



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

APLICACIÓN DE LA IMPREGNACIÓN A VACÍO A LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE RESIDUOS DE INDUSTRIALIZACIÓN DE FRUTAS Y HORTALIZAS

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA E
INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNO: CARLOS CARDA NAVARRO

TUTORA ACADEMICA: LUCÍA SEGUÍ GIL
COTUTORA: NOELIA BETORET VALLS

Curso Académico: 2015-2016

VALENCIA, JULIO 2016

APLICACIÓN DE LA IMPREGNACIÓN A VACÍO A LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE RESIDUOS DE INDUSTRIALIZACIÓN DE FRUTAS Y HORTALIZAS

Carlos Carda Navarro, Lucía Seguí Gil¹, Noelia Betoret Valls¹.

RESUMEN

Actualmente, los biocombustibles derivados de biomasa lignocelulósica se encuentran en un auge expansivo, debido a factores como el cambio climático, el agotamiento de fuentes de energía fósiles y sobre todo por la elevada cantidad de residuos agroalimentarios. El rendimiento de la fermentación para la obtención del bioetanol se encuentra condicionado por el grado de hidrólisis y por el acceso de las bacterias a los sustratos. En este trabajo, se estudia la aplicación de la técnica de impregnación a vacío con el fin de mejorar la hidrólisis enzimática y por tanto, aumentar el aprovechamiento de los residuos agroalimentarios.

Se seleccionaron dos tipos de residuos (mandarina y alcachofa), teniendo en cuenta su disponibilidad y sus parámetros de porosidad. Los residuos fueron sometidos a una operación de troceado o triturado y, con el fin de facilitar el contacto enzima-sustrato, la mitad de las muestras se sometieron a la operación de impregnación a vacío previa a la etapa de hidrólisis enzimática, con disoluciones isotónicas de manitol y a dos niveles de hipotonicidad diferentes. El grado de sacarificación de los residuos sometidos o no a la operación de impregnación a vacío con las diferentes disoluciones se evaluó mediante la medida del índice de refracción (grados Brix), así como por cromatografía de intercambio iónico para identificar y cuantificar los azúcares presentes en los hidrolizados.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la capacidad de impregnación de los residuos mejora significativamente con el triturado, lo que mejora los resultados de la hidrólisis enzimática. Por tanto, se propone la impregnación a vacío como operación complementaria para alcanzar un rendimiento más elevado en la producción de bioetanol.

PALABRAS CLAVE: Residuos agroalimentarios, impregnación a vacío, hidrólisis enzimática, biomasa lignocelulósica, manitol, bioetanol.

RESUM

Actualment, els biocombustibles derivats de biomassa lignocel·lulòsica es troben en un auge expansiu, a causa de factors com: el canvi climàtic, l'esgotament de fonts d'energia fòssils i sobretot per l'elevada quantitat de residus agroalimentaris. El rendiment de la fermentació per a l'obtenció del bioetanol es troba condicionat

¹Instituto Universitario de Ingeniería de los Alimentos para el Desarrollo (IUIAD). Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n. 46022. Valencia.

pel grau d'hidròlisi i per l'accés dels bacteris als substrats. En aquest treball, s'estudia l'aplicació de la tècnica d'impregnació a buit per tal de millorar la hidròlisi enzimàtica i per tant, augmentar l'aprofitament dels residus agroalimentaris.

Es van seleccionar dos tipus de residus (mandarina i carxofa), tenint en compte la seva disponibilitat i els seus paràmetres de porositat. Els residus van ser sotmesos a una operació de trossejat o triturat i com a pretractament a l'etapa d'hidròlisi enzimàtica, la meitat de les mostres es van sotmetre a l'operació d'impregnació a buit amb dissolucions isotòniques de manitol o a dos nivells de hipotonicitat diferents. El nivell de sacarificació dels residus sotmesos o no al pretractament d'impregnació a buit amb les diferents dissolucions es va avaluar mitjançant la mesura de l'índex de refracció (graus Brix) i per cromatografia d'intercanvi iònic per identificar i quantificar els sucres.

Els resultats obtinguts posen de manifest que els residus triturats augmenten de manera destacada la capacitat d'impregnació dels dos residus, així mateix en la hidròlisi enzimàtica milloren els resultats. Per tant, la impregnació a buit pot suposar una operació complementària per aconseguir un rendiment més elevat en la producció de bioetanol.

PARAULES CLAU: Residus agroalimentaris, impregnació a buit, hidròlisi enzimàtica, biomassa lignocel·lulòsica, manitol, bioetanol.

ABSTRACT

Currently, biofuels derived from lignocellulosic biomass are in an expansionary boom, due to factors such as climate change, depletion of fossil energy sources and especially due to the huge amounts of food waste. The fermentation yield in bioethanol production is conditioned by the degree of hydrolysis and bacteria access to substrates. In this work, the application of vacuum impregnation is studied in order to improve enzymatic hydrolysis and thus increase the utilization of agricultural food waste.

Two types of waste (mandarin and artichoke) were selected, considering its availability and porosity parameters. Both residues were subjected to slicing or mincing prior to the enzymatic hydrolysis step, half of the samples were subjected to vacuum impregnation with isotonic solutions of mannitol and two different levels of hypotonicity. Sugars present in the hydrolyzates were determined by measuring the refractive index (Brix) and by ion exchange chromatography.

Results indicate that mincing implies better impregnation characteristics, this implying better hydrolysis results. Therefore, vacuum impregnation could be used as a complementary stage to achieve a higher yield in the production of bioethanol.

KEYWORDS: Food industry waste, vacuum impregnation, enzymatic hydrolysis, lignocellulosic biomass, mannitol, bioethanol.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día, la economía mundial es dependiente de diferentes fuentes de energía fósiles como el petróleo, carbón o gas natural. Un consumo excesivo de estos combustibles fósiles ha provocado elevados niveles de contaminación, sobre todo en zonas urbanas (Sarkar et al. 2012). Adicionalmente, factores como el incremento del precio del combustible y el agotamiento de los recursos fósiles han originado un gran interés en la producción energética a partir de los residuos o subproductos vegetales (Sonil et. al., 2015). De este modo, la directiva 2003/30/CE define biocombustible como todo aquel combustible líquido o gaseoso producido a partir de biomasa que puede utilizarse para alimentar los motores de combustión interna de los vehículos de transporte. El biocombustible de mayor producción mundial es el bioetanol (Demirbas, 2005).

Hay que tener en cuenta la elevada cantidad de residuos que provienen del sector agroalimentario, lo cual constituye uno de los mayores problemas medioambientales. Se trata de residuos que varían su naturaleza, composición y volumen, en función del proceso y la tecnología empleada en la industria. Una adecuada gestión de estos residuos permitiría evitar mayores inconvenientes en el medio ambiente (Goula y Lazarides, 2015).

