

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA

ALIMENTARIA

**PRETRATAMIENTO DE HIDRÓLISIS
HIDROTÉRMICA PARA LA
DEGRADACIÓN DE LOS
CARBOHIDRATOS COMPLEJOS DE
RESIDUOS DE FRUTAS PARA LA
OBTENCIÓN DE BIOETANOL**

TRABAJO FIN DE MASTER

POR

ITZIAR RODRÍGUEZ VALIENTE

JUNIO, 2016





Master en Biotecnología Alimentaria
Universidad de Oviedo
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España
Tel. 985106226. Fax 985103434. <http://www.unioviado.es/MBTA>



PROFESOR TUTOR:

Dr. D. Adriana Laca Pérez (Universidad de Oviedo)

CERTIFICA:

Que D. Itziar Rodríguez Valiente ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Master al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, 10ª promoción curso 2015-2016.

Oviedo, de 13 de junio 2016

D. Adriana Laca Pérez

VºBº

Manuel Rendueles de la Vega

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

Agradecimientos...

A mi tutora, Adriana Laca, por su paciencia y comprensión durante la realización del trabajo, por la libertad que me ha dado, lo que ha hecho de este trabajo algo muy personal.

A Ana, por enseñarme todo lo que sabía, sugerirme mejoras en todo momento y ayudarme siempre que era necesario y a Amanda, por su ayuda incondicional.

A todos mis compañeros de clase, por enseñarme el valor del compañerismo y hacerme ver que hay gente buena en el mundo, que no tiene malas intenciones y que están ahí para lo que se les necesite.

A Fran, por estar siempre ahí, ayudándome con mis problemas de alzhéimer y enseñándome a mejorar cada día más gracias a sus críticas objetivas y constructivas. Por su paciencia, comprensión y su apoyo desde el primer momento.

Y por último, pero no menos importante, a mi familia, especialmente a mi madre, sin ella no hubiese sido imposible llegar hasta aquí. Quien ha sido mi gran ejemplo de superación y perseverancia. La persona que me ha enseñado que todo tiene solución y que si tienes un sueño, solo tienes que ir a por ello, el resto viene solo. Gracias.

ÍNDICE

RESUMEN	4
ABSTRACT	5
LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABLAS	8
1. INTRODUCCIÓN	9
2. GENERACIÓN DE RESIDUOS ALIMENTARIOS	12
2.1. Origen de los residuos.....	12
2.2. Cantidades generadas.....	14
3. APROVECHAMIENTO DE LOS RESIDUOS	17
3.1. Pretratamiento de los residuos	18
3.1.1. Pretratamientos físicos.....	19
3.1.2. Pretratamientos físico-químicos	21
3.1.3. Pretratamientos químicos	23
3.1.4. Pretratamientos biológicos	24
3.2. Hidrólisis de los residuos para su fermentación	25
3.2.1. Hidrólisis ácida.....	25
3.2.2. Hidrólisis básica	26
3.2.3. Hidrólisis enzimática	27
3.2.4. Hidrólisis hidrotérmica.....	28
3.3. Métodos de detoxificación.....	29
3.4. El proceso de fermentación.....	30
3.5. Productos obtenidos por fermentación	31
4. COMPOSICIÓN DE LOS RESIDUOS DE LA FRUTA.	39

4.1.	Composición del plátano	39
4.2.	Composición de la naranja.....	40
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	41
5.1.	Substratos utilizados y preparación de las muestras	41
5.2.	Tratamiento hidrotérmico	41
5.3.	Métodos analíticos	42
5.3.1.	Determinación del contenido en humedad	42
5.3.2.	Determinación de los azúcares reductores potenciales.....	43
5.3.3.	Determinación de los azúcares totales.....	44
5.3.4.	Determinación de los azúcares reductores.....	46
5.3.5.	Determinación del contenido en inhibidores	48
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
6.1.	Caracterización del material de partida.....	50
6.1.1.	Análisis de la humedad de las muestras analizadas.....	50
6.1.2.	Azúcares potenciales reductores.....	51
6.1.3.	Azúcares totales y reductores extraídos en fresco	53
6.2.	Azúcares extraídos tras el tratamiento de hidrólisis	56
6.2.1.	Tratamiento hidrotérmico a 120°C	57
6.2.2.	Tratamiento hidrotérmico a 128°C	59
6.2.3.	Tratamiento hidrotérmico a 135°C	61
6.2.4.	Comparación de los tratamientos a diferentes temperaturas	64
6.3.	Concentración de inhibidores tras el tratamiento de hidrólisis.....	69
6.3.1.	Ácido acético	69
6.3.2.	Furfural	70
6.3.3.	Hidroximetilfurfural	72
6.4.	Producción teórica de bioetanol.....	74

7. CONCLUSIONES.....	77
8. BIBLIOGRAFÍA.....	78

RESUMEN

La generación de residuos a nivel mundial, el empleo de fuentes de energía no renovables y los efectos que estos recursos tienen sobre el medio ambiente es un tema de gran actualidad y preocupación en todo el mundo. Por esta razón, se han desarrollado multitud de estudios que buscan la reutilización de los residuos generados por la actividad humana, para la obtención de nuevas fuentes de energía renovables, con un menor impacto medioambiental. Un ejemplo de estas fuentes de energía es el empleo de residuos agroalimentarios para la obtención de biocombustibles.

En este trabajo lo que se propone es el empleo de residuos de frutas, concretamente residuos de plátano y naranja, para la producción de bioetanol, un combustible renovable. Para ello se ensayó un pretratamiento hidrotérmico a distintas temperaturas, que permite hidrolizar los polisacáridos complejos en azúcares reductores, más accesibles para los microorganismos fermentadores.

El objetivo del trabajo es optimizar este pretratamiento de hidrólisis hidrotérmica, para obtener la mayor cantidad de azúcares reductores, a partir de la degradación de los polisacáridos complejos, como la celulosa, hemicelulosa y lignina, presentes en residuos de frutas. Asimismo, se ha analizado la formación de posibles inhibidores del proceso fermentativo y, finalmente, a partir de los resultados obtenidos de cada uno de los pretratamientos, se ha realizado una estimación de la cantidad de bioetanol que podría producirse a partir de los residuos empleados.

ABSTRACT

Waste generation worldwide, the use of non-renewable energy sources and the effects that these resources have on the environment is a topic of big importance and concern in the whole world nowadays. For this reason, there has been developed multitude of studies that look for the recycling of the residues generated by the human activity. The objective is to obtain new sources of renewable energy with lower environmental impact. An example of these residual sources of energy is the use of food waste to obtain biofuels.

This work proposes the employment of fruits wastes, specifically residues of banana and orange, for the production of bioethanol, a renewable fuel. With this aim, a hydrothermal pretreatment has been tested at different temperatures. This treatment hydrolyses the complex polysaccharides into reducing sugars, more accessible for the fermenting microorganisms.

The target of the work is to optimize this hydrothermal hydrolysis, to maximize the amount of reducing sugars, obtained from the degradation of the complex polysaccharides like cellulose, hemicellulose and lignin, contained in the fruit waste. Finally, with the results obtained for each of the assayed pretreatments, an estimation of the amount of bioethanol that could be obtained from the tested waste was calculated.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tipos de desperdicios alimentarios producidos a lo largo de la cadena de producción de alimentos (9).....	12
Figura 2: Parte de la producción inicial que se pierde o desperdicia en las diferentes etapas de la cadena de servicios de frutas y hortalizas en diferentes regiones (5).	13
Figura 3: Pérdidas y desperdicios de alimentos per cápita en las fases de consumo y anteriores al consumo en diferentes regiones (kg/año) (5).....	15
Figura 4: Residuos generados por sectores industriales. Año 2012 (7).....	15
Figura 5: Esquema del modo de acción del pretratamiento en los materiales lignocelulósicos (12).....	18
Figura 6: Secadero rotatorio de virutas de madera (83).	19
Figura 7: Molino de cuchillas (84).....	20
Figura 8: Equipo de generación de ultrasonidos (85).....	20
Figura 9: Línea de producción de microondas industrial (86).....	21
Figura 10: Esquema de un tipo de procedimiento seguido en el tratamiento de explosión por vapor.....	22
Figura 11: Esquema del proceso del pretratamiento con agua caliente (12).	23
Figura 12: Reacciones que ocurren durante la hidrólisis frutas (17).	26
Figura 13: Esquema general del proceso de producción de etanol vía enzimática (16).	27
Figura 14: Materias primas utilizadas para la producción de etanol (21).....	31
Figura 15: Muestras de plátano antes y después del tratamiento hidrotérmico.	42
Figura 16: Recta de calibrado del método fenol sulfúrico.....	44
Figura 17: Tubos con diferentes concentraciones de glucosa para la realización de la recta de calibrado.	45
Figura 18: Recta de calibrado del método del DNS.	47
Figura 19: Tubos con concentración creciente de glucosa para la realización de la recta de calibrado. ...	47
Figura 20: Recta de calibrado del Furfural a 260 nm.	49
Figura 21: Recta de calibrado del HMF a 285 nm.	49
Figura 22: Azúcares reductores potenciales obtenidos de cada una de las muestras.....	52
Figura 23: Cantidad de azúcares reductores potenciales, totales y reductores obtenidos de las muestras de cáscara de plátano (C.P.), pulpa de plátano (P.P.) y cáscara de naranja (C.N.) sin tratamiento térmico.	55
Figura 24: Contenido de azúcares totales y reductores de la pulpa de plátano (P.P.), la cáscara de plátano (C.P.) y la cáscara de naranja (C.N.) con y sin el tratamiento hidrotérmico a 120°C.	58
Figura 25: Contenido de azúcares totales y reductores de la pulpa de plátano (P.P.), la cáscara de plátano (C.P.) y cáscara de naranja (C.N.) en fresco y tras el tratamiento hidrotérmico a 128°C.	60
Figura 26: Contenido de azúcares totales y reductores de la pulpa del plátano (P.P.), la cáscara del plátano (C.P.) y cáscara de naranja (C.N.) en fresco y tras el tratamiento hidrotérmico a 135°C.	62
Figura 27: Representación de los azúcares potenciales y reductores de la cáscara de plátano sin tratamiento, a 120°C, a 128°C y a 135°C.	64
Figura 28: Representación de los azúcares potenciales y reductores de la pulpa de plátano sin tratamiento, a 120°C, a 128°C y a 135°C.	65

Figura 29: Representación de los azúcares potenciales y reductores de la cáscara de naranja sin tratamiento, a 120°C, a 128°C y a 135°C.	66
Figura 30: Variación del porcentaje de eficacia en función de la temperatura en las diferentes muestras analizadas.	67
Figura 31: Variación del porcentaje de extracción en función de la temperatura en las diferentes muestras analizadas.	68

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Residuos generados por sectores industriales. Año 2012 (7).	10
Tabla 2: Resumen de las referencias mencionadas en este apartado.	33
Tabla 3: Resumen de las referencias mencionadas en este apartado.	35
Tabla 4: Resumen de las referencias mencionadas en este apartado.	37
Tabla 5: Resumen de las referencias mencionadas en este apartado.	38
Tabla 6: Composición del plátano entero, de la pulpa y de la cáscara expresado	39
Tabla 7: Composición de la naranja entera y la cáscara de naranja.	40
Tabla 8: Peso inicial, final y humedad de las muestras de cáscara.	51
Tabla 9: Cantidad de azúcares reductores potenciales en las muestras analizadas referidos al peso seco del residuo inicial.	52
Tabla 10: Cantidad de azúcares totales y reductores extraídos de cada una de las muestras analizadas (referidos al peso seco de residuo inicial) y porcentaje de los azúcares reductores potenciales extraídos.	54
Tabla 11: Valores de pH de las muestras sin tratamiento hidrotérmico.	56
Tabla 12: Contenido de azúcares totales y reductores y su relación expresado en porcentaje de la pulpa del plátano, la cáscara del plátano y la cáscara de naranja tras el tratamiento hidrotérmico a 120°C.	57
Tabla 13: Porcentaje de eficacia y de extracción obtenida de las muestras tratadas a 120°C.	58
Tabla 14: Valores de pH de las muestras tratadas a 120°C.	59
Tabla 15: Contenido de azúcares totales y reductores y su relación expresado en porcentaje de la pulpa de plátano, la cáscara de plátano y la cáscara de naranja tras el tratamiento hidrotérmico a 128°C.	60
Tabla 16: Porcentaje de eficacia y de extracción obtenida de las muestras tratadas a 128°C.	61
Tabla 17: Valores de pH de las muestras tratadas a 128°C.	61
Tabla 18: Contenido de azúcares totales y reductores y su relación expresado en porcentaje de la pulpa de plátano, la cáscara de plátano y cáscara de naranja tras el tratamiento hidrotérmico a 135°C.	62
Tabla 19: Porcentaje de eficacia y de extracción obtenida de las muestras tratadas a 135°C.	63
Tabla 20: Valores de pH de las muestras tratadas a 135°C.	63
Tabla 21: Porcentaje de eficacia en las muestras sometidas a los diferentes tratamientos hidrotérmicos.	66
Tabla 22: Porcentaje de extracción en las muestras sometidas a los diferentes tratamientos hidrotérmicos.	67
Tabla 23: Tiempo de retención, área obtenida y concentración de furfural determinada por análisis mediante HPLC.	71
Tabla 24: Tiempo de retención, área obtenida y concentración de HMF obtenida del análisis mediante HPLC.	73
Tabla 25: Cantidad de azúcar y de etanol que se obtendría tras la fermentación.	75
Tabla 26: Concentración de azúcar y de etanol que se obtendría tras la fermentación.	75

1. INTRODUCCIÓN

La reducción de las reservas de combustibles fósiles, como el petróleo, junto con la contaminación que genera la combustión de dichas fuentes de energía y su contribución a la aparición de fenómenos medioambientales negativos, como el efecto invernadero, ha provocado que en los últimos años se plantee la generación de biocombustibles que permitan la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero (1).

