaciones. Posibilidad de hidrólisis enzimática.

De cada uno de los 4 productos se seleccionó la parte objeto de estudio (bagazo). Los residuos están formados fundamentalmente por componentes lignocelulósicos, los cuales pese a su dificultosa degradación, es posible mediante procesos químicos, físicos y/o biológicos desdoblarlos en azúcares monosacáridos para su posterior fermentación.

Los componentes lignocelulósicos que forman parte de los residuos vegetales, en general, están compuestos por tres tipos diferentes de polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina (Fengel y Wegener, 1984), envueltos en una compleja estructura.

- Celulosa: conformada por subunidades de D-glucosa, unidas por β -1,4 glicosídicos. Su hidrólisis libera unidades de glucosa, monosacárido de gran importancia en la fermentación. La celulosa posee dos estructuras, una cristalina (organizada) y otra amorfa. Las cadenas de celulosa son “empaquetadas” formando estructuras que se denominan fibrillas de celulosa. Estas fibrillas de celulosa son en su mayoría independientes y débilmente vinculados a través de uniones de hidrógeno (Laureano-Pérez *et al.*, 2005).
- Hemicelulosa: carbohidrato complejo y heterogéneo ya que su estructura posee diferentes polímeros como pentosas (como xilosa y arabinosa), hexosas (como manosa, glucosa y galactosa), entrelazadas entre si glucosídicamente. Muchas de ellas, en la degradación hidrolítica, dan, junto a glucosa, manosa y galactosa (Palacio, 1956). La hemicelulosa sirve de conexión entre la lignina y las fibras de celulosa y da la rigidez a la red de celulosa, hemicelulosa y lignina (Laureano-Pérez *et al.*, 2005).
- Lignina: heteropolímero amorfo que consta de tres diferentes unidades de fenilpropano (p-coumaril, coniferil y sinapil alcohol) que se mantienen unidos por diferentes enlaces. El heteropolímero amorfo no es soluble en agua y su degradación es muy complicada (Fengel y Wegener, 1984).

En la **figura 2** podemos ver una representación de la estructura de la biomasa lignocelulósica.

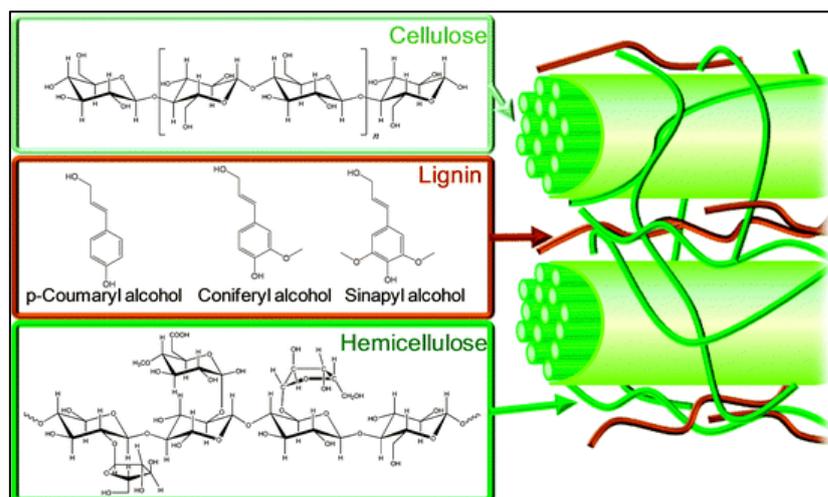


Figura 2. Estructura de la biomasa lignocelulósica (Martín-Alonso *et al.*, 2012).

En la actualidad, la biomasa lignocelulósica y en especial los subproductos agroindustriales, han dejado de ser productos de desecho-problema, para convertirse en materia prima potencial para diversos procesos tanto de tipo agrícola como industrial, siendo la producción de alcohol carburante uno de los más importantes (Sánchez *et al.*, 2010).

La generación de alternativas energéticas distintas a las ya convencionales ha conllevado al uso de materias primas naturales, dando lugar a los llamados biocombustibles dentro de los cuales destaca el bioetanol (Sánchez *et al.*, 2010).

El bioetanol es un alcohol producido a partir de la fermentación de los azúcares que se encuentran en los vegetales y se trata de un combustible con un alto poder energético.

En el caso de la cáscara de naranja, una de las principales aplicaciones de interés es la mencionada anteriormente, es decir, la obtención de bioetanol a partir del residuo del bagazo de naranja. Otros estudios han evaluado la viabilidad de desarrollar un producto con características funcionales a partir de cortezas de naranja, por incorporación de vitamina D y E, utilizando la ingeniería de matrices a través de la técnica de impregnación a vacío (Restrepo *et al.*, 2011).

Por otra parte, en el caso del residuo del plátano, además de la obtención de bioetanol a partir del bagazo de éste, tiene otras aplicaciones de interés como son la producción de lacasa utilizando *Pleurotusostreatus* sobre cáscaras de plátano (Manjarrés *et al.*, 2010) y la elaboración de papel y cartón.

También es necesario resaltar la utilización de subproductos en la alimentación animal (Cerisuelo y Piquer, 2009).

4.A.2. Posibilidad de aplicación de la impregnación a vacío para mejorar la hidrólisis enzimática de biomasa residual.

Una posibilidad de mejorar la hidrólisis enzimática de la biomasa residual es asegurar una distribución homogénea del enzima en el residuo y en consecuencia, un mayor acceso al sustrato sobre el que actúa. Realmente, el factor que limita el hecho de conseguir un buen rendimiento de la hidrólisis enzimática, es la accesibilidad de los enzimas a las cadenas de celulosa y esto está íntimamente relacionado con la estructura física del sustrato. Por lo tanto, la naturaleza de la materia prima juega un papel importante en la determinación de la cantidad de proteína necesaria para conseguir un buen rendimiento de la hidrólisis (Arantes y Saddler, 2011).

Así pues, para obtener una hidrólisis eficaz y que se dé la accesibilidad enzima-sustrato hay que tener en cuenta factores tales como: área superficial disponible (porosidad, topología, tamaño de partícula, volumen de poro, grado de polimerización, etc.), la velocidad y el tiempo de la reacción de hidrólisis enzimática. Esto se explica teniendo en cuenta que la hidrólisis enzimática de la celulosa es un fenómeno dominado por la superficie y el contacto directo entre enzima-sustrato. Se ha comprobado, que el área de superficie interna de la celulosa es mucho más grande que el área superficial externa (Chang *et al.*, 1981). Por lo tanto, parece lógico pensar que la estructura porosa de celulosa tiene una influencia importante en la difusión de los enzimas en la red de celulosa (Arantes y Saddler, 2011).