La producción de biocombustibles de segunda generación emplea una gran variedad de residuos agrícolas (paja de trigo, cascarilla de arroz, bagazo de caña, etc.). En general se trata de materiales lignocelulósicos que requieren de un proceso de hidrólisis para ser utilizados. En los últimos años, se han llevado a cabo diferentes investigaciones sobre la producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos (Cadoche y López, 1989; Binod et al., 2010; Duff y Murray, 1996). La bioenergía se concibe como un recurso prometedor, debido a que sus ventajas económicas y medio ambientales cada vez son más perceptibles, como consecuencia de la mejora en la tecnología (Sonil et al., 2015).

Cabe señalar que la biomasa lignocelulósica consiste en un complejo heterogéneo de polímeros de carbohidratos y lignina. Por una parte, la celulosa, homopolímero de glucosa, favorece el ordenamiento lineal de las cadenas en una estructura compacta, altamente cristalinas insolubles y resistentes a la despolimerización (Mosier et al., 2005). La hemicelulosa es un heteropolímero corto y ramificado (Sarkar et al., 2012). Y por último la lignina, se encuentra fuertemente unida a la celulosa y hemicelulosa, y como resultado las protege frente a posibles ataques, como la hidrólisis enzimática (Peiji et al., 1997).

Para la obtención de biocombustibles es fundamental la sacarificación, es decir, la hidrólisis enzimática de las largas cadenas lignocelulósicas en azúcares simples, con la finalidad de que se encuentren disponibles para las bacterias fermentativas. Sin embargo, es imprescindible un pretratamiento ya que se persigue la rotura de la matriz lignocelulósica con el fin de reducir el grado de cristalinidad de la celulosa, incrementar el área superficial y aumentar la fracción de celulosa amorfa, forma más adecuada para el ataque enzimático (Sánchez y Cardona, 2008). Existen diferentes tipos de

pretratamientos: físicos (molienda, trituración, pirolisis, microondas), físico-químicos (termohidrólisis, explosión de vapor), químico (hidrólisis ácida, oxidación húmeda, ozono, etc.) y biológicos (podredumbre marrón y blanca). Todo pretratamiento debe cumplir los siguientes requisitos para que sea eficaz y rentable: formación de azúcares directa o posteriormente en la hidrólisis, evitar la pérdida o degradación de los azúcares formados, limitar la formación de productos inhibitorios de procesos fermentativos, reducción de las demandas de energía y minimización de los costes (Sarkar et al., 2012).

Sun y Cheng en el 2002 afirmaron que el desarrollo de tecnologías de pretratamiento más eficientes para la biomasa lignocelulósica es uno de los retos que necesitan más investigación. De este modo, se propone la posibilidad de aplicar nuevas tecnologías, como la impregnación a vacío, con el fin de incluir enzimas hidrolíticas en el interior de los subproductos o residuos vegetales porosos para favorecer la hidrólisis posterior.

Cabe destacar que la técnica de impregnación a vacío (IV) es una operación de transferencia de materia entre un medio líquido y un sustrato sólido con estructura porosa. Así pues, el sistema se encuentra formado por el sólido sumergido en el seno del líquido, en el cual se crean unos gradientes de presión que juntamente con la presión capilar en la entrada de los poros, provocan la transferencia de gas y líquido entre las fases del sistema. En 1994, Fito y Pastor explicaron el principal mecanismo implicado en la impregnación a vacío, al que llamaron mecanismo hidrodinámico. En primer lugar, el material poroso se somete a una presión subatmosférica durante un tiempo determinado, con la finalidad de conseguir una desgasificación de la estructura porosa, debido a la expansión del aire para equilibrarse con la presión aplicada al sistema. A continuación, se reestablece la presión atmosférica, lo cual implica que la disolución externa penetre en la estructura de los poros del material poroso, debido a la creación de un nuevo gradiente de presión que actúa como fuerza impulsora.

Así mismo, el mecanismo hidrodinámico (HDM), se encuentra afectado por fenómenos de deformación-relajación (DRP) en la matriz del material poroso debido a los cambios de presión. En 1996, Fito y colaboradores propusieron el primer modelo matemático, en el cual se contempla tanto el mecanismo hidrodinámico como la deformación-relajación. Cabe resaltar que la operación de la impregnación a vacío permite la incorporación de solutos de un modo controlado en la estructura del alimento poroso, es decir, modificar la composición original del producto sin prácticamente afectar a su estructura.

Entre las aplicaciones más destacadas en las que se ha empleado la impregnación a vacío se encuentran las siguientes: sazonar o marinar carnes y pescados, prevención del pardeamiento oxidativo en las frutas (Almazora et al. 2000; Barbosa-Cánovas y Vega-Mercado, 1996), obtención de un snack de manzana con efecto probiótico (Barrera Puigdollers, 2007). No obstante, el empleo de esta técnica con la finalidad de incorporar enzimas para mejorar procesos posteriores, todavía no se ha estudiado en

profundidad. Únicamente se han llevado a cabo 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 con una disolución de cloruro de sodio y/o alginato de sodio (Guillemin et al. 2006; Carciofi et al., 2012).

En este trabajo se estudia la aplicación de la técnica de impregnación a vacío de residuos vegetales con enzimas hidrolíticos como pretratamiento a la hidrólisis enzimática, con la finalidad de aumentar el rendimiento de la sacarificación y en consecuencia mejorar la etapa de fermentación, de algunos de los residuos vegetales que provienen de la industria agroalimentaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las muestras

A la hora de elegir los residuos con los que trabajar, se tuvieron en cuenta diversos factores como: el nivel de producción y generación de residuos en su procesado, disponibilidad durante el periodo de realización del estudio, y el parámetro de la porosidad. De acuerdo con lo expuesto anteriormente, se escogieron: la piel de mandarina y los residuos de alcachofa. Las materias primas se adquirieron en un supermercado local, eligiendo muestras lo más homogéneas posible en su aspecto externo.

Hay que tener en cuenta, que las muestras del estudio fueron las partes no comestibles o bagazo de los dos productos seleccionados. Se lavaron las mandarinas y las alcachofas y se retiraron las partes comestibles. En ambos casos el bagazo fue troceado y triturado. Los trozos se obtuvieron de 1 cm de largo y 1 cm de ancho. En cuanto a las muestras trituradas, se obtuvieron a partir de las troceadas, se introdujeron en una picadora (Philiphs AvanceCollection) a media potencia durante treinta segundos, con el fin de obtener una muestra homogénea y de un tamaño de triturado adecuado.

DISEÑO EXPERIMENTAL

En la siguiente tabla se indica el diseño experimental seguido en el estudio y que se detallará a lo largo de este apartado. Se realizaron tres series experimentales de cada combinación

Tabla 1. Diseño experimental de la hidrólisis enzimática con y sin impregnación a vacío previa.