Por otro lado, la actividad industrial genera una cantidad de residuos con incidencia en el entorno natural (aire, agua, suelo) (2). Se define “residuo industrial” como aquellos residuos resultantes de los procesos de fabricación, transformación, utilización, consumo, limpieza o de mantenimiento, generados por la actividad industrial, excluidas las emisiones a la atmósfera (3). Dichos residuos los podemos clasificar según su composición, en residuos orgánicos o inorgánicos (4).

Centrándonos en las industrias alimentarias, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) define “pérdidas de alimento” como la disminución de la masa alimentaria que afecta específicamente a los alimentos destinados al consumo humano. Estas pérdidas se producen en las etapas de producción, pos-cosecha, en el procesamiento de la cadena de suministro o por catástrofes naturales. Las pérdidas de alimentos que ocurren al final de la cadena de suministro de alimentos se conocen como “desperdicio de alimentos” y se define como el descarte evitable de alimentos aptos para el consumo, por parte del minorista o el consumidor (5). Las dos definiciones anteriores se engloban en el término “despilfarro de alimentos”, descrito como la pérdida de alimentos por descomposición o desaprovechamiento (6).

En la siguiente tabla, publicada por el Instituto Nacional de Estadística, puede observarse la producción de residuos industriales, expresado en miles de toneladas. Concretamente en la industria alimentaria, la producción de residuos es de 2.578,8 toneladas (7).

Tabla 1: Residuos generados por sectores industriales. Año 2012 (7).

Unidad: Miles de toneladas

CNAE 2009	Sector	No peligrosos	Peligrosos	Total
	Residuos generados	41.483,7	1.391,9	42.875,6
05-06-07-08-09	Industrias extractivas	22.506,1	3,1	22.509,1
10-11-12	Alimentación, bebidas y tabaco	2.566,9	11,8	2.578,8
13-14-15	Textil, confección, cuero y curtido	88,3	2,9	91,1
16	Madera y corcho	230,2	2,9	233,1
17-18	Papel, artes gráficas y reproducción de soportes grabados	1.677,0	17,8	1.694,8
19	Coquerías y refino de petróleo	69,5	66,9	136,4
20-21-22	Química y fabricación de productos de caucho y plásticos	615,7	414,0	1.029,7
23	Otros productos minerales no metálicos	3.140,6	14,5	3.155,2
24-25	Metalurgia y fabricación de productos metálicos	3.697,6	726,3	4.423,8
26-27-28-29-30	Productos informáticos, electrónicos, maquinaria y material de transporte	1.012,8	92,6	1.105,4
31-32-33	Muebles y otras industrias manufactureras. Reparación e instalación de maquinaria y equipo	132,0	13,8	145,8
35	Suministro de energía eléctrica, gas, vapor y aire acondicionado	5.747,1	25,4	5.772,5

Una alternativa para reducir la cantidad de residuos generados es su revaloración. Por ejemplo, los excedentes derivados de frutas durante el proceso agroindustrial son una materia prima de interés para su aprovechamiento, tanto por las cantidades que se generan como por la composición química que presentan. Este tipo de residuo es rico en componentes como el almidón, celulosa, hemicelulosa y lignina, lo que lo convierte en una buena fuente para la obtención de azúcares que pueden ser reutilizados de diferentes maneras (compostaje, alimentación animal, producción de biocombustibles, etc.). Esta revalorización presenta una doble ventaja: económica y ecológica, ya que se está disminuyendo la producción de residuos al tiempo que se obtiene un producto de valor añadido (8).

Para obtener los azúcares de estos residuos se necesita hidrolizar los polisacáridos a monómeros y esto se puede hacer de tres maneras, empleando compuestos químicos, utilizando enzimas o empleando un proceso de hidrólisis térmica donde se diluye el sustrato con agua y se somete a la acción del calor, sin necesidad de adicionar ningún reactivo (8).

El principal inconveniente de los procesos de hidrólisis es que se pueden generar algunos compuestos que actúan como inhibidores de una posterior fermentación, como el hidroximetilfurfural (HMF), que se genera por la deshidratación de las hexosas y el furfural, generado por la deshidratación de las pentosas. La generación de estos

componentes es función de las condiciones que se empleen durante el proceso (tiempo del proceso, concentración de la materia prima, temperatura, etc.) (8).

En este trabajo se van a ensayar varios pretratamientos de hidrólisis hidrotérmica, variando la temperatura del proceso y usando como sustrato la pulpa y la cáscara de plátano y la cáscara de la naranja. El objetivo es determinar cuál es el proceso más adecuado para la extracción de los azúcares simples, a partir de la hidrólisis térmica de los azúcares complejos, teniendo en cuenta tanto la cantidad de azúcares reductores producidos, como la economía del proceso y la posible formación de inhibidores del proceso fermentativo.

2. GENERACIÓN DE RESIDUOS ALIMENTARIOS

2.1. ORIGEN DE LOS RESIDUOS

Los alimentos pasan por diferentes etapas dentro de la cadena alimentaria. A lo largo de este proceso se produce una reducción de la cantidad de alimentos aprovechables, aunque no siempre se consideran un desperdicio de alimentos (por ejemplo, durante los procesos de transformación y preparación se desechan partes no comestibles de los alimentos como huesos, espinas, cáscaras...). Por el contrario, en los hogares generalmente se desechan productos comestibles que han caducado o se han estropeado por olvidar su consumo. Por lo tanto, en todas las etapas de la cadena alimentaria se producen desperdicios alimentarios, pero no en la misma cantidad ni el mismo tipo de desperdicios.



Figura 1: Tipos de desperdicios alimentarios producidos a lo largo de la cadena de producción de alimentos (9).

La generación de desechos también está relacionada con el grado de desarrollo de un país. En países con un mayor desarrollo económico, como es el caso de la mayoría de los países de la Unión Europea, el mayor desperdicio alimentario se produce en las últimas etapas de la cadena, es decir, en los hogares y los restaurantes. Sin embargo, en los países con un menor grado de desarrollo, el mayor desperdicio alimentario tiene lugar en las etapas iniciales. Esto se debe a que, en dichos países, poseen un menor desarrollo tecnológico, lo que provoca un déficit en las instalaciones e infraestructuras de las industrias, necesarias para una correcta transformación y conservación de los alimentos (9). En la figura número 1 se representan las diferentes etapas de la cadena de suministro y los tipos de desechos que se producen en cada una de ellas.

En la figura número 2 se representa el porcentaje de la producción inicial que se pierde o se desperdicia en las diferentes etapas de la cadena de suministros de frutas y hortalizas. Puede observarse que en las regiones más desarrolladas, la mayor pérdida se produce en el consumo, mientras que en las regiones con un menor desarrollo, las pérdidas son más acusadas en las etapas de distribución, procesamiento o pos-cosecha.

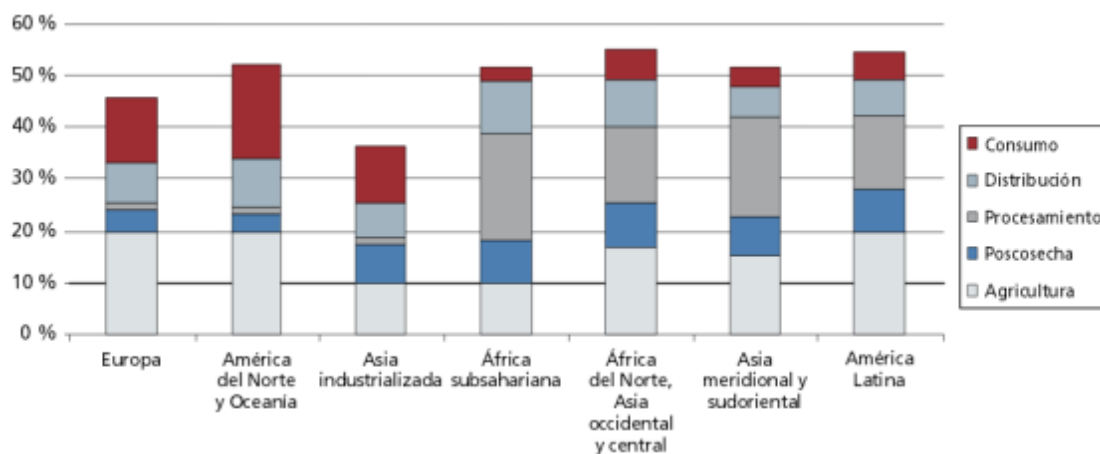


Figura 2: Parte de la producción inicial que se pierde o desperdicia en las diferentes etapas de la cadena de servicios de frutas y hortalizas en diferentes regiones (5).

Concretamente en Europa, según el estudio “Preparatory Study on Food waste across EU 27” realizado por BIO Intelligence Service, para la Comisión Europea, se estima que las pérdidas y el desperdicio de los alimentos alcanzan aproximadamente los 90 millones de toneladas de alimentos al año (179 kg per cápita), de los cuales (10):

- El 42% proviene de los hogares (el 60% es evitable).
- El 39% procede de los procesos de fabricación (la mayor parte se considera inevitable).

- El 5% proviene de la distribución.
- El 14% de los servicios de restauración y catering.

Este desperdicio de alimentos también provoca una pérdida de todos aquellos recursos empleados en su producción, transformación y distribución. Por ejemplo, en 2013, la FAO estimó que un 30% de toda la superficie agraria del planeta es desperdiciada, lo que se corresponde con unas 1.400 hectáreas y en cuya producción se emplean 250 km³ de agua. En cuanto a las emisiones de gases del efecto invernadero, el desperdicio de alimentos genera unos 3.300 millones de toneladas de CO₂. Por último, desde el punto de vista económico, esta actividad provoca una pérdida de unos 2.600 millones de dólares anuales (9).

La solución que se propone para la minimización de la producción de este tipo de residuos y los efectos negativos que producen se resume en “la regla de las 3 R”, que consiste en reducir, reutilizar o reciclar todos los residuos posibles que se generen para intentar minimizarlos al máximo. Para ello se necesitan iniciativas como el desarrollo de tecnologías limpias, la mejora del diseño de los procesos de producción, la sustitución de materiales por otros con un menor impacto medioambiental o que reduzcan la producción de residuos, la mejora de las operaciones de recogida y tratamiento de las sustancias de desecho o la concienciación e información a los consumidores, entre otras muchas iniciativas que se podrían llevar a cabo (11).

2.2. CANTIDADES GENERADAS

A continuación se hará una breve descripción de cuáles son las cantidades de residuos alimentarios generados a nivel mundial y, más concretamente, dentro de nuestro país.

➤ **Generación de residuos a nivel mundial:**

Según las estimaciones de la FAO (2011), anualmente se desaprovechan 1.300 millones de toneladas de alimentos, es decir, aproximadamente 1/3 de la producción mundial. Por otro lado, la Comisión Europea estima que en la Unión Europea se desperdician anualmente en torno a 89 millones de toneladas, de las cuales, 7,7 se producen en España (9).

En la figura número 3 se muestran las pérdidas per cápita de alimentos en diferentes zonas del mundo. Se puede observar que en Europa y América del Norte, se desechan entre 280-300 kg/año mientras que en África y Asia las pérdidas rondan los 120-170 kg/año. La cantidad de alimentos desperdiciados por los consumidores ronda los 100 kg/año en Europa y América del Norte, mientras que en África y Asia se encuentra en torno a 10 kg/año.

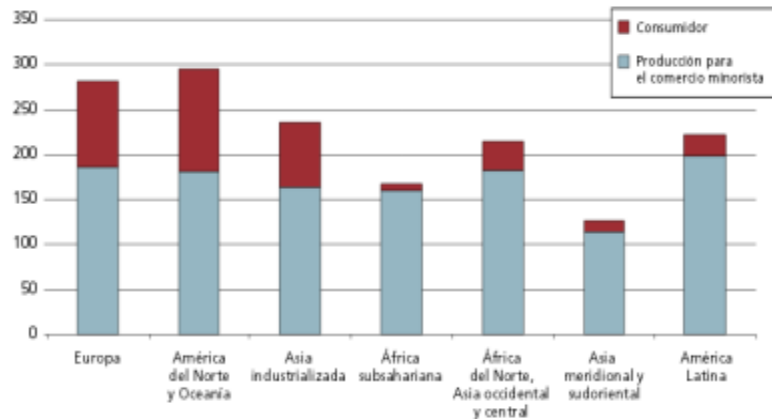


Figura 3: Pérdidas y desperdicios de alimentos per cápita en las fases de consumo y anteriores al consumo en diferentes regiones (kg/año) (5).

➤ Generación de residuos en España:

España es el séptimo país del mundo que más comida desperdicia en Europa (7,7 millones de toneladas), tras el Reino Unido, Alemania, Holanda, Francia, Polonia e Italia (10).



Figura 4: Residuos generados por sectores industriales. Año 2012 (7).

En la figura anterior puede observarse la producción de residuos industriales, expresado en miles de toneladas. Concretamente en la industria alimentaria, la producción de residuos es de 2.578,8 toneladas. Además dicho sector es el quinto mayor productor de residuos a nivel nacional (7).

En resumen, podemos observar que, tanto a nivel mundial como a nivel nacional, la producción de residuos es un problema de gran envergadura, al que hay que poner solución. Por esta razón, el estudio de nuevas fuentes de energía o el empleo de dichos residuos como una fuente de energía renovable es un tema de gran actualidad e interés en todo el mundo.

3. APROVECHAMIENTO DE LOS RESIDUOS

En los últimos años se han desarrollado multitud de estudios científicos que tienen como objetivo revalorizar los desechos industriales y de esta forma incrementar los ingresos de las empresas al tiempo que se reduce la cantidad de residuos generados. Concretamente en el sector de las frutas y hortalizas se están desarrollando estudios en los que se intentan emplear los restos de las frutas y vegetales como materia prima para otros procesos, tanto de tipo fermentativo como físico-químico.