Al estudiar el factor velocidad-tiempo se podría decir que si se deja hidrolizando el residuo un tiempo ilimitado se consigue hidrolizar un 80% aproximadamente, es decir, se requieren tiempos de hidrólisis largos para lograr una conversión casi completa de la celulosa. Pero dado que la rapidez a nivel industrial es un factor importante, si se mejorase la accesibilidad del enzima al residuo, se conseguiría un mejor tiempo de hidrólisis. Se ha demostrado que existe una correlación lineal entre la velocidad de hidrólisis y el tamaño de poro y que tiempos largos de hidrólisis añaden unos costes significativos a esta etapa y por consiguiente, a la conversión a bioetanol (Arantes y Saddler, 2011).

Por lo tanto, tanto la topología como la porosidad determinan la celulosa disponible, lo cual es un factor importante que puede desempeñar un papel clave en la limitación de la cantidad de proteína que puede penetrar en los poros de la celulosa. Si se modifica la estructura física del residuo quedando más expuesta a la unión enzima-sustrato, se podría mejorar la hidrólisis. Si se da el caso de que haya una parte expuesta, pero los enzimas no puedan acceder al sustrato, la aplicación de la técnica de impregnación a vacío permitiría incorporar los enzimas mediante un gradiente de presiones (Arantes y Saddler, 2011). Así pues, se cree que la IV podría conseguir mejorar la accesibilidad enzima-sustrato, puesto que permitiría introducir en los canales porosos un medio líquido que contuviese el enzima en una concentración adecuada.

La tecnología de impregnación a vacío podría utilizarse para incorporar enzimas en matrices de alimentos sólidos porosos que contienen aire ocluido, tales como tejidos de frutas y hortalizas (Guillemin *et al.*, 2006). La impregnación a vacío ha sido utilizada en múltiples aplicaciones alimentarias: para sazonar o marinar carnes y pescados, utilización de residuos de la industria de jugos de naranja como fuente de fibra dietética en la elaboración de alimentos, la obtención de un snack con efecto probiótico a partir de manzana por impregnación a vacío, etc. Sin embargo, su utilización para la incorporación de enzimas que faciliten procesos químicos es todavía muy reducida. En este sentido, se han realizado estudios para mejorar la textura de cubos de manzana mediante la incorporación del enzima pectinmetilesterasa a la matriz celular con una disolución de calcio, o bien con una disolución de cloruro de sodio y/o alginato de sodio (Guillemin *et al.*, 2006; Guillemin *et al.*, 2008; Carciofi *et al.*, 2012).

El enzima pectinmetilesterasa cataliza la hidrólisis de los grupos metilo esterificados de la pectina, un constituyente principal de las paredes celulares de la planta. Su acción libera ácido carboxílico que podría reaccionar con el calcio. Esta quelación de calcio por las funciones de ácido carboxílico libres de moléculas de pectina, permitiría reforzar la estructura de la pared celular aumentando así la firmeza de las frutas. En los estudios citados, se comprobó que la operación de IV mejoraba la penetración del enzima en los cubos de manzana. En particular, la penetración exógena de pectinmetilesterasa en los cubos de manzana después de 15 min o 1 h de remojo se limita a la zona superficial, mientras que pectinmetilesterasa penetra hasta la zona núcleo de los cubos de manzana después de la impregnación a vacío.

4.B. ESTUDIO DE LA IMPREGNACIÓN A VACÍO COMO POSIBILIDAD DE MEJORA DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE RESIDUOS INDUSTRIALES DE FRUTAS Y HORTALIZAS.

4.B.1. Caracterización fisicoquímica de los residuos.

En la **tabla 4** se presentan los resultados obtenidos de la caracterización fisicoquímica correspondientes a la densidad aparente (ρ_{ap}), actividad del agua (a_w), humedad (x_w) y sólidos solubles totales (SST) de los diferentes residuos. En dicha tabla se observa como el plátano es el residuo con mayor densidad aparente, seguido de la naranja y de alcachofa que presentan valores muy similares, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos. En lo referente a la actividad del agua, destacar en primer lugar que los valores obtenidos para los residuos troceados y triturados son estadísticamente diferentes, lo cual evidencia que el cambio provocado en la estructura debido al triturado supone una diferencia en la disponibilidad del agua presente en cada matriz. En el caso del residuo troceado el mayor valor corresponde a los residuos de haba y plátano, seguidos de los residuos de alcachofa y de naranja. Sin embargo, en el caso del residuo triturado, la alcachofa se encontraría en primer lugar, seguido del residuo de plátano, haba y, por último, el bagazo de naranja.

Los valores obtenidos en el presente estudio con respecto a la a_w , los °Brix y la humedad del bagazo de naranja resultan ligeramente similares a los obtenidos por otros autores (Restrepo *et al.*, 2012). No se dispone de valores bibliográficos de a_w y °Brix del resto de residuos con los que comparar los datos obtenidos en este trabajo.

Con respecto a la humedad, la corteza de alcachofa y la cáscara de plátano fueron los residuos que obtuvieron mayor valor sin diferencias significativas entre ellos, siendo el valor de la alcachofa muy similar al fijado por otros autores (Machado *et al.*, 2015). Por el contrario, la naranja resultó ser el residuo de menor humedad. Por último, el plátano fue el residuo que mayor contenido presentó en sólidos solubles (SST).

Tabla 4. Caracterización fisicoquímica de los diferentes residuos. Media \pm desviación estándar de tres repeticiones. ^{a,b,c...} Letras diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95%.

	ρ_{ap} (g/cm ³)	a_w troceado	a_w triturado	x_w	SST (°Brix)
Naranja	0,72 \pm 0,04 ^a	0,976 \pm 0,002 ^a	0,9802 \pm 0,0004 ^a	0,76 \pm 0,02 ^a	4,15 \pm 0,13 ^b
Plátano	0,96 \pm 0,03 ^b	0,9877 \pm 0,0006 ^c	0,9918 \pm 0,0003 ^{b,c}	0,82 \pm 0,03 ^b	5,59 \pm 0,11 ^c
Alcachofa	0,76 \pm 0,03 ^a	0,984 \pm 0,001 ^b	0,9925 \pm 0,0006 ^c	0,83 \pm 0,02 ^b	3,8 \pm 0,2 ^a
Haba	-	0,9897 \pm 0,0005 ^c	0,9917 \pm 0,0004 ^b	-	-

4.B.2. Mecanismo hidrodinámico (HDM) y capacidad de impregnación.

En lo referente a la respuesta al mecanismo hidrodinámico (HDM) de los diferentes residuos troceados, los parámetros resultado del análisis son: fracción volumétrica de líquido incorporado al final del proceso por unidad de volumen de muestra [X] (m³ de líquido incorporado/m³ de muestra), fracción volumétrica de líquido incorporado al final de la etapa de vacío [X₁] y porosidad efectiva [ε] (Martínez *et al.*, 1998), los valores de los cuales se detallan a continuación (**tabla 5**).