Tipo de disolución	Contacto enzima-sustrato	Hidrólisis enzimática
Isotónica manitol	Con Impregnación a vacío	Estufa de incubación (50 °C 24 h)
Hipotónica (sin manitol)	Sin Impregnación a vacío	
Intermedia manitol		

EXPERIMENTOS DE IMPREGNACIÓN

Con la finalidad de estudiar la etapa de impregnación a vacío para favorecer el contacto enzima-sustrato durante la hidrólisis enzimática se

llevaron a cabo una serie de ensayos tomando tres niveles de isotonicidad para la disolución de impregnación, con el fin de discriminar el efecto exclusivo del mecanismo hidrodinámico y observar su influencia en la posterior hidrólisis enzimática. De este modo, se prepararon disoluciones acuosas de celulasas, hemicelulasas y manitol con diferente isotonicidad. Cabe señalar que el uso del manitol se debe a que no es un producto de la hidrólisis y, en principio, no interfiere en la actividad enzimática. La cantidad de enzimas que se utilizó fue la recomendada en estudios previos: 0,4% de celulasa y 0,1% de hemicelulasa (Hurtado, 2013). Se calculó la cantidad necesaria de manitol para conseguir una a_w de 0,9796 y 0,9824 para la disolución isotónica, y 0,985 y 0,99 para la intermedia, de mandarina y alcachofa respectivamente, mediante la aplicación de la ecuación de Norrish (1).

$$a_w = (1 - x_s) \cdot e^{(-K \cdot x_s^2)} \quad (1)$$

Dónde:

a_w : actividad del agua objetivo en la disolución de impregnación.

x_s : fracción molar del soluto (manitol en este caso).

K: constante de Norrish (K=0,906 para el manitol).

La cantidad de disolución de impregnación empleada fue diferente en cada residuo, ya que se tuvo en cuenta el volumen de líquido necesario para cubrir el residuo. En la tabla 2 se muestra la composición de las disoluciones de impregnación utilizadas en el plan experimental.

Tabla 2. Composición de las disoluciones de impregnación empleadas en el estudio.

Tipo de disolución impregnación	Composición de la disolución impregnación	Tipo de disolución impregnación	Composición de la disolución impregnación
Mandarina		Alcachofa	
Isotónica ($a_w = 0,980 \pm 0,003$)	69,4 g agua 15,5 g manitol 0,16 g celulasa 0,04 g hemicelulasa	Isotónica ($a_w = 0,982 \pm 0,003$)	80,6 g agua 14,4 g manitol 0,16 g celulasa 0,04 g hemicelulasa
Hipotónica ($a_w = 1,00 \pm 0,003$)	69,4 g agua 0,16 g celulasa 0,04 g hemicelulasa	Hipotónica ($a_w = 1,00 \pm 0,003$)	80,6 g agua 0,16 g celulasa 0,04 g hemicelulasa
Intermedia ($a_w = 0,985 \pm 0,003$)	69,4 g agua 10,56 g manitol 0,16 g celulasa 0,04 g hemicelulasa	Intermedia ($a_w = 0,990 \pm 0,003$)	86,26 g agua 8,73 g manitol 0,16 g celulasa 0,04 g hemicelulasa

Determinaciones analíticas

Tanto en las muestras troceadas como en las trituradas se realizaron las siguientes determinaciones analíticas por triplicado.

ACTIVIDAD DEL AGUA (a_w)

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

HUMEDAD (x_w)

El contenido en agua (x_w) de los residuos se determinó siguiendo el método gravimétrico de doble pesada 934.06 (AOAC, 2000). De este modo, pequeñas cantidades de la muestra, previamente pesadas, se introdujeron en la estufa (J. P. Selecta) a 60 °C Hasta que se alcanzó el peso constante. Las pesadas se realizaron en una balanza analítica (Mettler Toledo modelo MS304S). A partir de la siguiente ecuación, se obtuvo el valor de la humedad de las muestras.

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

Dónde:

M_{0+mh} = masa del crisol con la cantidad de muestra húmeda.

M_{0+ms} = masa del crisol con la muestra seca, después de la estufa.

M_0 = masa del crisol vacío

DENSIDAD APARENTE (ρ_{ap})

Para la determinación de la densidad aparente (ρ_{ap}) se utilizó el método del picnómetro, utilizando agua como líquido de referencia. Se tomaron las siguientes medidas:

- $M_{(p)}$ = masa del picnómetro vacío (g)
- $M_{(p+w)}$ = masa del picnómetro enrasado con agua (g)
- $M_{(p+m)}$ = masa del picnómetro con la muestra (g)
- $M_{(p+m+w)}$ = masa del picnómetro con agua y la muestra (g)

A partir de la siguiente ecuación se calculó la densidad aparente en g/cm^3 .

$$\rho = \frac{M_{p+m} - M_p}{(M_{p+m} - M_p) \cdot (M_{p+m+w} \cdot M_{p+w})} \quad (3)$$

SÓLIDOS SOLUBLES TOTALES (SST)

Para ambos residuos vegetales se midieron los sólidos solubles totales (SST) por refractometría, mediante la determinación de los grados Brix. De este modo, se empleó un refractómetro de mesa modelo ABBE ATAGO, 3-T termostatado a 21 °C. Para la determinación se adicionaron 10 mL de agua a la muestra.

Por otra parte, sobre las muestras sacarificadas, es decir, después de la hidrólisis enzimática, se llevan a cabo las siguientes determinaciones analíticas:

SÓLIDOS SOLUBLES TOTALES

Se empleó 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, tras someterla a una prensa manual.

PERFIL DE AZÚCARES

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

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó mediante análisis de la varianza (ANOVA) simple y multifactorial para evaluar el nivel de significación de los diferentes factores en estudio, utilizando el paquete estadístico Statgraphics Centurion XVI (Statistical Graphis Corp, Orkville, USA). El nivel de significación considerado fue del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización físico-química de los residuos vegetales

En la tabla 3 se presentan los resultados obtenidos de la caracterización físicoquímica de los dos residuos vegetales. Se muestra como el residuo de mandarina posee una mayor densidad aparente que el de alcachofa, sin embargo no se observan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre ambos valores. En cuanto, a la actividad del agua se observa como los valores son superiores en los residuos triturados que en los troceados, debido a un cambio en la disponibilidad del agua presente en la matriz. Así mismo, la alcachofa posee valores superiores, con diferencias estadísticamente significativas en comparación con la mandarina. Restrepo et al. (2012) obtuvieron unos valores ligeramente similares de actividad de agua y humedad en el caso de la mandarina.

Respecto a la humedad, los residuos de alcachofa presentaron un mayor valor, aunque sin diferencias significativas con respecto al de mandarina. Otros autores (Machado et al., 2015) obtuvieron valores algo inferiores para

el caso del residuo de alcachofa $76.9 \pm 0,5$ (% peso/peso). Finalmente, se puede señalar que el residuo de mandarina presentó un mayor contenido en sólidos solubles (SST).

Tabla 3. Caracterización fisicoquímica de los diferentes residuos. Valores promedio \pm desviación estándar.