Los residuos orgánicos pueden tener una composición muy variable. En cuanto al contenido de carbohidratos los podemos clasificar en tres grupos (12):

- a) **Material azucarado:** son ricos en carbohidratos simples, por lo que no se necesita una hidrólisis previa para su fermentación. Ejemplos de este tipo de material son los residuos de caña de azúcar, remolacha o frutas.
- b) **Material amiláceo:** tienen un contenido importante en almidón, un carbohidrato con una composición más compleja, por lo que resulta necesario aplicar una hidrólisis previa que rompa la molécula en carbohidratos más simples, con el objetivo de facilitar la fermentación por parte de los microorganismos. Ejemplos son residuos de tubérculos (como la patata) y cereales (como el trigo, maíz, cebada, centeno etc.).
- c) **Material lignocelulósico:** son aquellos con un alto contenido en celulosa, hemicelulosa y lignina. Al igual que en el caso del almidón son carbohidratos complejos que no pueden fermentarse directamente, por lo que tienen que sufrir un proceso de hidrólisis. En este grupo se encuentran, por ejemplo, los residuos agrícolas y forestales como el papel, la madera etc.

En la actualidad, los materiales azucarados y amiláceos son los más empleados en las industrias para su revalorización, ya que son los más sencillos de utilizar y los más estudiados. En cambio, la complejidad en la composición de los materiales lignocelulósicos hace que se encuentren todavía en fase de estudio como una potencial fuente de obtención de productos de valor añadido, como pueden ser los biocombustibles.

3.1. PRETRATAMIENTO DE LOS RESIDUOS

Esta etapa tiene como objetivo preparar la materia prima para alcanzar el máximo rendimiento en la etapa de producción y eliminar cualquier sustancia que pueda interferir en el proceso. Según las características del producto del que se parta el pretratamiento puede variar, pero las características principales que debe cumplir este pretratamiento son las siguientes (13):

- Aumentar el área superficial del material.
- Disminuir la presencia de sustancias que dificulten las etapas de hidrólisis y de fermentación.
- Reducir el grado de cristalización de la celulosa y disociar el complejo lignina-celulosa evitando, en la medida de lo posible, la degradación de los carbohidratos.
- Empleo de reactivos económicos y reutilizables.
- Aplicable a diversos tipos de productos.
- Consumo energético bajo.

Por su naturaleza, los pretratamientos se pueden dividir en cuatro grupos: físicos, físico-químicos, químicos y biológicos (14).

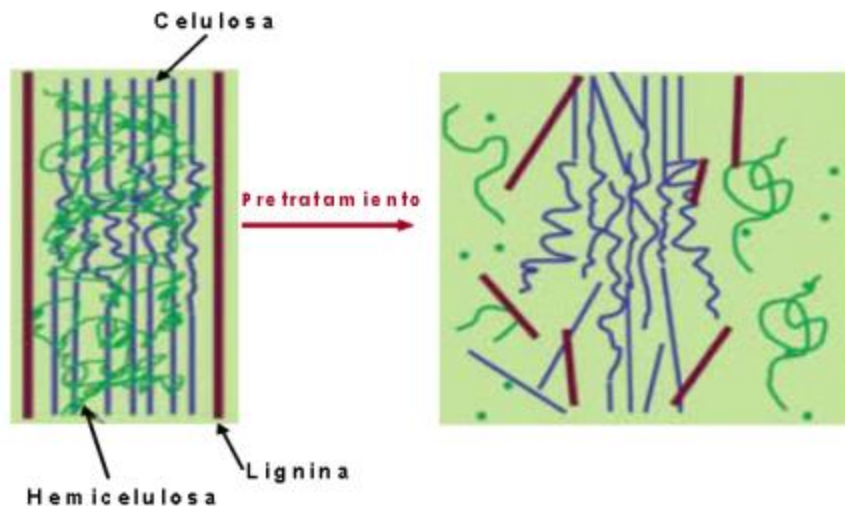


Figura 5: Esquema del modo de acción del pretratamiento en los materiales lignocelulósicos (12).

3.1.1. PRETRATAMIENTOS FÍSICOS

- **Secado:**

En esta primera etapa se elimina la mayor cantidad posible de agua, normalmente con aire caliente, aunque hay otros métodos, como la liofilización, pero son más costosos. Lo que se busca es preparar la materia para facilitar los procesos posteriores.

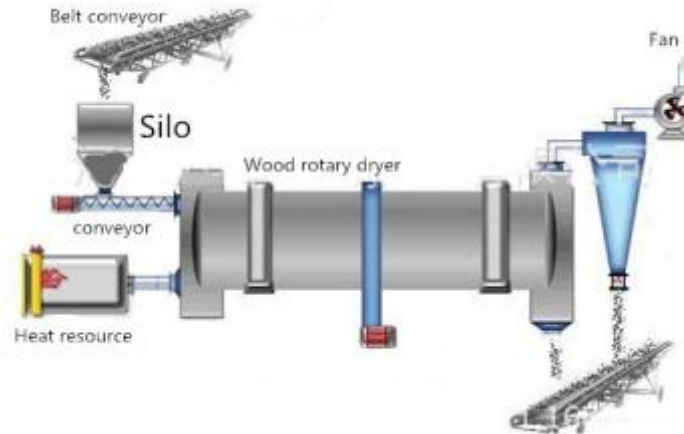


Figura 6: Secadero rotatorio de virutas de madera (83).

- **Trituración mecánica:**

Consiste en una combinación de astillado y molienda, lo que reduce el grado de cristalización de la celulosa, aumenta la superficie específica y la densidad aparente, facilitando el proceso de hidrólisis posterior. Existen diferentes tipos de molinos (molino de bolas, de martillo, cuchillas, rodillos) y también se emplean extrusores que calientan, mezclan y cortan el material, provocando cambios físicos y químicos en el material lignocelulósico. El principal inconveniente de esta etapa es su elevado consumo energético, lo que depende del tamaño final de partícula y del tipo de material (14).

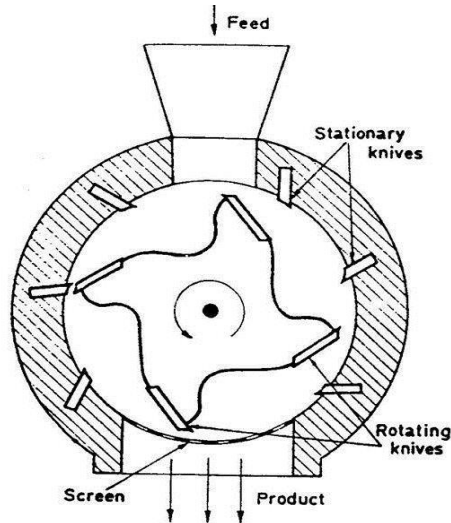


Figura 7: Molino de cuchillas (84).

- **Radiación de alta energía:**

Provoca una rotura de los enlaces β -glucosídicos y los enlaces entre la glucosa y la lignina. El mayor inconveniente es su difícil aplicación técnica debido a la baja densidad de los materiales y las altas dosis que se necesitan, lo que obliga al diseño de instalaciones complejas y con un coste elevado (12).

- **Ultrasonidos:**

Es una técnica empleada para extraer la lignina y la celulosa. Se lleva a cabo a temperatura ambiente y en periodos de tiempo variables, entre los 10 y 60 min. El principal inconveniente es que su efecto sobre la biomasa es muy superficial (15).



Figura 8: Equipo de generación de ultrasonidos (85).

- **Pretratamiento con microondas:**

Se basa en la acción de las microondas sobre el material lignocelulósico que se encuentra suspendido en una solución acuosa. Provoca la desestructuración de la biomasa por autohidrólisis, como consecuencia del efecto del calentamiento del agua que producen las microondas, lo que provoca la liberación de los grupos acetilos de las hemicelulosas. Se puede añadir un agente hidrolítico, ácidos o bases, para potenciar la degradación (12).



Figura 9: Línea de producción de microondas industrial (86).

3.1.2. PRETRATAMIENTOS FÍSICO-QUÍMICOS

- **Explosión con vapor:**

El material lignocelulósico se somete a temperaturas de 190-230°C, mediante la inyección directa de vapor saturado entre 1 y 10 minutos. Posteriormente se produce una rápida despresurización que provoca fuerzas de cizalladura. Se producen alteraciones físicas, como la ruptura de las fibras, y químicas, como la rotura de los enlaces. Durante el tratamiento se destruyen parcialmente los enlaces lignina-carbohidrato y se hace que la celulosa sea más accesible a la hidrólisis enzimática. La hemicelulosa se degrada parcialmente, dependiendo de las condiciones del tratamiento, y la lignina queda prácticamente inalterada. Este tratamiento es más útil en maderas duras con un menor contenido en lignina (15).

Las ventajas de este tratamiento son que se requiere un mayor tamaño de partícula, lo que reduce los costes de la molienda, y que no necesita catalizadores ácidos, lo que reduce los efectos medioambientales.

Entre sus limitaciones está la destrucción de parte de los xilanos de las hemicelulosas, la incompleta rotura de la matriz lignina-carbohidrato y la generación de compuestos que pueden resultar tóxicos para los microorganismos de la etapa de fermentación. Para evitarlo, el material debe ser lavado con agua para eliminar las sustancias inhibitoras.

Otras variables de este pretratamiento son: la explosión por vapor con amoníaco, consiguiendo una menor producción de sustancias inhibitoras, y la explosión con CO₂, que presenta una mayor tasa de hidrólisis de los carbohidratos, no se producen sustancias inhibitoras y presenta un menor coste económico (12).

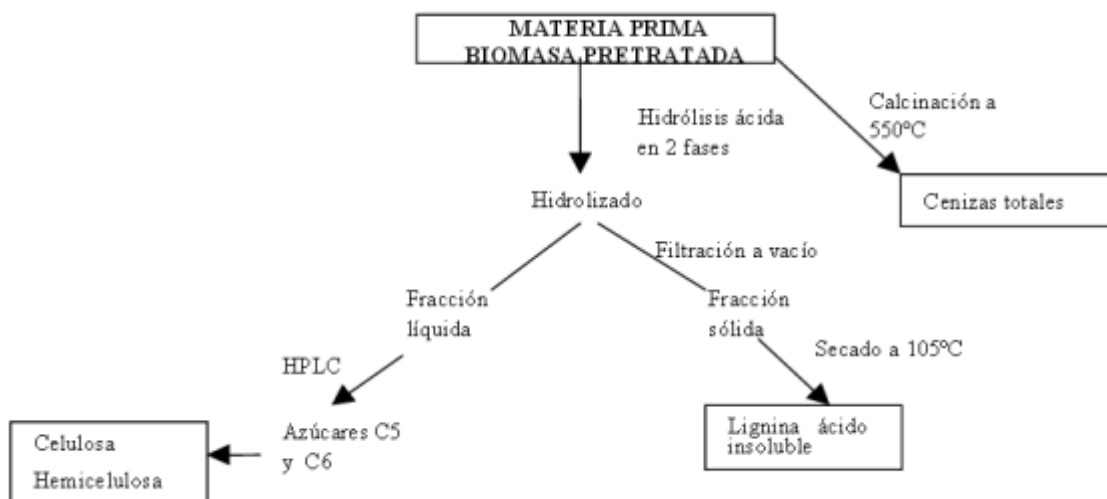


Figura 10: Esquema de un tipo de procedimiento seguido en el tratamiento de explosión por vapor (15).

- **Tratamiento con agua caliente en fase líquida:**

Consiste en someter a la biomasa a la acción de agua caliente (en torno a 160-240°C) durante un tiempo en un reactor a presión. Provoca la rotura de la estructura del material y la descomposición de los polisacáridos en monosacáridos. Consigue la recuperación de la mayoría de las pentosas y no se producen sustancias inhibitoras de los procesos de fermentación.

Las principales variables que afectan a este tipo de tratamiento son: la temperatura del proceso, el tiempo de residencia y la cantidad de materia prima introducida en el reactor. El control del pH durante el pretratamiento es un factor a tener en cuenta ya que, para minimizar la degradación de los monómeros, se deberían mantener unos valores por encima de 4. De no ser así, se produciría una degradación de los monómeros y se formarían compuestos inhibitorios no deseados (12).

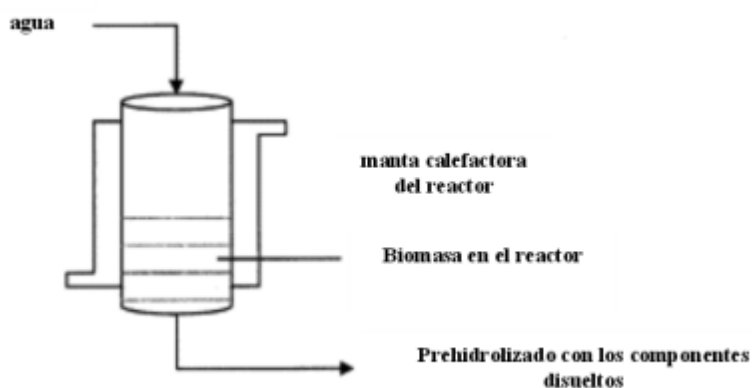


Figura 11: Esquema del proceso del pretratamiento con agua caliente (12).

3.1.3. PRETRATAMIENTOS QUÍMICOS

Consisten en una solubilización de la fracción de lignina y una modificación de la estructura de la celulosa, con el objetivo de facilitar la acción de las enzimas.

- **Oxidación húmeda:**

El material lignocelulósico se somete a la acción de agua a una elevada temperatura (160-180°C) en presencia de una sustancia oxidante, como el oxígeno o el peróxido de hidrógeno, añadido a sobrepresión en el reactor. Se provoca la rotura de los enlaces estructurales y se obtiene una fracción sólida rica en celulosa y una fracción líquida rica en azúcares hemicelulósicos. Este tratamiento presenta la ventaja de que no genera productos de degradación como el furfural o el hidroximetilfurfural (HMF) (12).

- **Tratamientos con ozono:**

Esta degradación se limita fundamentalmente a la lignina ya que la hemicelulosa es poco atacada y la celulosa apenas se ve afectada. Las ventajas que se plantean son la

efectiva degradación de la lignina, la no producción de productos tóxicos que afecten a los procesos posteriores y la simplicidad del tratamiento, ya que se realiza a temperatura ambiente y presiones atmosféricas. El inconveniente del proceso es el elevado coste por el empleo de una gran cantidad de ozono (12).