Tal y como se ve en la tabla, los parámetros de impregnación quedan más determinados por el tipo de residuo (p -valor $\leq 0,05$) que por el hecho de incorporar enzimas al líquido de impregnación. Únicamente se encuentran diferencias estadísticamente significativas en determinados casos, como son la corteza de naranja con respecto al parámetro X y la alcachofa con respecto a la porosidad.

Se tendrá en cuenta, que valores positivos de X o X_1 reflejan una entrada de líquido a los residuos, mientras que valores negativos indicarán una salida de líquido nativo. Así pues, en la **tabla 5** queda reflejado que en todos los casos se obtienen valores positivos para el parámetro X, lo que indica una entrada de líquido de impregnación en la estructura porosa del residuo considerado. Este parámetro es el de mayor interés a la hora de evaluar la posibilidad de incluir enzimas hidrolíticos al interior de la estructura de los residuos. Por otro lado, para el parámetro X_1 , solamente se produce una entrada de líquido en el caso de la naranja, mientras que para el resto de residuos (plátano, alcachofa, haba) se produce una salida de líquido nativo. Dado que para todos los residuos los valores de X_1 están muy próximos a cero, esto refleja que no ha habido prácticamente intercambio de masa en la primera etapa de la operación, únicamente ha habido salida de gas.

En conclusión, el residuo de naranja es el que mayor capacidad de impregnación presenta. Además es el único residuo en el que la presencia de la enzima provoca diferencias significativas en el valor de X. Este hecho únicamente puede explicarse asumiendo que las características de los polisacáridos presentes en este residuo permiten a las enzimas actuar durante el proceso de impregnación modificando las características estructurales del tejido y en consecuencia del líquido introducido durante la impregnación del mismo. Para todos los demás residuos la presencia de la enzima no modifica la capacidad de impregnación obteniéndose valores en torno al 20%.

El valor de porosidad (ϵ) refleja la fracción volumétrica de poros que han sido utilizados en el proceso para incluir líquido en su interior, obteniéndose resultados coherentes con los valores de X.

Tabla 5. Resultados de los parámetros correspondientes al mecanismo hidrodinámico para los residuos troceados. Media \pm desviación estándar de tres repeticiones. ^{a,b,c...} Letras diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95%.

Tipo de residuo	*Disolución de impregnación	X	X_1	ϵ
Naranja	Manitol	$0,5481 \pm 0,0014^c$	$0,0011 \pm 0,0006^c$	$0,468 \pm 0,019^b$
	Manitol + enzimas	$0,36 \pm 0,02^b$	$0,0008 \pm 0,0006^c$	$0,27 \pm 0,06^{a,b}$
Plátano	Manitol	$0,14 \pm 0,05^a$	$-0,013 \pm 0,006^{a,b,c}$	$0,37 \pm 0,13^b$
	Manitol + enzimas	$0,20 \pm 0,05^{a,b}$	$-0,010 \pm 0,002^{b,c}$	$0,35 \pm 0,17^b$
Alcachofa	Manitol	$0,14 \pm 0,05^a$	$-0,04 \pm 0,01^a$	$-0,3 \pm 0,6^a$
	Manitol + enzimas	$0,19 \pm 0,18^a$	$-0,04 \pm 0,03^a$	$0,30 \pm 0,03^b$
Haba	Manitol	$0,25 \pm 0,02^{a,b}$	$-0,032 \pm 0,005^{a,b}$	$0,3320 \pm 0,0011^b$
	Manitol + enzimas	$0,20 \pm 0,07^{a,b}$	$-0,027 \pm 0,008^{a,b,c}$	$0,44 \pm 0,17^b$

*En todos los casos las disoluciones se formularon de forma que fuesen isotónicas con el residuo que se impregnaba.

La valoración de los parámetros característicos de impregnación, requiere del registro del peso de la muestra del residuo en diferentes momentos del proceso de impregnación a vacío. Las características de las muestras del residuo triturado hacen imposible hacer este seguimiento, por lo que se calculó de forma aproximada la cantidad de líquido incorporado en el proceso a partir de la diferencia de peso entre el instante inicial y el instante final. Esta diferencia de peso, referida al peso inicial y expresada en porcentaje, la hemos denominado porcentaje de ganancia (%G), y los valores se muestran en la **figura 3**.

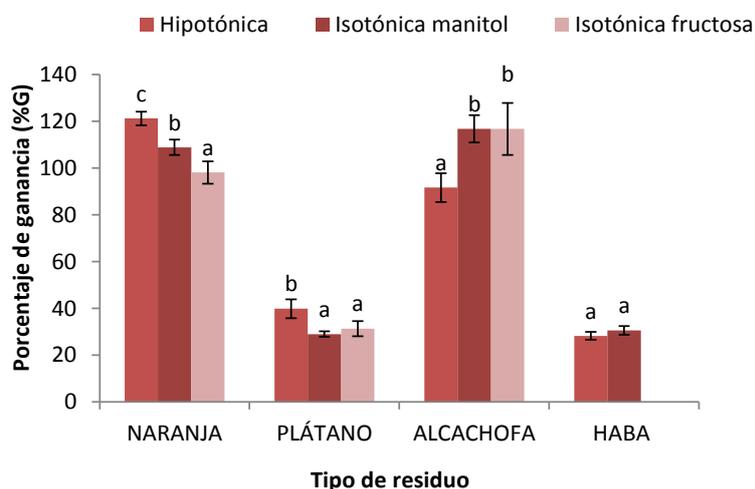


Figura 3. Porcentaje de ganancia (%G) de cada uno de los líquidos de impregnación, para los residuos triturados. ^{a,b,c...} Letras diferentes para un mismo producto indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95%.

Una de las principales características de la corteza de naranja es su elevada porosidad, tal y como se aprecia en la tabla anterior (**tabla 5**), donde se refleja que el residuo troceado de naranja presenta el mayor valor de porosidad. Esta es la razón por la que fue una de las frutas que presentó una mayor ganancia de disolución durante el pulso de vacío (**figura 3**). El otro producto que consiguió un %G significativamente alto fue la alcachofa; no obstante, este resultado no concuerda con la respuesta a la IV del residuo de alcachofa troceado. Esto podría sugerir que el hecho de triturar este residuo mejorase sus características con respecto a la operación de IV, aumentando significativamente la porosidad por dejar expuestas áreas que hacen más accesibles los canales porosos del tejido.

Con respecto al efecto de la disolución de impregnación, se ha de tener en cuenta que la utilización de una disolución hipotónica pone en marcha la actuación de mecanismos osmóticos y en consecuencia la aparición de un flujo de agua desde la disolución de impregnación hacia el interior de las células de los residuos. Este flujo en combinación con la incorporación de líquido provocada por el mecanismo hidrodinámico después de la etapa de vacío, deberían provocar mayores valores de %G en todos los residuos. Sin embargo en el residuo de alcachofa se observa el efecto contrario, la heterogeneidad del tejido unida a las diferencias de triturado que esta puede provocar podrían explicar este hecho.