	ρ_{ap} (g/cm ³)	a_w troc.	a_w trit.	x_w (g agua/g)	SST (°Brix)
Mandarina	$0,943 \pm 0,12^a$	$0,9779 \pm 0,0007^a$	$0,9796 \pm 0,0002^a$	$0,67 \pm 0,13^a$	$5,3 \pm 0,3^b$
Alcachofa	$0,8753 \pm 0,14^a$	$0,9824 \pm 0,0007^b$	$0,9854 \pm 0,0002^b$	$0,93 \pm 0,13^a$	$3,4 \pm 0,2^a$

a, b, c: grupos homogéneos establecidos por el ANOVA (p-valor $\leq 0,05$)

Mecanismo hidrodinámico (HDM) y capacidad de impregnación

En referencia a la capacidad de impregnación, el análisis de la actuación del mecanismo hidrodinámico (HDM) durante la operación de impregnación de los diferentes residuos estudiados, proporcionó los resultados que se presentan en la tabla 4. Hay que señalar que todas las disoluciones que se prepararon para determinar la capacidad de impregnación se formularon de modo que fuesen isotónicas, ya que la isotonicidad inicia la actuación de los mecanismos osmóticos y por tanto, la aparición de un flujo de agua desde la disolución de impregnación hacia el interior de las células de los residuos.

Tabla 4. Resultados de los parámetros correspondientes al mecanismo hidrodinámico para los residuos estudiados.

Residuo	Forma aplicación	Disolución de Impregnación	X	X ₁	ϵ
Mandarina	Troceada	Sin enzimas	$0,9 \pm 0,3^{b,c,d}$	$0,3 \pm 0,3^{a,b}$	$0,6 \pm 0,3^a$
		Con enzimas	$0,4 \pm 0,2^{b,c}$	$0,54 \pm 0,013^{a,b,c}$	$0,63 \pm 0,17^{a,b}$
	Triturada	Sin enzimas	$1,37 \pm 0,13^e$	$0,8 \pm 0,2^{a,b,c}$	$0,53 \pm 0,05^c$
		Con enzimas	$2,0 \pm 0,3^f$	$1,27 \pm 0,17^{b,c}$	$0,3 \pm 0,2^c$
Alcachofa	Troceada	Sin enzimas	$0,37 \pm 0,05^{a,b}$	$0,2 \pm 0,3^a$	$0,04 \pm 0,3^a$
		Con enzimas	$0,14 \pm 0,07^a$	$1,0 \pm 0,3^c$	$0,09 \pm 0,15^a$
	Triturada	Sin enzimas	$1,02 \pm 0,13^{d,e}$	$1,33 \pm 0,03^c$	$0,94 \pm 0,14^c$
		Con enzimas	$0,82 \pm 0,05^{c,d}$	$1,23 \pm 0,16^c$	$0,72 \pm 0,05^{b,c}$

a, b, c: grupos homogéneos establecidos por el ANOVA (p-valor $\leq 0,05$) X: fracción volumétrica de líquido incorporado al final del proceso por unidad de volumen de muestra. X₁: fracción volumétrica de líquido incorporado al final de la etapa de vacío. ϵ : porosidad efectiva.

Hay que tener en cuenta que valores positivos de X o X₁, significan una entrada de líquido en los residuos, por el contrario valores negativos indican una salida del líquido nativo. Como se observa, todos los valores de X son positivos, lo cual refleja una entrada de líquido de impregnación en la estructura porosa del residuo, al igual que en el estudio de Sáez (2015) realizado en el mismo laboratorio. Así mismo, en las muestras trituradas hay una mayor incorporación de líquido al final del proceso, en comparación con las muestras troceadas. En cuanto al parámetro X₁, hay que señalar que al ser valores positivos y alejados de cero, se puede decir que se ha producido un intercambio de masa en la primera etapa de la operación, además de la

salida del gas ocluido. Globalmente podemos afirmar la mandarina posee una mayor capacidad de impregnación que la alcachofa.

En las muestras troceadas, que son las que conservan en mayor medida la estructura propia del tejido, e independientemente del tejido considerado (mandarina o alcachofa) puede observarse una mayor capacidad de impregnación al final de la operación cuando la disolución de impregnación no contiene enzimas. Se deduce de este resultado que la presencia de enzimas en la disolución dificulta la entrada de líquido con respecto a la disolución sin encimas, sobre todo en la segunda etapa de la operación (cuando se ha restaurado la presión atmosférica). El elevado tamaño molecular de las enzimas en relación con el tamaño de poro de los tejidos considerados podría explicar este hecho. Sin embargo, al trabajar con el tejido triturado que ha perdido su estructura natural y que ha formado una pasta amorfa capaz de configurar poros de mayor tamaño, estas diferencias desaparecen llegando a ser mayor la incorporación de líquido cuando este contiene enzimas. Como es el caso de la mandarina triturada, donde se observan diferencias significativas entre la presencia de enzimas. En cambio, en la alcachofa no se observan estas diferencias en la presencia o ausencia de enzimas.

Otra forma de determinar la cantidad de líquido incorporado en los residuos y que sobre todo adquiere sentido en los residuos triturados en los que se ha destruido la estructura propia del tejido, no pudiéndose aplicar con rigor las ecuaciones deducidas para el mecanismo hidrodinámico, es a partir de la diferencia de peso de las muestras entre el instante inicial y el final de la operación de impregnación. Esta variación de peso se ha expresado como porcentaje de ganancia (%G) y se muestra en la figura 1 para los residuos triturados.

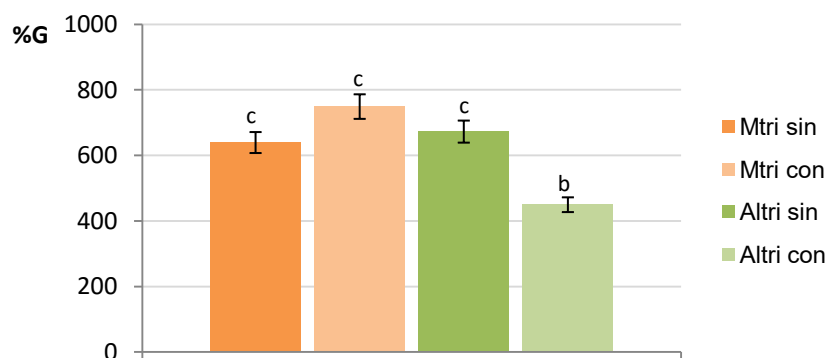


Figura 1. Porcentaje de ganancia (%G) de cada uno de los diferentes residuos triturados estudiados. *Mtri sin*: Mandarina triturada sin enzimas; *Mtri con*: Mandarina triturada con enzimas; *Altri sin*: Alcachofa triturada con enzimas; *Altri con*: Alcachofa triturada con enzimas.

En todos los casos se observan porcentajes de ganancia muy elevados en comparación a estudio anteriores (Sáez, 2015) y que resultan independientes del tipo de residuo y de la presencia de enzimas en la disolución de impregnación. Únicamente se observa un %G algo inferior en

el caso del residuo de alcachofa triturado cuando se introducen enzimas en el medio.

Los mejores resultados observados en los residuos triturados frente a los troceados podrían deberse al aumento de área superficial expuesta a través de la cual el líquido de impregnación tendría un mayor acceso a los canales porosos de gran tamaño que se configuran en la masa amorfa que suponen los residuos triturados.

Caracterización del residuo hidrolizado enzimáticamente

Con la finalidad de valorar la acción enzimática en los diferentes residuos sin impregnar y con el pretratamiento de impregnación con las diferentes disoluciones, se obtuvo índice de refracción o grados Brix como primera aproximación (Figuras 2 y 3).