- **Hidrólisis con álcalis:**

El tratamiento con hidróxido de sodio (NaOH) diluido produce un hinchamiento de la biomasa, lo que conduce a un aumento del área superficial interna, un descenso de la cristalinidad, una separación de las uniones estructurales entre la lignina y los carbohidratos y una rotura de la estructura de la lignina. La efectividad de este tratamiento depende del contenido en lignina, ya que en biomasa con un contenido en lignina superior al 26%, la efectividad disminuye (14).

- **Tratamiento con organosolventes:**

Se emplea una mezcla de solventes orgánicos o acuosos junto con un catalizador ácido (clorhídrico o sulfúrico) para romper los enlaces internos de la lignina y la hemicelulosa. Algunos de los solventes orgánicos que se pueden emplear son el metanol, etanol, acetona y el etilenglicol. También se pueden emplear ácidos orgánicos como el oxálico, acetilsalicílico y salicílico. Los solventes empleados se reciclan con el objetivo de reducir costes y evitar problemas en las etapas de fermentación (14).

3.1.4. PRETRATAMIENTOS BIOLÓGICOS

Este tratamiento consiste en someter el material lignocelulósico a la acción de determinados microorganismos. El objetivo es conseguir la degradación de la lignina y la hemicelulosa, haciéndolas más accesibles al ataque enzimático. Las ventajas del tratamiento biológico son las bajas necesidades energéticas y las suaves condiciones ambientales en las que se produce el proceso. El principal inconveniente es la gran cantidad de tiempo que se necesita, ya que es un proceso lento. Además, estos microorganismos presentan actividad celulolítica, consumiendo la celulosa preferentemente a la lignina (12).

3.2. HIDRÓLISIS DE LOS RESIDUOS PARA SU FERMENTACIÓN

Esta segunda etapa por la que pasa la biomasa complementa la etapa de pretratamiento, rompiendo los carbohidratos complejos en azúcares simples con el objetivo de aumentar la accesibilidad de los microorganismos en la fase de fermentación. La hidrólisis completa de celulosa da exclusivamente el monómero D-glucosa, mientras que, a partir de las hemicelulosas se obtienen un conjunto de pentosas y hexosas como la manosa, glucosa, xilosa etc. Esta etapa es imprescindible para materiales lignocelulósicos y amiláceos y se puede llevar a cabo mediante catálisis química, enzimática o hidrotérmica, aunque existen otros métodos menos utilizados y poco estudiados como la irradiación gamma y la utilización de microondas, entre otros (16).

3.2.1. HIDRÓLISIS ÁCIDA

Es un proceso químico que emplea catalizadores ácidos para transformar las cadenas de polisacáridos que contiene la biomasa (hemicelulosa y celulosa) en sus monómeros elementales. Este tipo de hidrólisis utiliza diferentes clases de ácidos: sulfuroso, clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico y fórmico y a nivel industrial los ácidos clorhídrico y sulfúrico. Los métodos industriales de hidrólisis ácida se pueden dividir en dos grupos: los que emplean ácidos concentrados y trabajan a bajas temperaturas (170-190°C) y que requieren un mayor tiempo de operación y los que utilizan ácidos diluidos a temperaturas más altas (190-240°C) y tiempos de reacción entre 6-12 segundos (15).

La principal reacción que se produce es la hidrólisis de la hemicelulosa, produciendo monómeros, como el furfural, hidroximetilfurfural (HMF) y otros productos. La lignina sufre una condensación y precipita (15).

En la figura siguiente se representan las diferentes reacciones que se producen durante la hidrólisis de frutas y que dan lugar a compuestos inhibidores de la fermentación como el ácido acético, furfural, HMF, ácido fórmico o ácido levulínico.

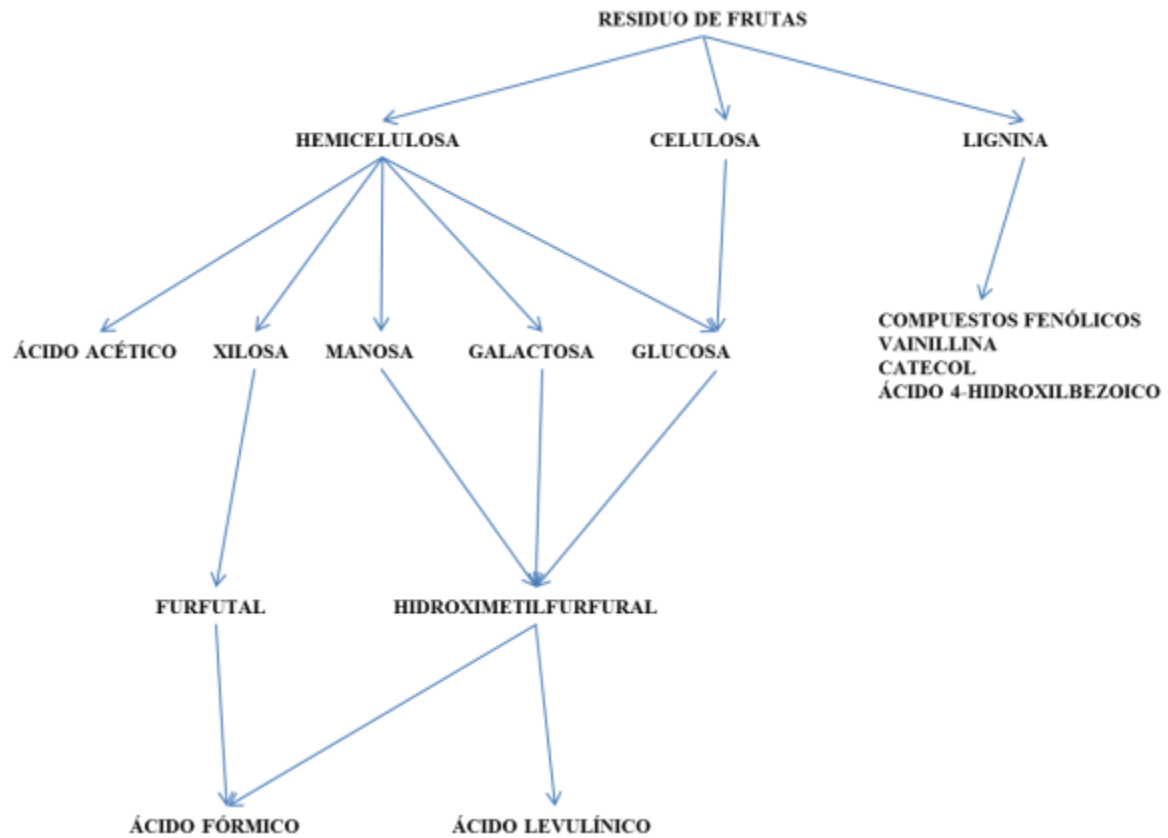


Figura 12: Reacciones que ocurren durante la hidrólisis frutas (17).

La principal ventaja de este tipo de hidrólisis es el bajo tiempo de reacción necesario. En cambio, el principal inconveniente de este tipo de hidrólisis es la formación de subproductos como el HMF o el furfural, resultado de una degradación excesiva de los azúcares y que inhiben los procesos de fermentación y la actividad enzimática. Además puede provocar la corrosión de los equipos empleados, lo que aumenta los costes de equipamiento necesitando una etapa de neutralización final y los productos finales pueden causar toxicidad.

3.2.2. *HIDRÓLISIS BÁSICA*

Se lleva a cabo tratando el material con una base diluida donde se sumerge el material lignocelulósico, a unos 60°C durante unas 24 horas. Entre las bases que más se emplean se encuentran los hidróxidos de sodio, potasio, calcio y amonio. Las disoluciones de álcalis fuertes dan lugar a hidrólisis alcalinas, degradación y descomposición de polisacáridos y rotura de radicales finales (15).

Dicho tratamiento suele ser de utilidad como pretratamiento del material lignocelulósico, antes de una hidrólisis enzimática. Esto se debe a que la acción del NaOH logra solubilizar parcialmente la lignina, mediante reacciones de solvatación y saponificación, produciendo un hinchamiento de la biomasa, lo que conlleva un aumento del área superficial interna y un descenso del grado de cristalización de la celulosa, aumentando su accesibilidad frente a la acción de enzimas y bacterias (18).

3.2.3. *HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA*

En la hidrólisis enzimática, los enzimas son sustancias altamente específicas que degradan determinados enlaces de moléculas concretas. Se utilizan las celulasas para la degradación de la celulosa y amiloglucosidasas y amilasas, de forma conjunta, para la degradación del almidón. La hidrólisis se lleva a cabo en condiciones suaves (pH 4.5, 50°C y agitación suave) (16).

Esta hidrólisis presenta ventajas frente a la hidrólisis química, como que no provoca la corrosión de los materiales, menores costes de equipamiento, no se necesita el empleo de agentes químicos, no se producen compuestos inhibidores de la fermentación, se necesitan unos bajos consumos de enzimas y los hidrolizados obtenidos presentan una baja toxicidad, alcanzando un rendimiento cercano al 100% (16).

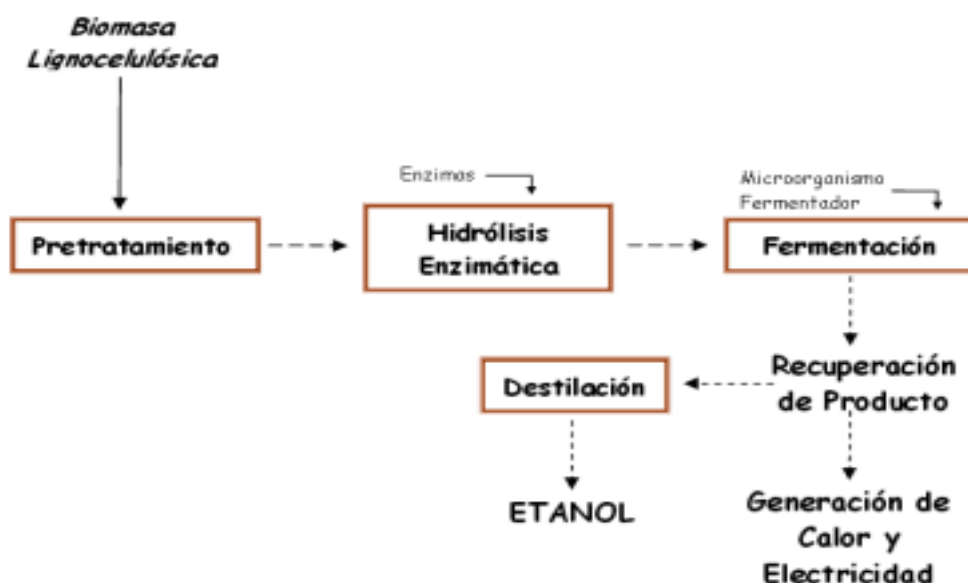


Figura 13: Esquema general del proceso de producción de etanol vía enzimática (16).

En cambio, la hidrólisis enzimática presenta ciertos inconvenientes. El principal son los largos tiempos de reacción, pudiendo necesitar varios días. Además los precios de las enzimas suelen ser más elevados que los de algunos compuestos químicos. Otra desventaja es que los productos finales que se obtienen de la hidrólisis enzimática, como disacáridos y monosacáridos, pueden dificultar la progresión de la hidrólisis (16).

3.2.4. HIDRÓLISIS HIDROTÉRMICA

Este tipo de hidrólisis consiste en mezclar la biomasa con agua y someterla a unas elevadas condiciones de presión y temperatura. Las condiciones de presión y temperatura, así como la relación entre la masa de material y el volumen de agua empleado, cambian el grado de degradación final de la materia. A nivel industrial, se emplea como pretratamiento una hidrólisis, normalmente enzimática.

Algunas cualidades del proceso de autohidrólisis frente a los procesos de hidrólisis empleando compuestos químicos son (8):

- Disminución del impacto ambiental por la ausencia de reactivos químicos distintos del agua y materiales vegetales.
- Obtención de bajas concentraciones de subproductos inhibidores de la fermentación, así como una menor cantidad de precipitados de lignina.
- Uso de pH moderados, lo que produce menores daños en los equipos y costes de neutralización y no se necesita un proceso de recuperación de ácidos.
- Buen rendimiento del proceso.
- Aprovechamiento fraccionado de los componentes, como la hemicelulosa, lignina, azúcares, celulosa etc.

Por el contrario, para alcanzar los niveles de hidrólisis deseados, se requieren unas condiciones de presión y temperatura muy elevadas, lo que encarece el tratamiento desde el punto de vista industrial. Además, con este tratamiento, al igual que en el caso de la hidrólisis ácida, se pueden obtener compuestos furánicos, como el furfural y el HMF, capaces de inhibir la fermentación llevada a cabo por las levaduras.

3.3. MÉTODOS DE DETOXIFICACIÓN

En algunos casos los pretratamientos aplicados a los substratos para conseguir su acondicionamiento e hidrólisis dan lugar a la formación de compuestos inhibitorios como el ácido acético, furfural o HMF. En estos casos la fermentación de residuos hidrolizados no detoxificados está caracterizada por una menor productividad y un rendimiento limitado, debido a la presencia de una gran variedad de estos componentes que actúan como inhibidores del metabolismo celular. Por lo tanto, cuando estos inhibidores alcanzan concentraciones suficientemente altas aparece la necesidad de emplear técnicas que eliminen la mayor parte de estos compuestos tóxicos en las muestras hidrolizadas como paso previo a la fermentación (19).

Se han empleado multitud de tecnologías para la eliminación de los compuestos inhibidores de los hidrolizados lignocelulósicos. Entre ellos destacan el tratamiento con carbón activado y las resinas de intercambio iónico. Con este tipo de tratamientos se ha logrado la disminución de un 51% de los furanos, un 41% de los compuestos fenólicos, con una pérdida de azúcares de un 8,7%, por lo que podemos considerar que estos tratamientos son muy efectivos y de gran utilidad (19).