Para el caso de las dos disoluciones isotónicas utilizadas, únicamente se observan diferencias estadísticamente significativas para el caso de la naranja. Un efecto diferente de alguno de los solutos considerados, manitol o fructosa, sobre las características estructurales

del tejido de naranja podría explicar estas diferencias. Sin embargo, no se ha encontrado ningún estudio que explicara este efecto.

Con el fin de valorar de una manera más precisa la influencia de trocear o triturar el residuo por lo que respecta a la IV, el %G se calculó también para los residuos troceados, de modo que en la **figura 4**, se comparan los resultados obtenidos para los residuos troceados y triturados empleando una disolución isotónica de manitol. Se observa que al utilizar esta disolución, los resultados de impregnación no son tan buenos para el residuo troceado como para el triturado, lo que podría explicarse con el hecho de que el triturado dejaría expuesta una mayor área superficial a través de la cual el líquido de impregnación tendría mayor acceso a los canales porosos. Las diferencias son especialmente destacables para los casos del bagazo de naranja y alcachofa.

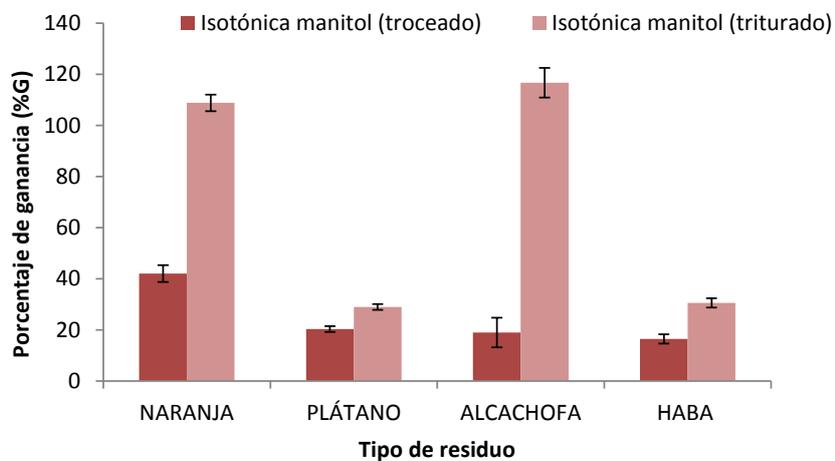


Figura 4. Porcentaje de ganancia (%G) de cada uno de los líquidos de impregnación, para los residuos troceados y triturados. Diferencias estadísticamente significativas (p -valor $<0,05$) para el factor troceado/triturado.

4.B.3. Caracterización del residuo hidrolizado enzimáticamente.

Se sometió a los residuos a una hidrólisis enzimática con diferentes disoluciones (hipotónica, isotónica con manitol e isotónica con fructosa) durante un tiempo de 24h a una temperatura de 50°C. Se midieron los grados Brix para cada uno de los residuos y disoluciones tanto antes del tratamiento enzimático como después del mismo.

A continuación en las **figuras 5, 6 y 7** se detallan los resultados de °Brix para todos los tratamientos y residuos.

Inicialmente, para el residuo de la naranja se obtuvieron los resultados correspondientes a las disoluciones hipotónica e isotónicas con manitol, puesto que se había decidido el uso de este soluto al no ser uno de los productos de hidrólisis y, en principio, no interferir en la actividad enzimática. No obstante, los resultados obtenidos para el residuo de la naranja, indicaron una influencia significativa de la presencia de manitol en la efectividad del tratamiento enzimático, lo que llevó a plantear la utilización de otro soluto, en este caso, la fructosa, para obtener la isotonicidad deseada. Por este motivo, los resultados correspondientes a la disolución isotónica con fructosa, para el caso exclusivo del residuo de naranja, se corresponden con un lote distinto al del resto de ensayos.

Al analizar el incremento de los grados Brix después de la hidrólisis enzimática del bagazo de naranja para cada una de las disoluciones de impregnación y tratamientos (**figura 5**), se observa que en principio la operación de impregnación a vacío no parece mejorar la hidrólisis enzimática sobre todo cuando la disolución es isotónica con manitol.

La hipótesis inicial planteada era que el usar un medio hipotónico, podría suponer un mayor contacto del enzima con el sustrato, debido a mayores roturas de la matriz, puesto que además del mecanismo hidrodinámico estaría actuando otra fuerza impulsora como es el gradiente de actividad del agua que en principio provocaría una entrada de agua al tejido y, como resultado, una mayor rotura celular. Sin embargo, solamente se observa una ligera mejoría en la hidrólisis enzimática por el hecho de usar una disolución hipotónica con impregnación a vacío. El incremento de SST obtenido en este caso (hipotónica IV/sin IV) es inferior al del resto (tanto isotónica con manitol como isotónica con fructosa).

Lo que sí se aprecia de forma clara, es una mejora significativa por el hecho de añadir manitol al medio. La explicación de esto podría deberse al hecho de que el manitol es un soluto que también se emplea para estabilizar enzimas en entornos acuosos (Iyer y Ananthanarayan, 2008). Se reporta que su efecto protector podría deberse a factores tales como, la longitud de las cadenas de carbono, su posición del radical hidroxilo, el refuerzo de los puentes de hidrógeno, etc., aunque también se habla de lo que es el concepto de actividad del agua/osmolaridad en cuyo caso se esperaría que la fructosa ejerciese un efecto similar (Larreta-Garde *et al.*, 2006). No obstante, los resultados obtenidos no apoyan esta última hipótesis por lo que sería algún otro factor el responsable de las diferencias obtenidas.

Al incorporar los resultados de la disolución isotónica con fructosa al análisis, podemos ver que la fructosa no ejerce el efecto positivo del manitol, aunque en este caso sí podríamos afirmar, con significancia estadística, que la impregnación a vacío provoca una mejora de la hidrólisis enzimática. No obstante, cabe recordar que el lote empleado es distinto, por lo que las comparaciones con el resto de tratamientos deben realizarse con reservas.