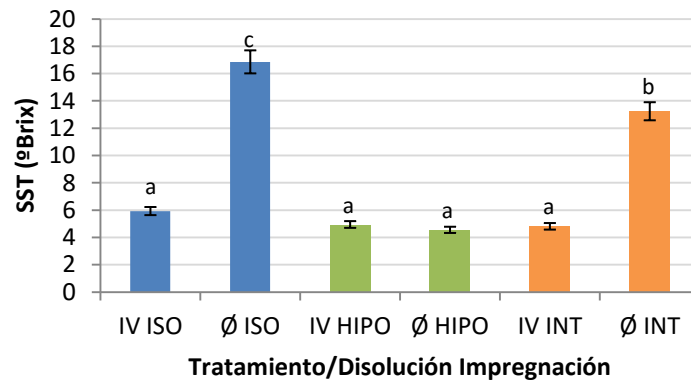


Figura 2. Sólidos solubles totales (°Brix) después de la hidrólisis enzimática del residuo de mandarina para cada disolución y tratamiento. ^{a,b,c} indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95%.

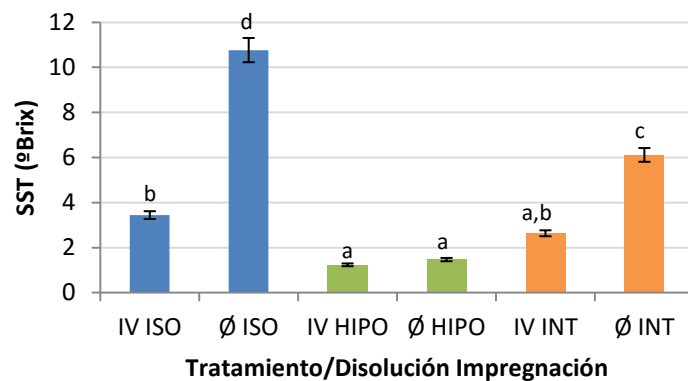


Figura 3. Sólidos solubles totales (°Brix) después de la hidrólisis enzimática del residuo de alcachofa para cada disolución y tratamiento. ^{a,b,c} indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95%.

En primer lugar, cabe destacar que pese a que se pensaba que el empleo de disoluciones enzimáticas hipotónicas con el residuo podría mejorar el contacto enzima-sustrato al inducir roturas celulares debido a un importante flujo de agua hacia el interior de la célula, la medida de los Brix

no apoya dicha hipótesis. Por otro lado, los resultados obtenidos muestran que la hidrólisis enzimática mejora en aquellos residuos a los que se les ha añadido manitol (hipertónico o intermedio), para los casos en los que no se ha aplicado la operación de IV, lo cual en principio no estaría justificado. Sáez (2015) atribuyó las diferencias en presencia de manitol al hecho de que el manitol contribuye a la estabilidad de los enzimas en entorno acuoso (Iyer y Ananthanarayan, 2008), debido a la longitud de las cadenas de carbono, su posición del radical hidroxilo, el refuerzo de los puentes de hidrógeno, etc., pero en su caso la mejoría se observó en todos los tratamientos con manitol, independientemente de la IV. No obstante, también se consideró la posible interferencia del manitol en la medida de SST. En nuestro caso, se sospecha que la mayor concentración de SST podría deberse a que el manitol quedaría en la fase líquida, y ésta sería más fácilmente recuperable en los casos en los que no se aplica IV, de modo que contribuiría a aumentar la medida de grados Brix, sin representar necesariamente un incremento en azúcares liberados durante la hidrólisis enzimática. Por lo tanto, se ve necesario realizar un análisis más exhaustivo de los azúcares presentes en los hidrolizados, el cual se presenta en el apartado siguiente.

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

Mediante la aplicación de la técnica de cromatografía de intercambio iónico se determinaron los azúcares liberados durante la hidrólisis enzimática, según se ha indicado en el apartado de material y métodos.

En la figura 4 se muestra un cromatograma correspondiente a la mezcla de patrones (glucosa, fructosa y sacarosa) que sirvió para la identificación de azúcares.

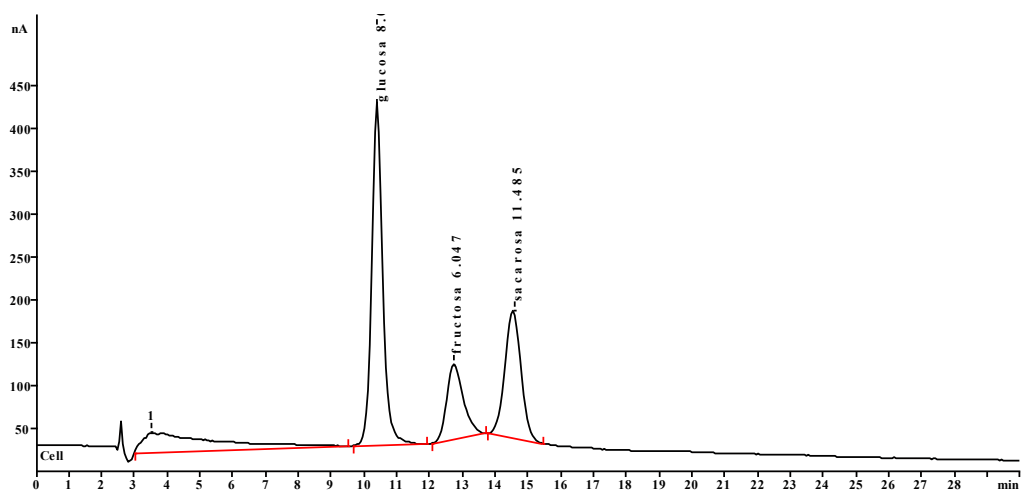


Figura 4. Cromatograma correspondiente a la mezcla de patrones: glucosa, fructosa y sacarosa. (Concentración = 5 ppm).

En la figura 5 se muestra el cromatograma perteneciente a una de las muestras de mandarina, en el cual se puede observar dos aspectos: Por una parte, se confirma que los azúcares se obtienen aproximadamente en el mismo tiempo de retención que en el cromatograma de patrones (figura 5). Por otro lado, se encuentra un pico delante de la glucosa, en concreto en un tiempo de retención de 6.2 min, que correspondería al alcohol de azúcar manitol, empleado en algunas disoluciones de impregnación. Así mismo, tanto en esta figura como en la mayoría de muestras se encuentra la presencia minoritaria de otros compuestos (azúcares o alcoholes de azúcar), que al no ser objeto de estudio en este trabajo, no se identificaron ni cuantificaron.