Concretamente, los tratamientos con carbón activado o resinas de intercambio iónico, son capaces de retirar los inhibidores y pueden dar lugar a hidrolizados que muestren fermentaciones similares a aquellas realizadas en muestras libres de inhibidores. Por ejemplo, en estudios llevados a cabo en el bagazo de caña, previamente tratados con resinas de intercambio iónico, se eliminó el 84% del ácido acético presente y se alcanzaron rendimientos de etanol de 0,37 g/g, en comparación con los hidrolizados no detoxificados, cuyos rendimientos de etanol apenas llegaban al 0,27 g/g. Además, se ha visto que las resinas de intercambio iónico son más eficaces cuando se ajusta el pH de los hidrolizados a un valor en torno a 10, lo que reduce en un 26% la concentración de azúcares fermentables (19).

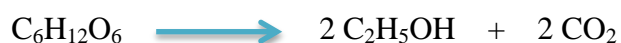
Por otra parte, el tratamiento con carbón activado no requiere ajustes de pH, pero su aplicación requiere mayores costes ya que el carbón activado en polvo no puede ser regenerado y el carbón activado granular generalmente provoca una pérdida del 10% durante cada ciclo de activación térmica (19).

Por último, cabe destacar que la detoxificación no es la única vía para minimizar la presencia de compuestos inhibidores en las muestras hidrolizadas de materias primas lignocelulósicas y amiláceas. También se pueden tener en cuenta otras estrategias como evitar la formación de inhibidores mediante la adecuada selección de los pretratamientos, implementar especies de microorganismos capaces de resistir la presencia de compuestos inhibidores o convertir estos compuestos tóxicos en productos que no interfieran con el metabolismo del microorganismo (19).

3.4. EL PROCESO DE FERMENTACIÓN

La hidrólisis permite obtener un medio rico en azúcares fermentables. La ruptura de la celulosa y de la hemicelulosa que provienen de los materiales lignocelulósicos tiene como resultado la obtención de hexosas y pentosas, mientras que la ruptura del almidón, produce exclusivamente hexosas (20). La fermentación es un proceso, en condiciones anaeróbicas o aerobias, en el que la materia orgánica sufre una degradación de la que se obtienen diversos productos. Los microorganismos empleados suelen ser levaduras o bacterias, que son capaces de producir enzimas, sustancias causantes de la degradación de la materia orgánica y obtener energía en forma de ATP (20).

Existen muchas clases de fermentaciones dependiendo del tipo de organismo que las produce, del sustrato o de las condiciones del proceso (como el pH, temperatura, actividad de agua, etc). Una de las más importantes y mejor conocidas es la fermentación alcohólica, la cual es una biorreacción que, bajo condiciones de anaerobiosis, degrada los azúcares simples en alcohol y dióxido de carbono.



Los principales microorganismos que llevan a cabo dicha reacción son las levaduras y concretamente, *Saccharomyces cerevisiae* es la especie de levadura empleada con mayor frecuencia. Este tipo de levaduras solamente fermentan hexosas y no son capaces de degradar las pentosas. Sin embargo, existen diversos estudios que han logrado la producción de biocombustibles empleando otros tipos de levaduras y algunas bacterias, como *Zymomona mobilis* (20) (21).

El éxito de una buena fermentación depende de la eficacia del tratamiento preliminar, es decir, la concentración de azúcar, el pH y la temperatura de la materia que se quiera fermentar. A nivel industrial, se busca aumentar la eficiencia de los biorreactores con el fin de obtener mejores resultados en cuanto a sus productos, empleando sistemas de control de todas las variables que puedan afectar a la eficiencia del proceso (20) (21).

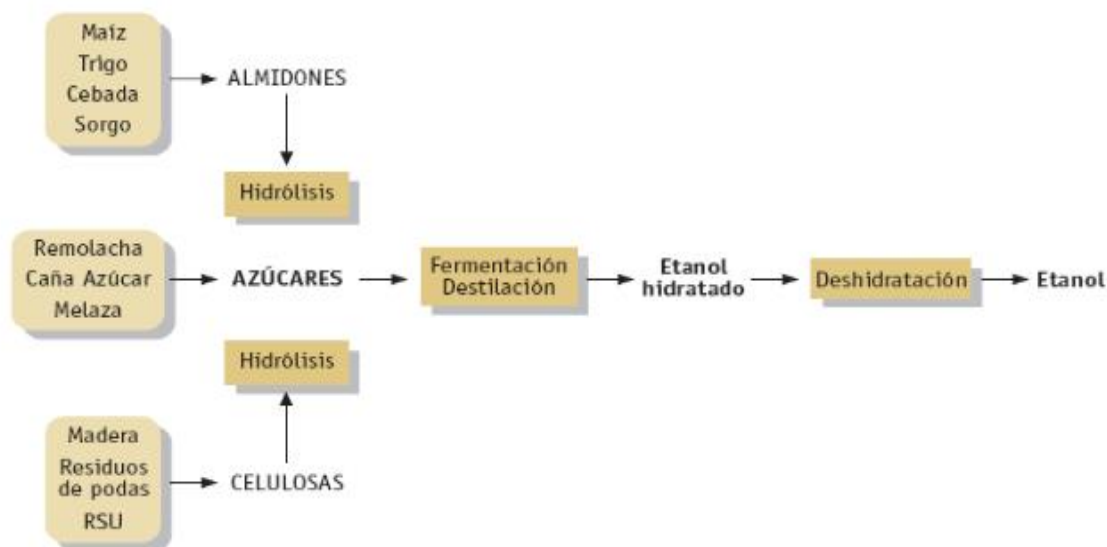


Figura 14: Materias primas utilizadas para la producción de etanol (21).

3.5. PRODUCTOS OBTENIDOS POR FERMENTACIÓN

Los biocombustibles son una fuente de energía renovable líquida, sólida o gaseosa que se obtienen a partir de materia orgánica vegetal o animal, denominada biomasa y pueden emplearse solos o mezclados con otros tipos de combustibles (1). La revalorización de la biomasa vegetal para la obtención de combustibles podría mejorar la situación energética a nivel mundial, con una gran repercusión en el medio ambiente y en la sociedad. Las ventajas obtenidas serían las siguientes (22):

- El uso de biocombustibles como fuente de energía renovable provoca una reducción del consumo de combustibles fósiles, responsables de la generación de gases del efecto invernadero.
- Evitan el agotamiento de las fuentes de energía no renovables.
- Se producen a partir de cultivos agrícolas, que sí son fuentes renovables de energía.

- Pueden obtenerse a partir de los cultivos propios de una región, permitiendo la producción de biocombustibles a nivel local, lo que reduciría gastos de transporte.
- Permiten la disposición de combustible independientemente de las políticas de importación y las fluctuaciones en el precio del petróleo.
- Producen una menor cantidad de emisiones nocivas para los seres vivos y el planeta.

A continuación se resumen los principales biocombustibles y productos revalorizados obtenidos a partir del aprovechamiento de los residuos de frutas y verduras.

- **Bioetanol:**

El bioetanol se obtiene a partir de la fermentación de azúcares simples, seguido de una etapa de destilación y purificación. Se puede producir a partir de residuos orgánicos, cuyos hidratos de carbono son fermentados a etanol por levaduras del género *Saccharomyces* (22).

Existen estudios en cuanto a la obtención de bioetanol a partir de paja de arroz, empleando diferentes pretratamientos, seguidos de una sacarificación con las celulasas producidas por *Trichoderma reesei* y finalmente una fermentación con *S.cerevisiae*. Se consiguieron concentraciones de etanol de 10 g/L (23). Otro proceso desarrollado para la obtención de etanol se llevó a cabo a partir de la paja de trigo y del tallo del plátano, mediante un pretratamiento de hidrólisis química, combinado con hongos del género *Pleurotus* y una hidrólisis enzimática (24). También se llevaron a cabo hidrólisis enzimáticas, empleando células del *Trichoderma reesei*, y una hidrólisis ácida con ácido sulfúrico al 5%, para demostrar que ambos tratamientos eran de utilidad para la degradación de lignocelulosa en glucosa a partir de residuos como paja de arroz, plátano y mazorca de maíz. Posteriormente se vio que el producto obtenido de la hidrólisis era adecuado para la producción de etanol mediante una fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* (25). La obtención de bioetanol a partir de lignocelulosa extraída de residuos de plátano también se ha conseguido empleando como pretratamiento una hidrólisis térmica seguida de una sacarificación de la lignocelulosa, empleando un kit enzimático (26). Otros pretratamientos que se analizaron fueron de tipo alcalino, en autoclave, empleando microondas o con ultrasonidos (27). En otro estudio se analizaron cuatro rutas de producción de etanol diferentes: hidrólisis ácida de material amiláceo (pulpa del

plátano) y una hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos (flor, tallo y la piel del plátano). Aunque los mejores resultados se obtuvieron a partir del material amiláceo, los análisis mostraron que ambos procesos pueden considerarse energéticamente factibles (28).

Por otra parte, se ha demostrado que *S.cerevisiae* es una de las levaduras con las que mejores resultados se obtiene en la producción de etanol a partir de cáscara de naranja, previa hidrólisis enzimática, alcanzo concentraciones de hasta 40 g/L (29). También se vio que al aumentar el pH hasta un valor de 6, la actividad de la levadura mejoraba (30). Además, determinadas cepas de *Candida parapsilosis* también presentaron buenos resultados (31). En la Universidad Central de Florida se ha desarrollado un proceso de producción de etanol a partir de diferentes residuos, como las cáscaras de naranja y los periódicos usados, y una mezcla de más de diez enzimas obtenidas a partir de la modificación genética de bacterias como *Escherichia coli* y hongos (32). En otro trabajo se estudió la producción de etanol a partir de restos de naranja, patatas y yuca, empleando cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* en discontinuo. Con los residuos de naranja fueron con los que se obtuvieron los mejores resultados (33).

A continuación se expone una tabla que resume los aspectos más importantes de cada estudio.

Tabla 2: Resumen de las referencias mencionadas en este apartado.

Tipo de residuo	Tratamiento	Microorganismo	Datos de producción	Referencia
Paja de arroz	Sacarificación de celulasas	<i>T. reesei</i> <i>S.cerevisiae</i>	10 g/L	(23)
Paja de trigo y tallo de plátano	Hidrólisis química y enzimática	<i>Pleurotus</i>	3,38 g/L	(24)
Paja de arroz, plátano y mazorca de maíz	Hidrólisis ácida y enzimática	<i>Trichoderma reesei</i> <i>S.cerevisiae</i>	9 g/L	(25)
Plátano	Hidrólisis térmica y sacarificación	<i>S.cerevisiae</i>	3 g/L	(26)
	Microondas y ultrasonidos			(27)
	Hidrólisis ácida y enzimática			(28)
Cáscara de naranja	Hidrólisis enzimática	<i>S.cerevisiae</i> <i>Candida parapsilosis</i> <i>E.coli</i> y hongos	40,9 g/L	(29) (30) (31) (32)

- **Biobutanol:**

Este combustible se obtiene mediante la denominada fermentación ABE (acetona-butanol-etanol) a partir de materiales amiláceos, utilizando bacterias del género *Clostridium*. Presenta ciertas ventajas respecto al bioetanol ya que no es corrosivo y puede mezclarse con gasolinas en mayor proporción sin necesidad de modificar los motores. Además, el biobutanol tiene una menor presión de vapor y una mayor tolerancia a la presencia de agua en las mezclas con las gasolinas, facilitando su uso dentro de los actuales canales de distribución (34).

Son muchos los posibles substratos a partir de los que se puede obtener este producto. En un estudio realizado se obtenía bioetanol a partir de la biomasa de sauces. El tratamiento consistía en una hidrólisis ácida y una fermentación ABE utilizando como microorganismo fermentador *Clostridium beijerinckii*. Como conclusión se vio que la corteza, aunque tenía una menor cantidad de polisacáridos, daba mejores resultados en el proceso de hidrólisis y se generaban menos sustancias inhibidoras que en el caso del tallo (35).

La paja de arroz y el bagazo de caña de azúcar son dos substratos que también se emplearon para la producción de biobutanol empleando un pretratamiento alcalino, una hidrólisis enzimática y finalmente una fermentación ABE. La producción de butanol fue mayor en el caso de la paja de arroz, alcanzando una concentración de 2,29 g/L (36). En otro trabajo la paja de arroz se sometió a un pretratamiento ácido, seguido de una hidrólisis enzimática y una fermentación ABE empleando la bacteria *Clostridium sporogenes* BE01. Se observó un aumento en la producción de butanol al suplementar el medio con 4,5 g/L de carbonato cálcico y 1,5 g/L de extracto de levadura (37).

La torta residual que queda tras la extracción del aceite de palma también se ha empleado como sustrato para la obtención de biobutanol. Para ello se realizó una hidrólisis con ácido nítrico, seguido de una detoxificación con carbón activado y una fermentación empleando la bacteria *Clostridium beijerinckii* (38). Se ha visto que la producción de butanol aumentaba al aplicar un tratamiento de hidrólisis empleado hidróxido de sodio al 10% y ácido sulfúrico al 0,5% de manera conjunta y aplicando una temperatura de 121°C durante 60 minutos. El uso combinado de estos dos compuestos durante el proceso de hidrólisis disminuye el contenido de lignina,

umentando la concentración de celulosa. Seguidamente se hizo una detoxificación con carbón activado y finalmente se compararon dos tipos de fermentaciones ABE, una empleando solo *Clostridium acetobutylicum* y en la otra una mezcla de *C. acetobutylicum* y *Bacillus cellulolyticus*. Aunque el cultivo mixto no mejoró la producción de butanol, se disminuyó la cantidad de subproductos no deseados (39).

Tabla 3: Resumen de las referencias mencionadas en este apartado.