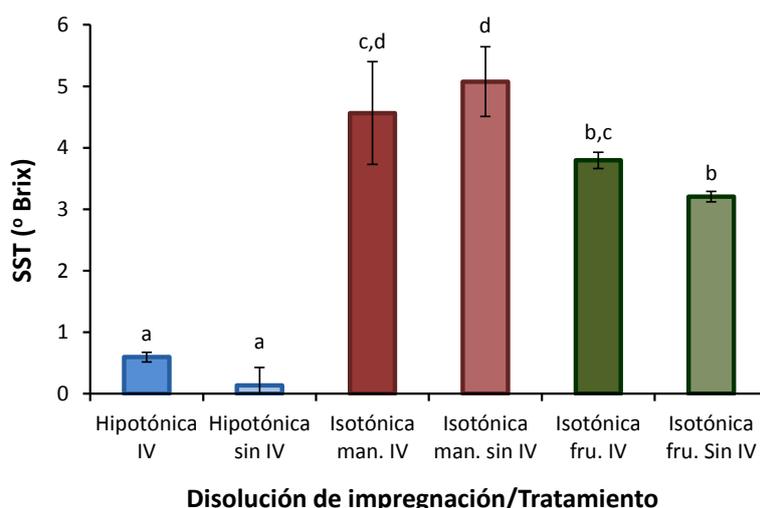


Figura 5. Incremento de los grados Brix después de la hidrólisis enzimática del residuo de naranja para cada una de las disoluciones de impregnación y tratamientos. ^{a,b,c,d}Letras diferentes para un mismo producto indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95%.

En el caso del plátano (**figura 6**), no se observa una mejoría de la impregnación a vacío por el hecho de utilizar manitol, a diferencia de la naranja donde ocurre justo lo contrario. En este caso lo que sí que se observa es un mejor resultado para el caso de emplear disoluciones hipotónicas (p-valor < 0,05), y también por el hecho de emplear la IV.

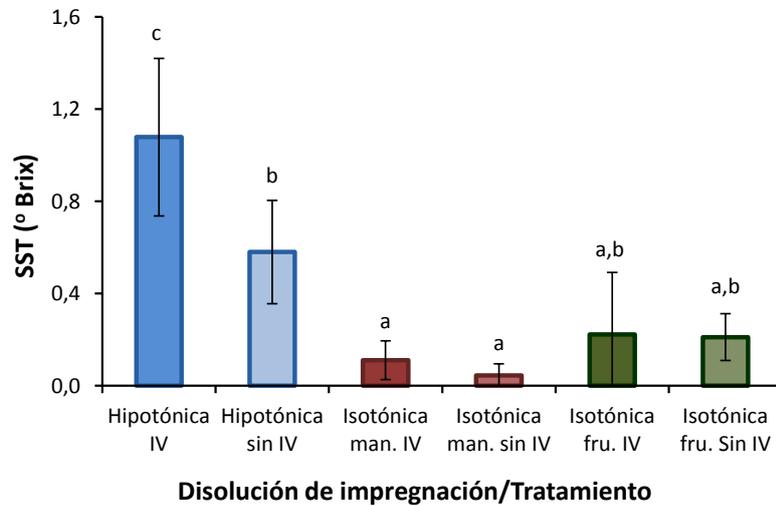


Figura 6. Incremento de los grados Brix después de la hidrólisis enzimática del residuo de plátano para cada una de las disoluciones de impregnación y tratamientos. ^{a,b,c}Letras diferentes para un mismo producto indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95%.

Y por último, en el caso de la alcachofa (**figura 7**) se observa una tendencia clara a mejorar la hidrólisis enzimática cuando se emplea la impregnación a vacío, para todos los tratamientos: hipotónica, isotónica manitol e isotónica fructosa. Si hay que resaltar algún valor, la disolución hipotónica vuelve a dar mejores resultados que la isotónica, como en el caso del plátano, según la hipótesis inicial.

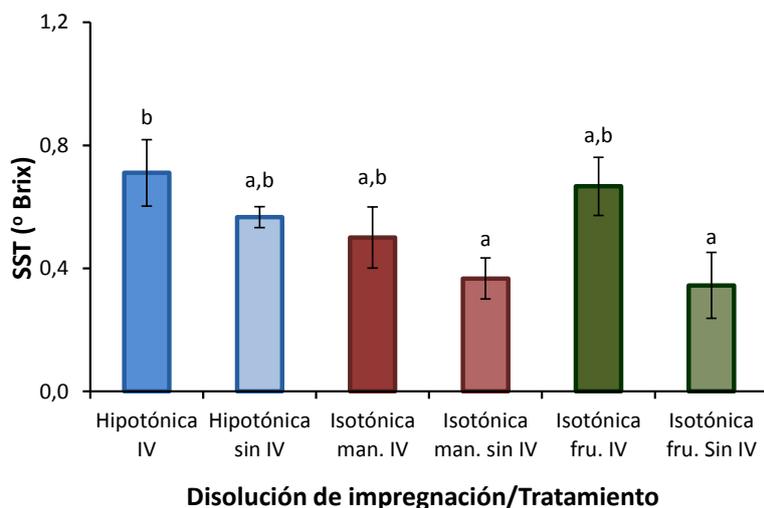


Figura 7. Incremento de los grados Brix después de la hidrólisis enzimática del residuo de alcachofa para cada una de las disoluciones de impregnación y tratamientos. ^{a,b,c}Letras diferentes para un mismo producto indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95%.

El análisis estadístico de los resultados de hidrólisis enzimática, aplicado sobre los resultados de grados Brix, a través de la realización de un ANOVA multifactorial de orden de interacción máxima 2, concluye que tanto el tipo de residuo, como el hecho de impregnar o no y el tipo de soluto utilizado son estadísticamente significativos (p -valor $< 0,05$). Por lo tanto, se podría afirmar que la IV produce una mejora estadísticamente significativa de la etapa de hidrólisis enzimática, para el caso de los residuos estudiados.

4.B.4. Determinación del perfil de azúcares en el residuo hidrolizado por cromatografía de intercambio iónico.

Tal y como se indica en el apartado de material y métodos, los azúcares liberados durante la hidrólisis enzimática se determinaron por cromatografía de intercambio iónico.

En la **figura 8** se muestra uno de los cromatogramas correspondientes al mix de patrones empleado para la identificación de azúcares, en concreto: glucosa, fructosa y sacarosa, y el alcohol de azúcar manitol.

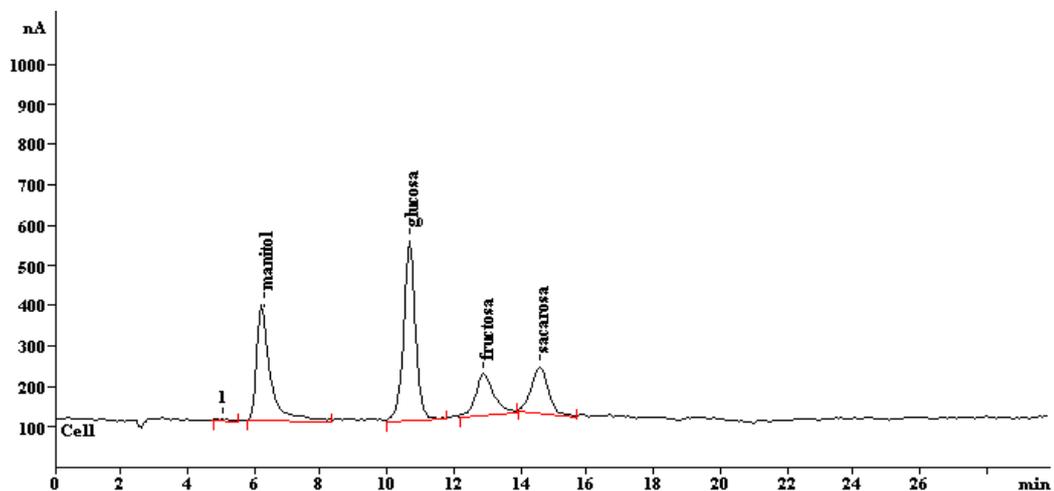


Figura 8. Cromatograma correspondiente al mix de patrones glucosa, fructosa, sacarosa y manitol (Concentración = 10 ppm).