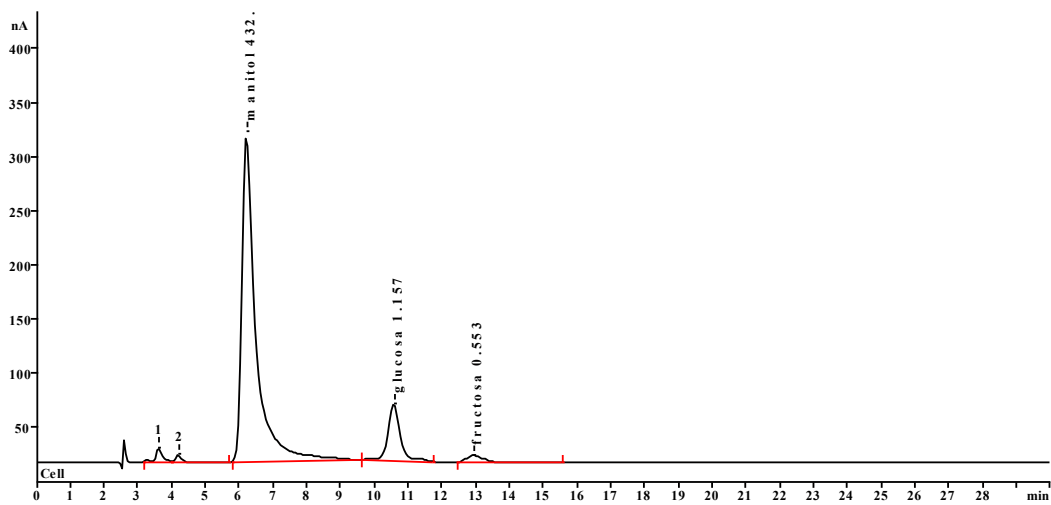


Figura 5. Cromatograma correspondiente a la fase líquida separada del residuo hidrolizado de mandarina triturada sin IV con disolución isotónica (MAND TRI ØISO; dilución 1:10.000).

En las siguientes figuras (Figura 6-9), se puede observar las concentraciones (mg/mL) de los azúcares estudiados, en la fase líquida extraída del residuo hidrolizado, para cada una de las disoluciones, tratamiento y tipo de residuos. En cada gráfica, los resultados se presentan por pares con el fin de comparar la aplicación o no de la impregnación a vacío en cada una de las disoluciones.

En el caso de los residuos de mandarina triturada, se puede observar que para las tres disoluciones de impregnación empleadas, el tratamiento de IV supone un aumento de la concentración de glucosa que resulta de la hidrólisis enzimática. Además de la glucosa, los cromatogramas muestran la presencia de fructosa en todos los casos, a excepción de la muestra *MandTriØINT*, en la que el otro azúcar identificado fue la sacarosa. Esto último se obtiene también en todas las muestras trituradas (Figura 7). Pudiera ser un aumento del área superficial expuesta en los residuos triturados diera lugar a una mayor hidrólisis enzimática en el caso del triturado (monómero) frente al troceado (dímero). No obstante, se sospecha que pudiera haber alguna imprecisión en la identificación de azúcares o bien la necesidad de realizar los análisis cromatográficos en muestras menos

diluidas para poder identificar la totalidad de los azúcares y afinar en la cuantificación de los mismos.

Por otro lado, cabe destacar que en cuanto a las muestras de mandarina troceada, la impregnación a vacío no supone un aumento de los azúcares fermentables, a excepción de la disolución de impregnación con isotonicidad intermedia.

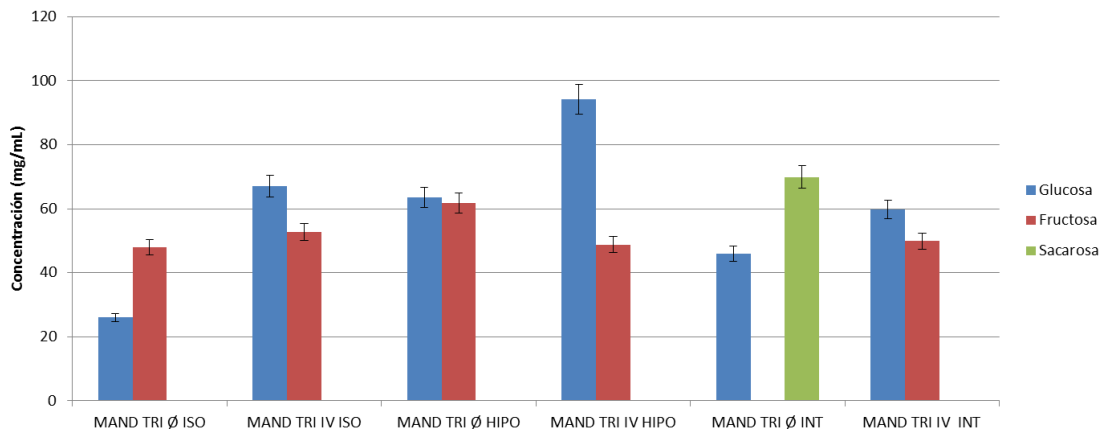


Figura 6. Concentraciones (mg/mL) de glucosa, fructosa y sacarosa en la fase líquida extraída del residuo hidrolizado, para cada una de las disoluciones empleadas, en el caso de mandarina triturada.

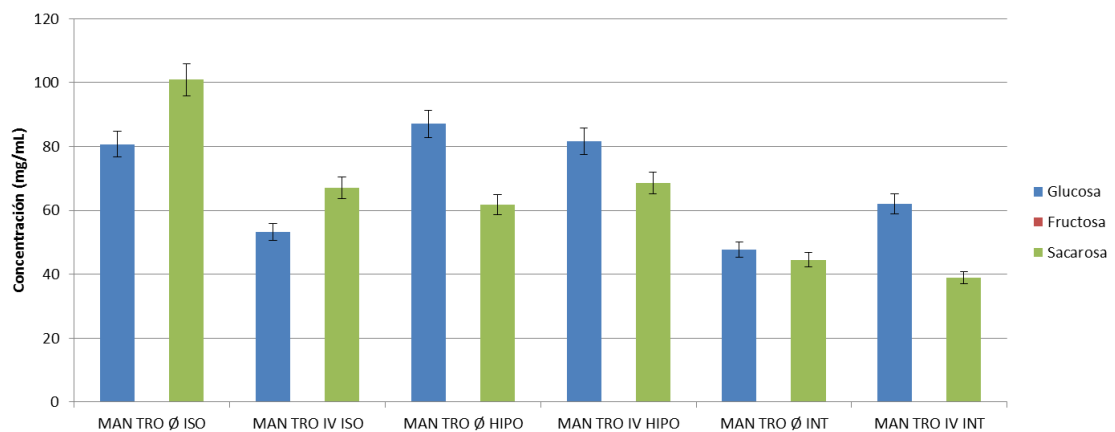


Figura 7. Concentraciones (mg/mL) de glucosa, fructosa y sacarosa en la fase líquida extraída del residuo hidrolizado, para cada una de las disoluciones empleadas, en el caso de mandarina troceada.