Tipo de residuo	Tratamiento	Microorganismo	Concentración de biobutanol	Referencia
Sauce	Hidrólisis ácida y fermentación ABE	<i>Clostridium beijerinckii</i>	4,5 g/L	(35)
Paja de arroz y bagazo de caña de azúcar	Pretratamiento alcalino, hidrólisis enzimática y fermentación ABE	<i>Clostridium spp.</i> <i>Pseudomonas spp.</i>	2,29 g/L	(36)
Paja de arroz	Pretratamiento ácido, hidrólisis enzimática y fermentación ABE	<i>Clostridium sporogenes</i>	5,52 g/L	(37)
Torta de palma	Hidrólisis, detoxificación y fermentación	<i>Clostridium beijerinckii</i>	6,94 g/L	(38)
Torta de palma	Hidrólisis, detoxificación y fermentación	<i>C. acetobutylicum</i> <i>Bacillus cellulolyticus</i>	4 g/L	(39)

- **Biogás:**

El biogás se obtiene por descomposición de la materia orgánica, animal o vegetal, en ausencia de oxígeno y a través de la acción de varios tipos de bacterias (hidrolíticas, acetogénicas, homoacetogénicas, metanogénicas). El biogás que se obtiene está compuesto mayoritariamente de metano (50-75%) y dióxidos de carbono (25-45%), entre otros componentes como vapor de agua, monóxido de carbono, nitrógeno, hidrógeno, sulfuro de hidrógeno y oxígeno en concentraciones que rondan el 1%. Dicho producto se emplea para generar energía eléctrica o mecánica mediante combustión (22) (40).

Las características a tener en cuenta en un residuo o mezcla de residuos para su valorización energética en forma de biogás son (41):

- Sólidos totales: la digestión de residuos agroindustriales se realiza habitualmente por debajo del 15% de sólidos totales.
- Sólidos volátiles: el porcentaje de sólidos volátiles suele variar entre el 70-95%.
- Balance C/N: la relación carbono/nitrógeno de un residuo puede variar de un 6 a más de 500, aunque para una degradación óptima se recomienda entre 20-25.

- Potencial máximo de producción de biogás y producción real: el potencial máximo puede variar desde 0,15-0,90 m³ de biogás/kg SV.
- Materiales no deseables: pueden crear problemas de separación de fases. Se trata de materiales que pueden acompañar a los residuos como pajas, piedras, plásticos...
- Sustancias inhibidoras: son compuestos que, o bien están presentes en el residuo, o bien se forman durante el proceso de producción del combustible. Son sustancias que disminuyen el rendimiento o incluso pueden desestabilizar el proceso. Son por ejemplo, los ácidos grasos volátiles, amonio, ácido sulfúrico, ácidos grasos de cadena larga, pesticidas, desinfectantes o antibióticos, entre otros.

Se estudió la capacidad de producción de biogás a partir de residuos orgánicos de los mercados. El tratamiento empleado consistía en aplicar unas condiciones de temperatura y pH concretas, empleando enzimas que degradaban los componentes de los residuos vegetales, como el almidón y la celulosa (glucoamilasa y celulasas). Por cada kilogramo de residuo tratado se obtuvieron 4 litros de biogás. (42) Por otra parte, Wijandari y col. hicieron un pretratamiento en cáscaras de naranja con hexano para eliminar la limonina, ya que se vio que dicho compuesto disminuía la producción de metano a partir de esta materia prima. Se consiguió una producción de 217 L de metano/kg de sólidos volátiles (43).

En un trabajo realizado por Pei y col. se estudió el efecto del pretratamiento con hidróxido sódico sobre los residuos de plátano, en unas condiciones de temperatura, tiempo y concentración determinadas, concluyendo que se ejercía un efecto positivo sobre la producción de biogás (44). Otro estudio similar analizó la biodegradabilidad de residuos de plátano, mango y papaya, la producción de metano y el comportamiento de poblaciones de eubacterias y arqueobacterias durante la digestión anaerobia. La mayor producción de metano se observó en la digestión anaerobia del residuo de plátano (45).

En la tabla que se expone a continuación se resumen los aspectos más importantes de los artículos citados en este apartado.

Tabla 4: Resumen de las referencias mencionadas en este apartado.

Tipo de residuo	Tratamiento	Microorganismo	Datos de producción	Referencia
Residuos de mercados	Digestión enzimática	Población mixta	4 L CH ₄ /kg de residuo	(42)
Cáscara naranja	Digestión anaerobia semicontinua	Población mixta	217 L CH ₄ /kg S.V.	(43)
Plátano	Tratamiento con NaOH	Población mixta	463 L CH ₄ /kg de fruta	(44)
Plátano, mango y papaya	Digestión anaerobia	eubacterias y arqueobacterias	63,89 ml CH ₄ /g DBO	(45)

- **Biodiesel:**

El biodiesel es un éster que puede producirse a partir de aceites vegetales vírgenes o usados como la soja, colza y girasol entre otros y también a partir de grasas animales. Su elaboración se basa en la reacción de trans-esterificación de los glicéridos, utilizando catalizadores. El biodiesel tiene una cantidad de energía similar al diesel de petróleo pero es un combustible más limpio (22).

- **Compost:**

El compostaje es un proceso biológico termofílico en el que la materia orgánica se descompone por la acción de una gran cantidad de microorganismos como bacterias, hongos, protozoos o ácaros. Estos microorganismos llevan a cabo un proceso de descomposición oxidativa de los compuestos orgánicos transformándolos en otros más simples, bajo condiciones de temperatura, humedad y aireación controladas. El producto final obtenido de un proceso de compostaje se denomina compost y posee un importante contenido en materia orgánica y nutrientes, pudiendo aprovecharse como abono orgánico o como substrato (46).

Se obtuvo compost a partir de residuos orgánicos de los mercados empleando unas condiciones de temperatura y pH concretas y enzimas que degradaban los carbohidratos complejos de los residuos vegetales, como el almidón y la celulosa (42). En un trabajo realizado sobre el compostaje de residuos de cítricos, con el fin de obtener fertilizantes orgánicos libres de patógenos y sustancias fitotóxicas, el rendimiento obtenido fue de un 40% en peso (base seca) (47). Otra materia prima con la que se hizo un estudio similar fueron los restos de los plátanos (48). Por otra parte, se ha podido observar que los residuos de plátanos, tras un proceso de incineración, resultan ser una muy buena fuente de minerales para la producción de compost (49). La producción de compost a partir de

residuos de plátano también se ha podido realizar a partir de tratamientos de compostaje aeróbico y anaeróbico, con la adicción de diferentes inóculos microbianos (50).

En la tabla siguiente se exponen, resumidamente, los principales aspectos de los artículos anteriores.

Tabla 5: Resumen de las referencias mencionadas en este apartado.

Tipo de residuo	Tratamiento	Referencia
Residuos de mercados	Compostaje enzimático	(42)
Cítricos	Compostaje aireado	(47)
Plátanos	Compostaje aireado	(48)
Plátano	Incineración y compostaje	(49)
Plátano	Compostaje aeróbico y anaeróbico	(50)

4. COMPOSICIÓN DE LOS RESIDUOS DE LA FRUTA

A continuación se va a describir la composición del plátano y la naranja, con el objetivo de conocer cuáles son sus componentes principales susceptibles de ser convertidos en azúcares fermentables.

4.1. COMPOSICIÓN DEL PLÁTANO

En las tablas que se exponen a continuación se detallan la composición de la cáscara y de la pulpa del plátano.

Tabla 6: Composición del plátano entero, de la pulpa y de la cáscara expresado en peso seco (excepto la humedad) (51) (52) (53) (54).

COMPONENTE	PULPA DE PLÁTANO (% m.s.)	CÁSCARA DE PLÁTANO (% m.s.)
Humedad	75	90
Carbohidratos	80	60
Fibra	-	13
Grasa	1,2	2
Proteína	12	6,5
Cenizas	2,5	13

Podemos observar que la cáscara presenta una mayor humedad que la pulpa. En la fracción seca predominan los carbohidratos y, dentro de éstos, el azúcar reductor predominante es la sacarosa (10%), seguido de la glucosa (3%) y la fructosa (2,2%). Este aspecto es interesante ya que los azúcares reductores van a ser la principal fuente de energía durante la etapa de fermentación. Otros tipos de carbohidratos son el almidón (8,5%) y la fibra, compuestos que no pueden fermentarse de manera directa. Dentro de la fibra predomina la hemicelulosa (4,4%), seguido de la lignina (4,2%) y la celulosa (4%) (55) (28) (49) (56).

4.2. COMPOSICIÓN DE LA NARANJA

De la misma manera que en el apartado anterior, en la tablas que se exponen a continuación se puede observar la composición de la naranja.

En la siguiente tabla de este apartado se representa la composición de la naranja entera y de la cáscara de naranja.

Tabla 7: Composición de la naranja entera y la cáscara de naranja referido a peso seco (excepto la humedad) (57).

COMPONENTE	NARANJA ENTERA (% m.s.)	CÁSCARA DE NARANJA (% m.s.)
Humedad	85	90
Carbohidratos	70	63
Fibra	20	13
Proteínas	6.5	6
Grasas	1.5	4
Cenizas	1	7

Podemos observar que la naranja es muy rica en carbohidratos. Dentro de la fibra, se encuentra la hemicelulosa (18%) y celulosa (12%), que junto a la lignina (1,7%), son compuestos que no pueden fermentarse directamente por los microorganismos y necesitan una hidrólisis para su transformación en azúcares reductores. La elevada concentración en hidratos de carbono hace de este residuo una fuente de energía muy interesante para la obtención de biocombustibles. Sin embargo, al contrario que en la composición general de la fruta, en la cáscara predomina la fibra insoluble (48%), por lo que se necesitará un tratamiento de hidrólisis más complejo con el fin de solubilizar e hidrolizar esta fibra (58)(59).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se van a describir los materiales, métodos de hidrólisis y de análisis empleados en la realización de este trabajo.

5.1. SUBSTRATOS UTILIZADOS Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Los substratos utilizados fueron la pulpa del plátano, la cáscara del plátano y la cáscara de la naranja. Estos productos se obtuvieron de supermercados y hasta su utilización fueron almacenados en nevera.

Para la preparación de las muestras se pesaban 20 gramos de substrato, se trituraban hasta conseguir una pasta, utilizando una batidora convencional, y se añadía 20 ml de agua destilada (proporción sólido:líquido (S:L) 1:1). No se tuvo en cuenta la cantidad de agua que presentaban las muestras. Posteriormente estas muestras sufrían el tratamiento correspondiente o bien se separaba la fracción líquida de la sólida mediante el empleo de un colador, seguido de una etapa de centrifugación para conseguir las muestras “en fresco” (sin tratamiento térmico), que se mantendrían congeladas hasta su análisis. Además hay que mencionar que en el caso de las muestras de plátano los análisis se hicieron por triplicado y en las muestras de cáscara de naranja, se hicieron duplicados.

5.2. TRATAMIENTO HIDROTÉRMICO

Las muestras trituradas y diluidas con agua destilada en proporción S:L 1:1 se introducían en botellas de cristal de 250 ml de capacidad que a su vez se introducían en el autoclave a una temperatura determinada (120, 128 y 135°C) durante 5 minutos. A continuación las muestras se colaban y centrifugaban (4°C, 10.000 xg y 25 minutos) con el fin de separar la fracción líquida, que se conservó en congelación hasta su posterior análisis.

El tratamiento fue idéntico al realizado a las muestras “en fresco” (sin hidrolizar), con la única diferencia del tratamiento en el autoclave. Además, mencionar que todos los

tratamientos se realizaron por triplicado, partiendo de diferentes muestras de plátanos y naranjas.



Figura 15: Muestras de plátano antes y después del tratamiento hidrotérmico.

5.3. MÉTODOS ANALÍTICOS

Los métodos analíticos que se emplearon en este estudio fueron dos: método del Fenol-Sulfúrico, para la determinación de los azúcares totales, y el método del reactivo DNS, para la determinación de los azúcares reductores. Además de estos dos análisis, se utilizó un equipo de HPLC para identificar y cuantificar la cantidad de sustancias inhibidoras de la fermentación (ácido acético, furfural, HMF, etc.).

Mencionar que todas las muestras obtenidas se analizaron por triplicado.

5.3.1. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN HUMEDAD

El procedimiento de este método consistía en pesar una cantidad exacta de muestra, entre 0,5 y 2 gramos que después se introducían en una estufa a 60 ° C durante 48 horas. Pasado ese tiempo las muestras se dejaban enfriar en un desecador y se volvían a pesar. Finalmente se calculó la humedad mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{M.I. - M.S.}{M.I.} \times 100$$

Siendo:

- M.I. la masa inicial o húmeda de la muestra (en gramos).
- M.S. la masa final de la muestra seca (en gramos).

5.3.2. DETERMINACIÓN DE LOS AZÚCARES REDUCTORES POTENCIALES

Se siguió el método descrito por Lenihan y col. (60) que consiste en someter las muestras a unas condiciones extremas de presión y temperatura, con el objetivo de determinar cuál es la máxima concentración de azúcares reductores que somos capaces de obtener. A partir del valor obtenido, se puede determinar cuál es la cantidad de azúcares reductores que hemos extraído con el tratamiento de hidrólisis.

Para ello se siguieron los pasos detallados a continuación:

- Trocear 0,3 gramos exactos de muestra.
- Introducir la muestra en un tubo de ensayo de 10 ml de capacidad.
- Añadir 3 ml de ácido sulfúrico al 85%.
- Introducir los tubos cerrados en un baño a 30°C, durante 2 horas, agitando cada 10 minutos.
- Introducir la disolución en una botella de vidrio de 250 ml y llevar con agua destilada hasta un peso de 89,11 gramos.
- Introducir la botella en el autoclave a una temperatura de 121°C durante 1 hora.
- Ajustar el pH con sosa 6 N hasta un valor de pH entre 6-7.
- Filtrar.

Al igual que en los tratamientos hidrotérmicos, las muestras obtenidas se guardaron en el congelador hasta el momento de ser analizadas para determinar su contenido en azúcares reductores.

5.3.3. DETERMINACIÓN DE LOS AZÚCARES TOTALES

El método fenol-sulfúrico es un método de amplia utilidad para la determinación de la concentración total de hidratos de carbono en disoluciones acuosas. El principio teórico sobre el que se basa este método es que los carbohidratos, cuando se deshidratan por acción del ácido sulfúrico concentrado, producen derivados del furfural. Estos derivados del furfural, al reaccionar con el fenol, generan un color detectable (61).