En la **figura 9** se muestra el cromatograma perteneciente a una de las muestras donde se confirma que los azúcares se obtienen aproximadamente en el mismo tiempo de retención que el que se observa en el cromatograma correspondiente a los patrones (**figura 8**). Tal y como puede observarse en esta figura, en algunas muestras hubo presencia de otros compuestos, azúcares o alcoholes de azúcar, que no han sido objeto de estudio en este trabajo, por lo que no se identificaron ni cuantificaron. En esta figura y por el siguiente orden, se identifican los picos correspondientes a los compuestos: glucosa, fructosa y sacarosa.

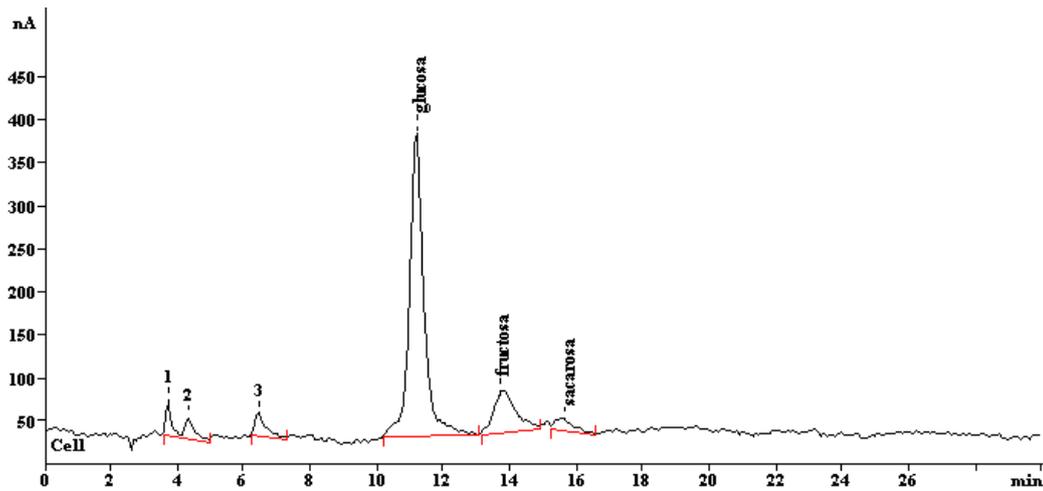


Figura 9. Cromatograma correspondiente a la fase líquida separada del residuo hidrolizado de naranja (dilución 1:2000)

A continuación, se presentan los resultados correspondientes a la concentración (mg/mL) de glucosa, fructosa, sacarosa y manitol en la fase líquida separada del residuo hidrolizado, para cada una de las disoluciones empleadas y correspondientes a cada uno de los residuos objeto de estudio. Los resultados se recogen en las **figuras 10, 11 y 12**. Para cada tipo de residuo, es conveniente analizar los resultados correspondientes a cada una de las disoluciones empleadas por pares, es decir, comparando los casos en los que hay IV con los que no existe IV.

En todos los casos se observa que en la columna correspondiente a los resultados de utilizar una disolución isotónica manitol (con IV/sin IV) aparece el manitol, que había sido incorporado para asegurar la isotonicidad de la disolución de impregnación, no correspondiendo en este caso a un soluto resultado de la hidrólisis enzimática. Para el caso de la isotónica fructosa (con IV/sin IV), además de la fructosa incorporada inicialmente también aparece el incremento de fructosa que se ha producido durante la hidrólisis.

Parece ser, a tenor de los resultados obtenidos, que la sensibilidad de la técnica resulta menor a la esperada inicialmente, ya que la desviación de los resultados en algunos casos resulta bastante notable, además de que la concentración obtenida para el caso del manitol debería ser similar en ambos casos, para cada producto, y no resulta de ese modo.

Los resultados obtenidos sugieren que la IV produce un aumento de los azúcares fermentables obtenidos tras la hidrólisis enzimática posterior. Al realizar un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial similar al realizado anteriormente sobre los SST ($^{\circ}$ Brix), pero en este caso sobre los azúcares simples glucosa, fructosa y sacarosa, se observa cierta tendencia a que la IV mejora el resultado de la hidrólisis enzimática, aunque los resultados resultan estadísticamente significativos exclusivamente para los casos alcachofa-fructosa y plátano-glucosa.

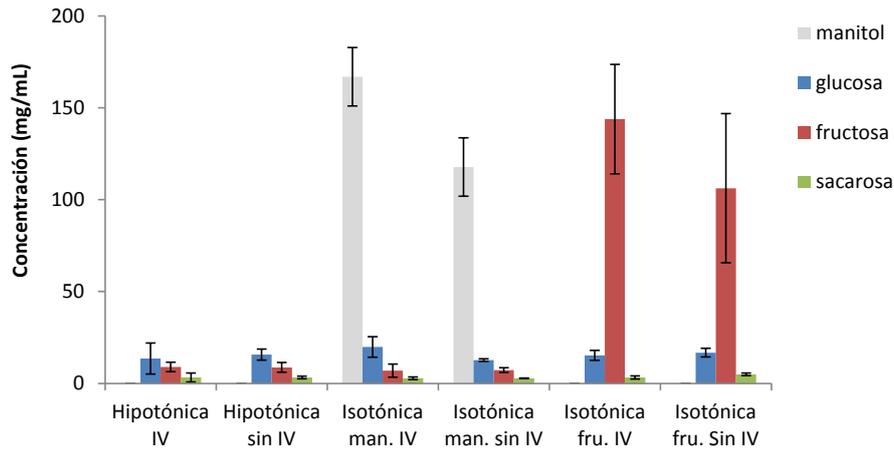


Figura 10. Concentraciones (mg/mL) de sacarosa, glucosa, fructosa y manitol en la fase líquida separada del residuo hidrolizado, para cada una de las disoluciones empleadas, en el caso de la naranja.