Respecto a los residuos de alcachofa (Figuras 8 y 9), se puede señalar que las concentraciones (mg/mL) de azúcares obtenidas son menores a las de mandarina, lo que podría deberse a una menor cantidad original de éstos en el material residual sin hidrolizar, así como a una menor efectividad del tratamiento dada la menor porosidad y, como consecuencia, menor disponibilidad de canales porosos para el acceso del líquido de

impregnación. No obstante, se observa un aumento general de la concentración de azúcares en los tratamientos en los que se emplea la IV, fundamentalmente de la glucosa, principal producto de hidrólisis. Aunque en este caso, la variabilidad de los resultados es notable.

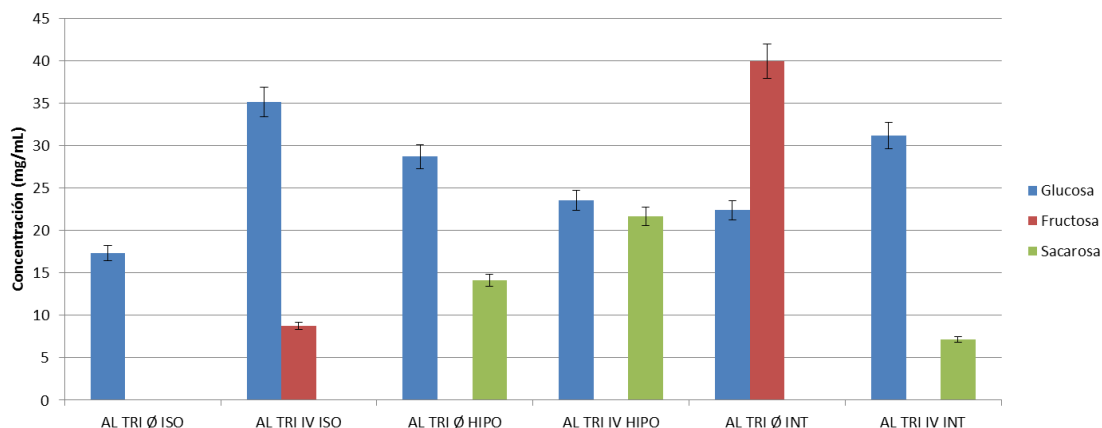


Figura 8. Concentraciones (mg/mL) de glucosa, fructosa y sacarosa en la fase líquida extraída del residuo hidrolizado, para cada una de las disoluciones empleadas, en el caso de la alcachofa triturada.

Los resultados correspondientes a alcachofa troceada muestran todavía más variabilidad, observándose la presencia de sólo glucosa en algunos casos. En cualquier caso, se demuestra un aumento del contenido en azúcares fermentables en los tratamientos en los que se ha empleado la IV.

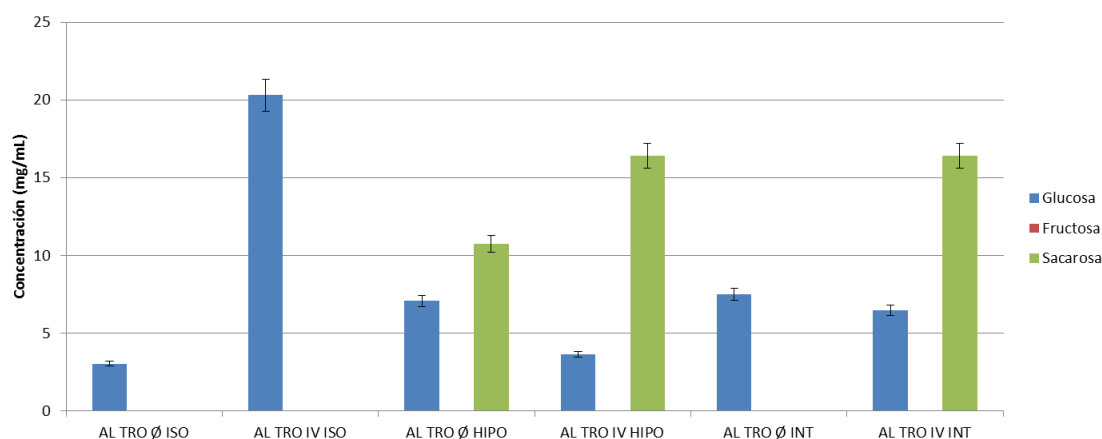


Figura 9. Concentraciones (mg/mL) de glucosa, fructosa y sacarosa en la fase líquida extraída del residuo hidrolizado, para cada una de las disoluciones empleadas, en el caso de la alcachofa troceada.

Con el fin de valorar los resultados globales, teniendo en cuenta los diferentes residuos sobre los que se ha trabajado, así como los distintos tratamientos ensayados, se presentan a continuación los azúcares fermentables presentes en cada uno de los hidrolizados (tabla 5). A pesar de que los resultados cromatográficos pueden no ser concluyentes, éstos sugieren que la IV es un factor estadísticamente significativo y que, en

general, aplicar los enzimas en una etapa de impregnación a vacío contribuye a mejorar el resultado de la hidrólisis enzimática.

Tabla 5. Concentraciones (ppm) de azúcares fermentables (glucosa, fructosa y sacarosa) presentes en los residuos hidrolizados.

MUESTRA Y TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES (ppm)	MUESTRA Y TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES (ppm)
MAND TRI Ø ISO	24,6±29,4 ^a	AL TRI Ø ISO	5,7±8,5 ^{a, b}
MAND TRI IV ISO	40,0±30,9 ^{a, b}	AL TRI IV ISO	14,1±26,9 ^{b, c}
MAND TRI Ø HIPO	41,8±33,6 ^{a, b}	AL TRI Ø HIPO	9,5±14,7 ^{a, b}
MAND TRI IV HIPO	47,8±41,3 ^{a, b}	AL TRI IV HIPO	7,83±15,4 ^{a, b}
MAND TRI Ø INT	38,6±41,9 ^{a, b}	AL TRI Ø INT	10,9±18,8 ^{a, b}
MAND TRI IV INT	36,5±37,3 ^{a, b}	AL TRI IV INT	22,4±26,9 ^c
MAN TRO Ø ISO	60,8±47,7 ^b	AL TRO Ø ISO	1,01±3,9 ^a
MAN TRO IV ISO	39,8±46,8 ^{a, b}	AL TRO IV ISO	5,7±9,7 ^{a, b}
MAN TRO Ø HIPO	49,5±55,3 ^{a, b}	AL TRO Ø HIPO	2,36±8,2 ^a
MAN TRO IV HIPO	50,1±39,1 ^{a, b}	AL TRO IV HIPO	1,20±4,18 ^a
MAN TRO Ø INT	30,8±45,2 ^{a, b}	AL TRO Ø INT	6,08±12,9 ^{a, b}
MAN TRO IV INT	33,6±39,4 ^{a, b}	AL TRO IV INT	2,15±5,33 ^a

^{a, b, c} indican diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% (p-valor ≤ 0,05)

CONCLUSIONES

En este trabajo se ha estudiado la aplicación de la técnica de impregnación a vacío como etapa previa a la hidrólisis enzimática, con el fin de mejorar el rendimiento en azúcares y posterior fermentación para la producción de biocombustibles. Para ello se evaluaron dos residuos (mandarina y alcachofa), los cuáles se caracterizaron fisicoquímicamente, se determinó su capacidad de impregnación y se analizaron los azúcares fermentables generados.