El método consiste en los siguientes pasos:

- A 1 ml de muestra se le añade 0,5 ml de una disolución acuosa de fenol al 5%.
- Se añaden 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado y se agita vigorosamente.
- Se deja reposar una hora hasta que se forme el color y se enfríe, ya que la reacción es altamente exotérmica.
- Se mide la absorbancia a 492 nm en el espectrofotómetro.

Para poder determinar cuál es la concentración de carbohidratos se debe realizar una curva de calibración, en la que se represente la absorbancia en función de la concentración. La curva patrón se construye con concentraciones crecientes de glucosa, entre los 0 y los 100 ppm (mg/L), siguiendo el mismo método que para el análisis de las muestras. Para el blanco se emplea agua destilada (61).

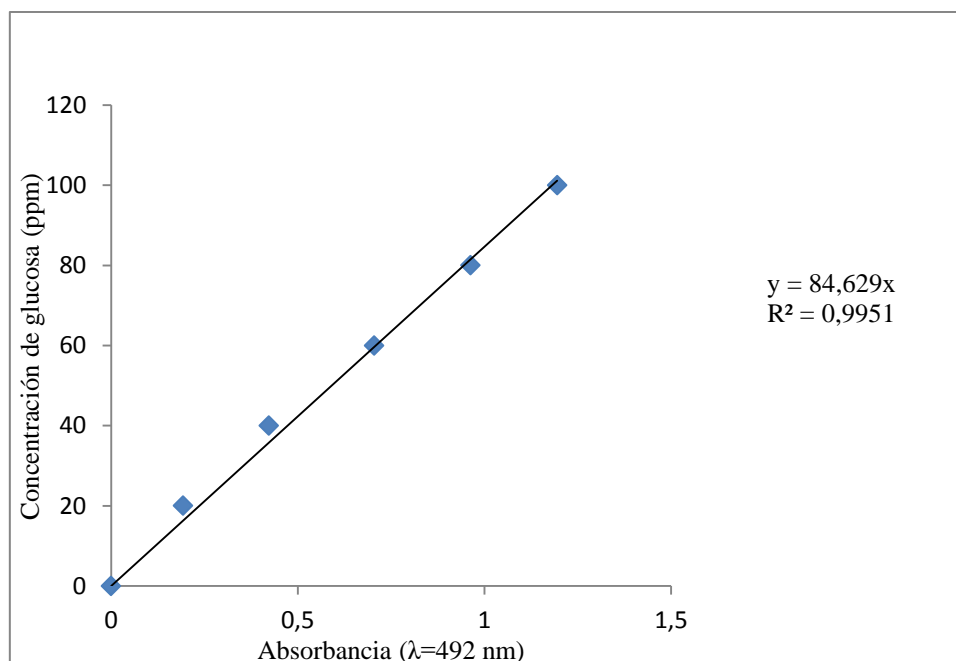


Figura 16: Recta de calibrado del método fenol sulfúrico.

En la figura que se representa a continuación puede verse como va cambiando la coloración de la muestra a medida que aumenta la concentración de glucosa.



Figura 17: Tubos con diferentes concentraciones de glucosa para la realización de la recta de calibrado.

Por último, para calcular la concentración de azúcares totales en la muestra inicial (mg azúcares/g residuo), partiendo de una absorbancia conocida, se utiliza la siguiente ecuación:

$$\text{azúcares totales} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = a \times \text{ABS} \times F \times \frac{V_f}{m_i}$$

Siendo:

- a: pendiente de la recta de calibrado, en la cual el eje de ordenadas es la concentración en ppm (mg/L) y en abscisas se representa la absorbancia.
- ABS: absorbancia medida.
- F: factor de dilución.
- V_f : volumen final que se tiene de la muestra diluida, una vez que ha sufrido el tratamiento.
- m_i : cantidad de muestra en seco (g), calculada a partir de la muestra pesada inicialmente y el contenido en humedad medido (peso inicial x humedad).

5.3.4. DETERMINACIÓN DE LOS AZÚCARES REDUCTORES

El método del reactivo DNS se utiliza para determinar la concentración de azúcares reductores en una muestra. El fundamento teórico en el que se basa es que el ácido 3,5-dinitrosalicílico puede ser reducido, en determinadas condiciones, por dichos azúcares. En esta reacción se desarrolla un cambio de color que puede ser medido (62) (63).

El método consta de los siguientes pasos:

- a) Se mezclan 0,5 ml de muestra con 0,5 ml del reactivo DNS.
- b) Esta mezcla se calienta a ebullición en baño maría durante 5 minutos en tubos cerrados de 10 ml.
- c) Rápidamente, se detiene la reacción con un baño de agua y hielo, también durante 5 minutos.
- d) Se reconstituyen las muestras con 5 ml de agua destilada, se agitan y se dejan reposar 15 minutos.
- e) Se mide la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro.

PREPARACIÓN DE REACTIVO DNS:

Para la preparación del reactivo se mezclan 0,8 gramos de NaOH, 15 gramos de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado y 0,5 gramos de ácido- 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Una vez pesados todos los compuestos, se introducen en un vaso de precipitados de 50 ml, se añade agua destilada, sin llegar al total del volumen del vaso, y se deja agitando entre 6 y 8 horas antes de enrasar finalmente a 50 ml en un matraz aforado.

El reactivo debe conservarse a 4°C, protegido de la luz. El reactivo DNS no puede conservarse durante más de dos o tres semanas.

Al igual que en el método del fenol, para determinar la concentración de azúcares, es necesario realizar una curva de calibración, utilizando la glucosa como patrón. En esta curva se representa la absorbancia en función de la concentración de glucosa y se preparan concentraciones crecientes de glucosa desde 0 a 1000 ppm (mg/L), aplicando el mismo método que para la obtención de las muestras. En este caso también se emplea el agua destilada para la preparación de los blancos.

Una vez que se ha obtenido la curva de calibrado, se puede calcular la concentración de azúcares reductores en la muestra inicial, a partir de un valor de absorbancia conocido, utilizando la misma ecuación que para los cálculos de los azúcares en el método del fenol.

En las siguientes imágenes se puede observar la curva patrón y los tubos que contienen los patrones, a partir de los cuales se llevó a cabo dicha curva, con un cambio de color creciente debido al aumento de la concentración de glucosa.

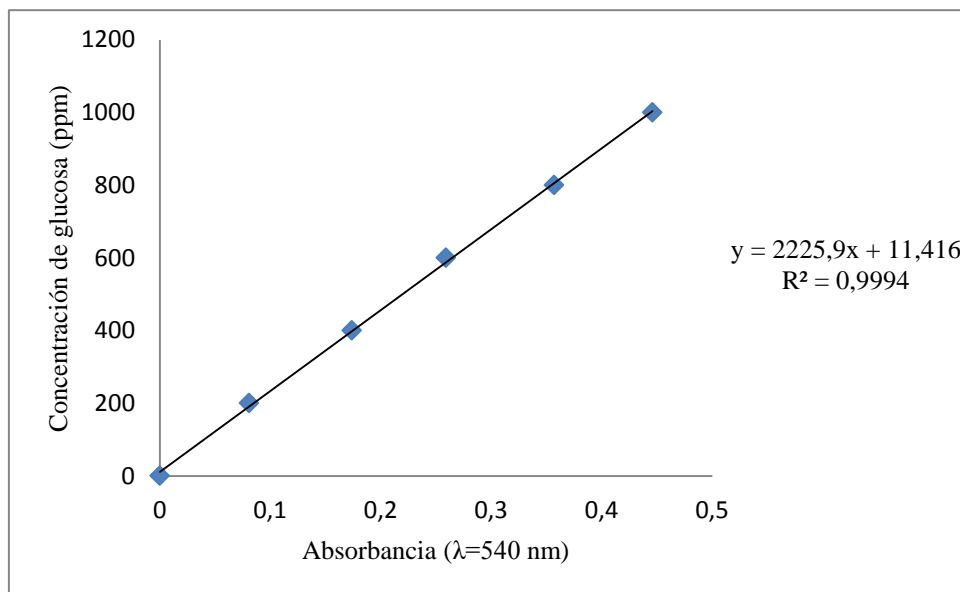


Figura 18: Recta de calibrado del método del DNS.

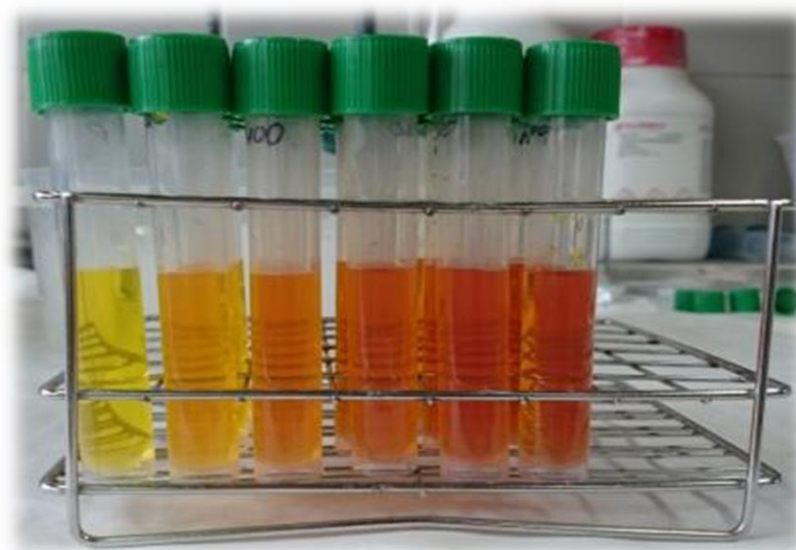


Figura 19: Tubos con concentración creciente de glucosa para la realización de la recta de calibrado.

5.3.5. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN INHIBIDORES

Como ya se ha mencionado anteriormente en el trabajo, el tratamiento a elevada presión y temperatura sobre materiales ricos en hidratos de carbono complejos (lignina, celulosa, hemicelulosa, etc.) puede provocar la síntesis de compuestos que provocan la inhibición de la fermentación. Los principales inhibidores son el ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural (HMF).

La concentración de estos compuestos se analizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Para determinar la concentración de ácido acético se empleó una columna ICsep ICE-ION-300 (Agilent Technologies 1200) y un detector de índice de refracción (RID). La fase móvil empleada fue ácido sulfúrico (0,450 mM, pH 3,1) con un caudal de 0,3 ml/min y con una temperatura de la columna de 75°C (64).

Para la determinación del furfural y el HMF, se modificó el método de Gomis y col. (1991), empleando una columna Géminis-NX 5 µm C18 110^a (Phenomenex) y un detector de haz de diodos (DAD). La fase móvil empleada fue acetonitrilo/agua (10:90) para el furfural y metanol/agua (10:90) para el HMF, con un flujo de 1 ml/min y la detección final de la señal UV se hizo a 260 nm para el furfural y 285 nm para el HMF (65).

Los análisis y la adquisición de los datos se realizaron con el software ChemStation (Agilent). Todos los compuestos se determinaron empleando como patrones de referencia los estándares analíticos externos (Sigma-Aldrich).

A diferencia del ácido acético, que no fue detectado en ninguna muestra, el furfural y el HMF sí que se detectaron en algunas de las muestras analizadas. Para su cuantificación se emplearon las rectas de calibrado que se muestran en las figuras siguientes.

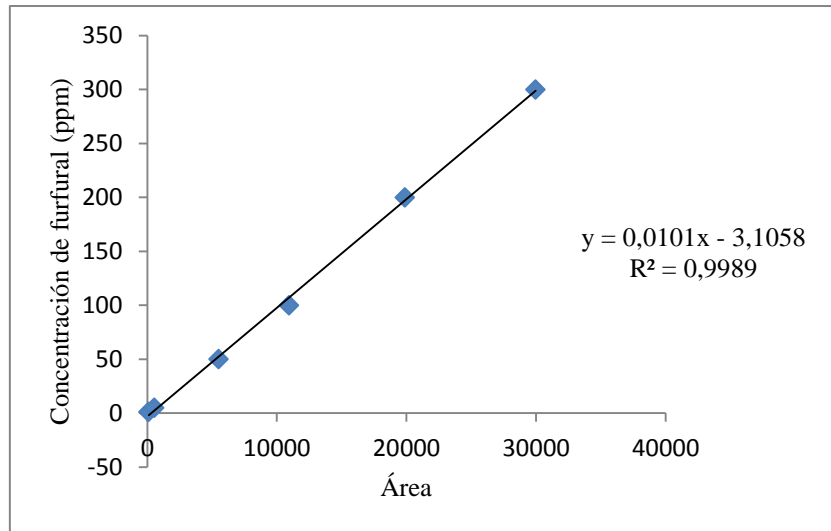


Figura 20: Recta de calibrado del Furfural a 260 nm.

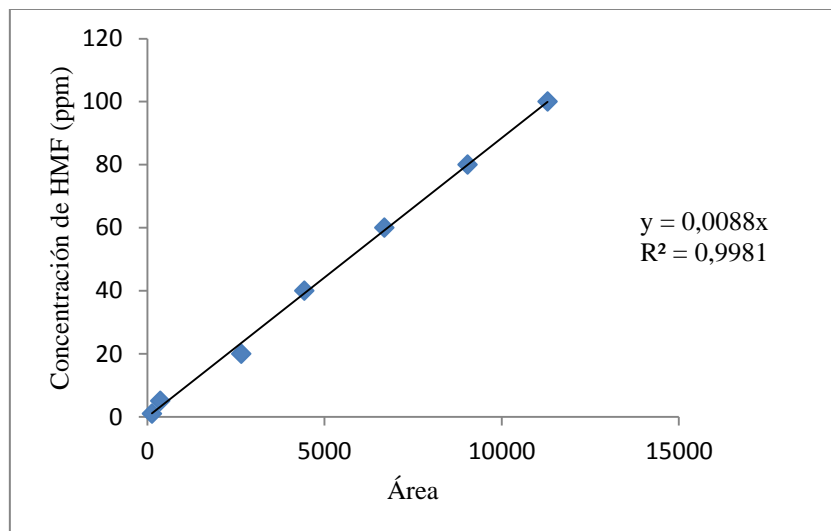


Figura 21: Recta de calibrado del HMF a 285 nm.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL DE PARTIDA

Los sustratos que se emplearon como material de partida para el desarrollo de los experimentos fueron residuos de plátano y naranja. Se eligieron estos sustratos frente a la gran variedad de frutas que podemos encontrar en el mercado porque están presentes en los puntos de venta durante todo el año, al no tratarse de frutas estacionales. En concreto, para los experimentos se empleó la pulpa del plátano, la cáscara del plátano y la de naranja, por tener un elevado contenido en carbohidratos complejos, que no pueden ser directamente fermentados y que, por esa razón, necesitan un proceso previo de hidrólisis para poder utilizarse en la obtención de bioetanol.