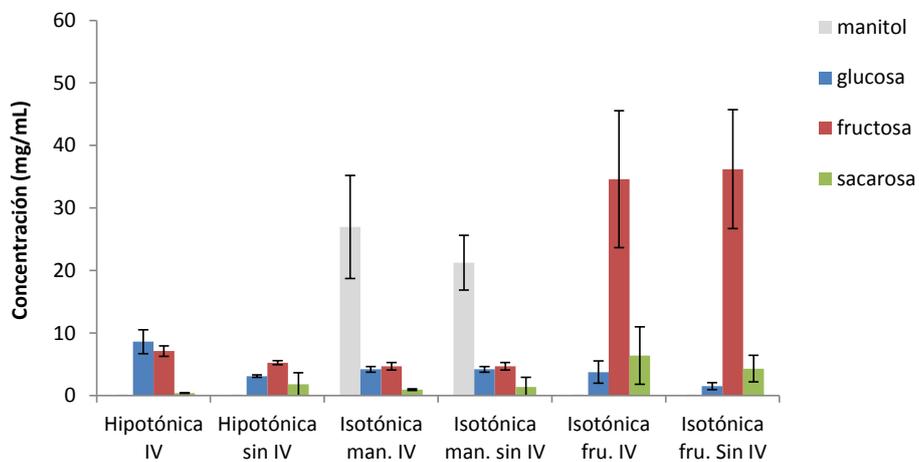


Figura 11. Concentraciones (mg/mL) de sacarosa, glucosa, fructosa y manitol en la fase líquida separada del residuo hidrolizado, para cada una de las disoluciones empleadas, en el caso del plátano.

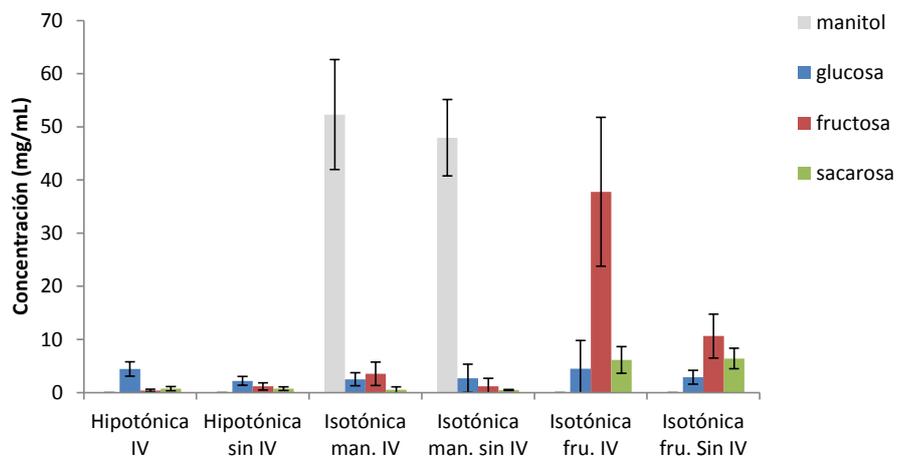


Figura 12. Concentraciones (mg/mL) de sacarosa, glucosa, fructosa y manitol en la fase líquida separada del residuo hidrolizado, para cada una de las disoluciones empleadas, en el caso de la alcachofa.

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la valoración de la capacidad de impregnación permiten concluir que, tanto la procedencia del residuo como el tratamiento de desestructuración que se le aplica (troceado/triturado), condicionarán en gran medida el efecto de la impregnación a vacío, obteniéndose impregnaciones más altas en los residuos triturados. Con respecto a la conveniencia de favorecer la rotura celular y en consecuencia el proceso de hidrólisis, mediante la impregnación con disoluciones hipotónicas, los resultados resultan positivos en todos los residuos excepto en los de naranja. Una composición diferente de este residuo permitiría explicar estas diferencias.

Los resultados obtenidos en la etapa posterior de hidrólisis enzimática, revelan que, en general, la impregnación de los residuos mejora los resultados de la hidrólisis, teniendo en cuenta el incremento de sólidos solubles totales. Únicamente en el caso de los residuos de naranja, el empleo de una disolución que incluye manitol proporciona mejores resultados en los residuos sin impregnar. Por otra parte, los resultados de cromatografía iónica confirman la tendencia de que la impregnación a vacío mejora el resultado de la hidrólisis enzimática posterior, aunque los resultados son estadísticamente significativos exclusivamente para los casos alcachofa-fructosa y plátano-glucosa. No obstante, aunque se ha constatado cierta mejoría del resultado de hidrólisis, de momento no se puede afirmar que el coste de la operación de IV utilizado como pretratamiento estaría justificado.

En definitiva como conclusión general del presente trabajo, se podría afirmar que la optimización de la operación de IV aplicada previamente a la etapa de hidrólisis enzimática de determinados residuos agroindustriales podría suponer un aumento de la hidrólisis de la celulosa, lo que se traduciría en mejores rendimientos de producción de bioetanol.

6. BIBLIOGRAFÍA

ARANTES, V. y 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): 1-17.

BADILLO, G.M.; SEGURA, L.A. y LAURINDO, J.B. (2011). Theoretical and experimental aspects of vacuum impregnation of porous media using transparent etched networks. *International Journal of Multiphase Flow*, 37: 1219-1226.

CARCIOFI, B.A.M; PRAT, M y LAURINDO, J.B. (2012). Dynamics of vacuum impregnation of apples: Experimental data and simulation results using a VOF model. *Journal of Food Engineering*, 113(2): 337-343.

CARDONA, C.A. y SÁNCHEZ, O.J. (2005). Producción biotecnológica de alcohol carburante I. Obtención a partir de diferentes materias primas. *Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América*, 30(11): 671-678.

CASTAGNINI, J.M.; BETORET, N.; BETORET, E. y FITO, P. (2015). Vacuum impregnation and air drying temperature effect on individual anthocyanins and antiradical capacity of blueberry juice included into an apple matrix. *LWT – Food Science and Technology*, 64: 1289-1296.

CERISUELO, A. y PIQUER, O. (2009). Subproductos agroindustriales en alimentación animal: herramientas para su utilización. Jornada: Aprovechamiento de subproductos y Tratamiento de Residuos de la Industria Alimentaria y la Producción Animal. Conselleria d'Agricultura, Pesca i Alimentació . Centro de Investigación y Tecnología Animal (CITA-IVIA), Universidad CEU.

CHANG, M.M.; CHOU, T.Y.C. y TSAO, G.T. (1981). Structure, pretreatment and hydrolysis of cellulose. *In Advances in Biochemical Engineering*, 20: 15-42.

DELGENÉS, J.P.; PENAUD, V. y MOLETTA, R. (2003). Pretreatments for the enhancement of anaerobic digestion of solid wastes. *ChemInform*, 34(13).

FENGEL, D. y WEGENER, G. (1984). Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Walter de Gruyter. *Journal of Polymer Science*, 23(11): 601-602.

FITO, P. (1994). Modeling of vacuum osmotic dehydration of food. *Journal of Food Engineering*, 22: 313-328.