Una de las primeras conclusiones que se extrae del presente trabajo es la elevada generación de residuos agroalimentarios que se produce en la actualidad, lo que ha generado un interés cada vez mayor en la búsqueda y optimización de procesos de degradación y aprovechamiento de los mismos. Entre los compuestos de valor añadido de interés, se encuentra el I bioetanol de segunda generación.

Con respecto al trabajo experimental desarrollado, se concluye que la operación de impregnación a vacío puede contribuir a la mejora de la hidrólisis enzimática en residuos que presenten las características adecuadas y bajo determinadas condiciones. En particular, el hecho de triturar la muestra produce una mejora de la capacidad de impregnación

independientemente de la presencia de enzimas, lo que podría deberse a un aumento en la accesibilidad a la estructura del residuo, debido a la generación de canales de poros de mayor tamaño, que se traduciría en una mayor entrada del líquido de impregnación. Por un lado, conocer este hecho permitiría acondicionar la materia prima para optimizar la operación de IV del residuo, aunque por otro lado este resultado revela que la IV no podría sustituir un pretratamiento físico de triturado o molienda, sino más bien complementarlo.

Cabe destacar que en general la operación de impregnación a vacío supone una mejora de la hidrólisis enzimática, a tenor de los azúcares fermentables liberados al medio en cada caso. Por lo que respecta a los diferentes residuos estudiados, los resultados indican se podrían obtener una mayor cantidad de azúcares fermentables a partir de pieles de mandarina, que de bagazo de alcachofa.

Finalmente, como conclusión del trabajo se extrae que la optimización de la operación de impregnación a vacío aplicada al inicio de a la etapa de hidrólisis enzimática de determinados residuos agroalimentarios podría mejorar los resultados de la etapa de hidrólisis enzimática del proceso de obtención de bioetanol. Sin embargo, se necesitan más ensayos para poder confirmar este hecho, y determinar si el coste añadido de la operación de impregnación a vacío estaría justificado.

REFERENCIAS

- ALZAMORA, S.M.; CASTRO, M.A.; NIETO, A.B.; VIDALES, S.L.; SALVATORI, D.M. (2000). *The role of tissue microstructure in the textural characteristics of minimally processed fruits*. En: *Minimally processed fruits and vegetables*. Eds. S.M. Alzamora, M.S. Tapia y A. López-Malo, Aspen Publishers Inc, Gaithersburg, 9: 153-171.
- 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.
- BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. y VEGA-MERCADO, H. (1996). *Dehydration of Foods*. Springer Science & Business Media. 330 pp. ISBN 0412064219.
- BARRERA PUIGDOLLERS, C. (2007). *Estudio de la deshidratación osmótica y del secado por aire caliente como operaciones de estabilización de productos de manzana (var. Granny Smith) enriquecidos en calcio*. Universitat Politècnica de València.
- BINOD, P., SINDHU, R., SINGHANIA, R. R., VIKRAM, S., DEVI, L., NAGALAKSHMI, S. (2010). *Bioethanol production from rice straw: an overview*. *Bioresource Technology*, 101:4767-4774.
- CADOICHE, L. y LOPEZ, G. D. (1989). *Assessment of size reduction as a preliminary step in the production of ethanol from lignocellulosic wastes*. *Biology of Wastes*, 30: 153-157.
- 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.

- CHÁFER, M.; ORTOLÁ, M.D.; MARTÍNEZ-MONZÓ, J.; NAVARRO, E.; CHIRALT, A., y FITO, P. (2001). *Impregnación en vacío y deshidratación osmótica de la cáscara de mandarina*. Actas de la ICEF'8. Lancaster: Technomic Publishing Company (en prensa).
- CHIRALT, A; FITO, P; BARAT, J.M.; ANDRÉS, A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.; ESCRICHE, I. y CAMACHO, M.M. (2000). *Use of vacuum impregnation in food salting process*. Journal of Food Engineering, 49 (2001) 141-151.
- DEMIRBAS, A. 2005. *Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass*. Energy Sources 27: 327-333.
- Directiva 2003/30/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 8 de mayo de 2003 relativa al fomento del uso de biocarburantes u otros combustibles renovables en el transporte.
- DUFF, S. J. B., y MURRAY, W. D. (1996). *Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review*. Bioresource Technology, 55:1-33.
- 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 Phenomena during vacuum Treatments in solid porous food-liquids systems*. Journal of Food Engineering, 27: 229-240
- GARCÍA, F. J. y PRIMO, E. (1989). *Alcohol de biomasa III: Hidrólisis de la fracción lignocelulósica obtenida de residuos agrícolas y cosechas de sorgo*. Revista Agroquímica Tecnología Alimentos, 29 (4):501-509.
- GARCIA, J.L. (2015). *Residuos agroalimentarios I.3*, en: *Volumen 3 de residuo a recurso: Recursos orgánicos*. Ediciones Paraninfo. ISBN 8484767027. 344pp
- GOULA, A. y LAZARIDES, H. (2015). *Integrated processes can turn industrial food waste valuable food by-products and/or ingredients: The cases of olive mil and pomegranate wastes*. Journal of Food Engineering, 167: 45-50.
- 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 fin 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.
- LAUREANO-PEREZ, L.; TEYMOURI, F.; ALIZADEH, H. y DALE, B.E. (2005). *Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass*. Appl. Biochem. Biotechnol. 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.

- MARTINEZ, N.; ANDRÉS, A. M.; CHIRALT, A. y FITO, P. (1998). El mecanismo hidrodinámico en alimentos porosos: Termodinámica y cinética de sistemas alimento entorno. Editorial UPV, Valencia, 319-341.
- MOSIER, N., WYMAN, C., DALE, B., ELANDER, R., HOLTZAPPLE, Y. Y. L.M., y LADISCH, M. (2005). *Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass*. *Bioresource Technol*, 96: 673-686.
- PEIJI, G., YINBO, Q., XIN, Z., MINGTIAN, Z., y YONGCHENG, D. (1997). *Screening microbial strain for improving the nutritional value of wheat and corn straws as animal feed*. *Enzyme and Microbial Technology*, 20:581-584.
- RESTREPO, A. M.; ARREDONDE, A.; MORALES, C.; TAMAYO, M.; BENAVIDES, Y. L.; BEDOYA, V. y VÉLEZ, C. (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. ISSN: 2256-3903.
- SÁEZ, R. (2015). *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. Universitat Politècnica de València
- SANCHEZ, Ó. J., y CARDONA, C. A. (2008). *Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks*. *Bioresource Technology*, 96:673-686.
- SARKAR, N., GHOSH, S. K., BANNERJEE, S., AIKAT. K. (2012). *Bioethanol production from agricultural wastes: an overview*. *Renewable energy*, 37: 19-27.
- 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.
- SUN, Y. y CHENG, J. (2002). *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review*. *Bioresource Technology*, 83: 1-11.
- ZHANG H.Y. y LYND L.R. (2004). *Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems*. *Biotechnology and Bioengineering*, 88: 797-779.