FITO, P.; ANDRÉS, A.; CHIRALT, A. y PARDO, P. (1996). Coupling of Hydrodynamic Mechanism and Deformation-Relaxation Phenomena During Vacuum Treatments in Solid Porous Food-Liquid Systems. *Journal of Food Engineering*, 27: 229-240.

FITO, P. y PASTOR, R. (1994). Non-diffusional mechanism occurring during vacuum osmotic dehydration. *Journal of Food Engineering*, 21(4): 513-519.

GARCÍA, F.J. y PRIMO, E. (1989). Alcohol de biomasa. III. Hidrólisis de la fracción lignocelulósica obtenida de residuos agrícolas y cosechas de sorgo. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment*, 29(4): 501-509.

GOULA, A.M. y LAZARIDES, H.N. (2015). Integrated processes can turn industrial food waste into valuable food by-products and/or ingredients: The cases of olive mill and pomegranate wastes. *Journal of Food Engineering, in press*: 1-6.

GUILLEMIN, A.; DEGRAEVE, P.; NOËL, C. y SAUREL, R. (2008). Influence of impregnation solution viscosity and osmolarity on solute uptake during vacuum impregnation of apple cubes (var. Granny Smith). *Journal of Food Engineering*, 86: 475-483.

GUILLEMIN, A.; GUILLON, F.; DEGRAEVE, P.; RONDEAU, C.; DEVAUX, M-F.; HUBER, F.; BADEL, E.; SAUREL, R. y LAHAYE, M. (2008). Firming of fruit tissues by vacuum-infusion of pectin methylesterase: Visualisation of enzyme action. *Food Chemistry*, 109(2): 368-378.

GUILLEMIN, A.; DEGRAEVE, P.; GUILLON, F.; LAHAYE, M. y SAUREL, R. (2006). Incorporation of pectinmethylesterase in apple tissue either by soaking or by vacuum-impregnation. *Enzyme and Microbial Technology*, 38: 610–616.

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.

IYER, P.V. y ANANTHANARAYAN, L. (2008). Enzyme stability and stabilization-Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry*, 43(10): 1019-1032.

KRISHNA, S.H.; REDDY, J. y CHOWDARY, G.V. (2001). Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. *Bioresource Technology*, 77: 193-196.

LARRETA-GARDE, V.; FENG, Z. y THOMAS, D. (2006). Behavior of Enzymes in the Presence of Additives. Influence of Alcohols, Polyols, and Sugars on Activity and Stability of Yeast Alcohol Dehydrogenase. *Anales de la Academia de Ciencias de Nueva York*, 542(1): 294-298.

LAUREANO-PÉREZ, L.; TEYMOURI, F.; ALIZADEH, H. y DALE, B.E. (2005). Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 124(1-3): 1081–1099.

MACHADO, M.T.C.; EÇA, K.S.; VIEIRA, G.S.; MENEGALLI, F.C.; MARTÍNEZ, J. y HUBINGER, M.D. (2015). Prebiotic oligosaccharides from artichoke industrial waste: evaluation of different extraction methods. *Department of Food Engineering, School of Food Engineering, University of Campinas*, 76: 141-148.

MANJARRÉS, K.; CASTRO, A. y RODRIGUEZ, E. (2010). Producción de lacasa utilizando *Pleurotusostreatus* sobre cáscaras de plátano y bagazo de caña. *Revista la sallista de investigación*, 7(2): 9-15.

MARTÍN-ALONSO, D.; WETTSTEIN, S.G. y DUMESIC, J.A. (2012). Bimetallic catalysts for upgrading of biomass to fuels and chemicals. *Chem. Soc. Rev.*, 41: 8075-8098.

MARTÍNEZ, N.; ANDRÉS, A.M.; CHIRALT, A. y FITO, P. (1998). El mecanismo hidrodinámico en alimentos porosos. *Termodinámica y cinética de sistemas alimento entorno*. EDITORIAL U.P.V. Valencia, 319-341.

OJEDA, J.W. (2009). Análisis situacional de la gestión de residuos sólidos urbanos casos: Catalunya (España) y Loja (Ecuador). *Universidad Autónoma de Madrid*, 1-63.

PALACIO, H. (1956). Fabricación del alcohol. *Salvat Editores, S.A.* 279-305.

POMARES, F. (1998). Los residuos Orgánicos utilizables en la agricultura: origen, composición y características. *4º Curso de Ing. Ambiental*, 1-16

RESTREPO, A.M.; ARREDONDO, A.; MORALES, C.; TAMAYO, M.; BENAVIDES, Y. y BEDOYA, V. (2012). Aplicación de la técnica de impregnación a vacío en el desarrollo de cáscaras de naranja mínimamente procesadas fortificadas con potasio, sodio, y vitaminas B1, B6 y B9. *Journal of engineering and technology*, 1(1): 8-16.

RESTREPO, A.M.; RODRÍGUEZ, E. y MANJARRÉS, K. (2011). Cortezas de naranja comestibles: una aproximación al desarrollo de productos con valor agregado a partir de residuos agroindustriales. *Producción + Limpia*, 6(2): 47-57.

SALCEDO, J.G.; LÓPEZ, J.E. y FLÓREZ, L.M. (2011). Evaluación de enzimas para la hidrólisis de residuos (hojas y cogollos) de la cosecha caña de azúcar. *Dyna*, ISSN 0012-7353, 169: 182-190.

SÁNCHEZ, A.M.; GUTIERREZ, A.I.; MUÑOZ, J.A. y RIVERA, C.A. (2010). Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. *Revista Tumbaga*, 5: 61-91.

SONIL, N.; AZARGOHAR, R.; DALAI, A.K. y KOZINSKI, J.A. (2015). An assessment on the sustainability of lignocellulosic biomass for biorefining. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 50: 925-941.

REFERENCIAS ELECTRÓNICAS

AINIA ACTUALIDAD (2015). AINIA organiza un Workshop del proyecto europeo BIOGAS3 en BTA 2015. Visto el 29 de Julio de 2015
<http://actualidad.ainia.es/web/ainiaactualidad/notas-prensa/notas-de-prensa-de-ainia/-/articulos/Tc1l/content/ainia-organiza-un-workshop-del-proyecto-europeo-biogas3-en-bta-2015>

ALIMENTARNOS (2013). Impregnación al vacío para desarrollar Ingredientes Funcionales. Visto el 30 de Julio de 2015
<http://www.alimentarnos.com/blog/anuncios/post/impregnacion-al-vacio-para-desarrollar-ingrediente/>

APPA (2006). Asociación de productores de energías renovables. "Una Estrategia de biocarburantes para España (2005-2010)." Visto el 2 de Agosto de 2015
www.appa.es/09documentos/documentos01.htm

INFOAGRO. Gestión y tratamiento de residuos agrícolas. *Agricultura ecológica online*. Visto el 30 de Julio de 2015
http://www.infoagro.com/hortalizas/residuos_agricolas.htm