Cada vez que se procedió al desarrollo de un nuevo tratamiento de hidrólisis hidrotérmica, las muestras también se analizaron realizando un tratamiento en fresco, siguiendo el procedimiento indicado en el apartado 5.3.1. Posteriormente se midió la cantidad de azúcares totales y reductores, mediante los métodos de análisis indicados en el apartado 5.3. También se analizaron los azúcares reductores potenciales en los materiales de partida, con el objetivo de poder conocer la cantidad total de azúcares reductores que podríamos ser capaces de extraer y compararlos con la cantidad de azúcares reductores extraídos mediante el tratamiento de hidrólisis.

6.1.1. ANÁLISIS DE LA HUMEDAD DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS

En este apartado se van a recoger los resultados obtenidos del análisis de humedad de las muestras de cáscara y pulpa de plátano y cáscara de naranja. El contenido en humedad se analizó con el fin de poder expresar los resultados en relación al peso seco de las muestras iniciales. El procedimiento que se siguió para el análisis de la humedad, así como para el cálculo de los resultados, viene detallado en el apartado 5.3.1.

En la siguiente tabla se muestra los pesos iniciales y finales de las muestras analizadas, así como el porcentaje de humedad medido.

Tabla 8: Peso inicial, final y humedad de las muestras de cáscara y pulpa de plátano y cáscara de naranja.

Muestra		Peso húmedo (g)	Peso seco (g)	Humedad (%)	Humedad (%)
Cáscara de plátano	1	1,9	0,3	85	84,3 ± 2
	2	1,9	0,4	82	
	3	1,9	0,3	86	
Pulpa de plátano	1	2,1	0,4	82	79,2 ± 3,8
	2	2,1	0,4	80	
	3	2,2	0,6	75	
Cáscara de naranja	1	2,2	0,3	86	86 ± 0,3
	2	2,1	0,3	85	
	3	2,5	0,4	86	

Puede observarse que la cáscara de plátano y la cáscara de naranja presentan una mayor humedad que la pulpa de plátano. Además, los valores de humedad medidos, no difieren mucho de los indicados en el apartado 4 (75% para la pulpa plátano, 90% para la cáscara del plátano y 90% para la cáscara de naranja). Las posibles variaciones entre muestras pueden deberse a la heterogeneidad presente entre ellas y a factores como el grado de maduración, la manipulación o las condiciones de conservación que hayan podido sufrir.

6.1.2. AZÚCARES POTENCIALES REDUCTORES

En la siguiente tabla se recogen las cantidades de azúcares reductores potenciales obtenidos en cada una de las muestras analizadas. Se indican los resultados obtenidos para cada uno de los lotes de frutas empleados en los experimentos y los duplicados o triplicados realizados. El procedimiento empleado para la detección de los azúcares reductores potenciales se detalla en el apartado 5.3.2.

Tabla 9: Cantidad de azúcares reductores potenciales en las muestras analizadas referidos al peso seco del residuo inicial.

MUESTRA		AZÚCARES POTENCIALES (g azúcares/100g m.s.)			MEDIA DE AZÚCARES POTENCIALES (g azúcares/100g m.s.)
Cáscara de plátano	Tratamiento a 120°C	23,3	20,9	26,9	14,7
	Tratamiento a 128°C	13,5	9,7	9,9	
	Tratamiento a 135°C	7,9	12,01	8,8	
Pulpa de plátano	Tratamiento a 120°C	45,6	46,7	43,06	36,5
	Tratamiento a 128°C	25,6	29,7	31,7	
	Tratamiento a 135°C	32,7	35,3	38,1	
Cáscara de naranja	Tratamiento a 120°C	82,3	83,7		83
	Tratamiento a 128°C				
	Tratamiento a 135°C				

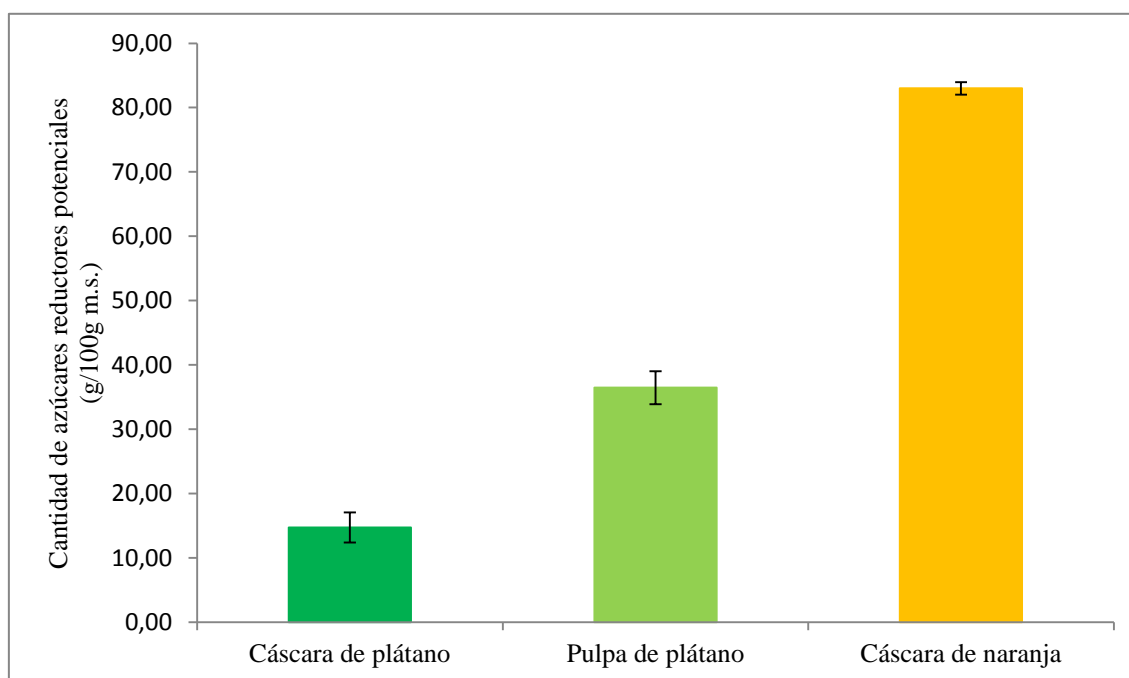


Figura 22: Azúcares reductores potenciales obtenidos de cada una de las muestras.

Como se puede ver en la figura anterior, la cáscara de naranja es la muestra de la que se ha extraído más azúcares reductores. La cantidad teórica de carbohidratos en la cáscara de naranja es de 76% (tabla 7) y la cantidad obtenida es de un 83%. De la misma forma, la cantidad teórica de carbohidratos presente en la cáscara de plátano es de un 73% (tabla 6) y la medida por este método es de un 15% y en cuanto a la pulpa del plátano, la

cantidad teórica de carbohidratos es de un 80% (tabla 6) frente al 36% alcanzado con el método empleado en este trabajo. Las diferencias entre los valores teóricos y los obtenidos al medir los azúcares reductores potenciales experimentalmente se deben a que el método empleado no es capaz de extraer e hidrolizar todos los azúcares complejos de las muestras de cáscara y pulpa de plátano y transformarlos en azúcares reductores. Sin embargo, con este tratamiento sí somos capaces de obtener la totalidad de los azúcares reductores presentes en la cáscara de naranja.

6.13. AZÚCARES TOTALES Y REDUCTORES EXTRAÍDOS EN FRESCO

Comúnmente los azúcares reductores son considerados azúcares fermentables, con lo que el análisis de la cantidad de azúcares reductores presentes en las muestras nos permite estimar la cantidad de azúcares directamente fermentables para producir bioetanol. Por el contrario, los azúcares totales incluyen tanto a los reductores o simples como a los de cadena larga (celulosa, hemicelulosa, almidón...).

En las siguientes tablas se muestra la cantidad de azúcares totales y reductores que se extrajeron de las muestras que no han sufrido ningún pretratamiento, así como el pH de las mismas. Además, se indicará el porcentaje de extracción de azúcares reductores con respecto a los azúcares reductores potenciales presentes en la muestra inicial.

Tabla 10: Cantidad de azúcares totales y reductores extraídos de cada una de las muestras analizadas (referidos al peso seco de residuo inicial) y porcentaje de los azúcares reductores potenciales extraídos.

MUESTRAS SIN TRATAMIENTO	TRATAMIENTO CON EL QUE SE CORRESPONDE	CANTIDAD DE AZÚCARES EXTRAÍDOS EN CADA MUESTRA (g azúcares/100g m.s.)			MEDIA DE LOS AZÚCARES EXTRAÍDOS (g azúcares/100g m.s.)	PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN
Cáscara de plátano Az. Totales	120°C	14,4	16,07	20,9	15,69	70,7
	128°C	14,6	13,9	14,6		
	135°C	9,5	11,7	14,3		
Cáscara de plátano Az. Reductores	120°C	12,7	12,04	19,9	10,42	
	128°C	10,7	10,9	10,8		
	135°C	4,7	5,7	7,6		
Pulpa de plátano Az. Totales	120°C	76	97,09	141,04	66,20	
	128°C	89,2	74,1	77,6		
	135°C	67,05	74,7	76,9		
Pulpa de plátano Az. Reductores	120°C	47,2	48,3	49,6	25,79	
	128°C	35,7	34,5	37,7		
	135°C	30,9	30,3	25,2		
Cáscara de naranja Az. Totales	120°C	54,8		42,9	33,85	33
	128°C	51,4		46,9		
	135°C	46		46,5		
Cáscara de naranja Az. Reductores	120°C	38,3		39,09	27,35	
	128°C	42,28		42,2		
	135°C	34,3		34,4		

Podemos observar que en el caso de la cáscara de plátano y la pulpa del plátano, sin aplicar ningún tratamiento térmico, conseguimos extraer más del 70% de los azúcares reductores potenciales presentes en las muestras. Sin embargo, con la cáscara de naranja tan solo conseguimos extraer el 33% de todos los azúcares reductores potenciales.

Esto puede deberse a la diferencia de composición entre las muestras ya que, la cáscara de naranja contiene un porcentaje elevado de fibra insoluble, mientras que la cáscara y la pulpa de plátano contienen mayor cantidad de azúcares reductores que presentan un mayor grado de solubilidad.

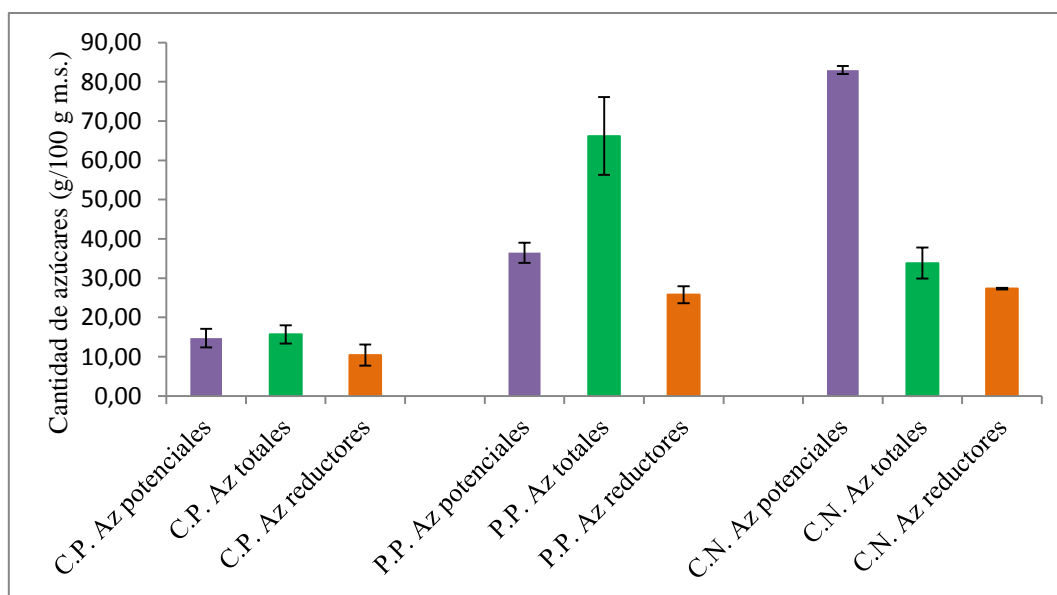


Figura 23: Cantidad de azúcares reductores potenciales, totales y reductores obtenidos de las muestras de cáscara de plátano (C.P.), pulpa de plátano (P.P.) y cáscara de naranja (C.N.) sin tratamiento térmico.

Se puede observar que, en las tres muestras, la concentración de azúcares reductores extraída es menor que la concentración de azúcares reductores potenciales, lo que demuestra que sin un tratamiento de hidrólisis no somos capaces de extraer todos los azúcares reductores que contiene la muestra.

En el caso de la pulpa de plátano, la concentración de azúcares totales extraídos en fresco es muy superior a la concentración de azúcares reductores potenciales. Esto puede deberse a que el procedimiento que se sigue para la extracción de los azúcares reductores potenciales no sea adecuado para este tipo de muestra ya que no permite convertir el total de los carbohidratos presentes en las muestras a azúcares reductores. Otra opción sería que, debido a las elevadas condiciones de temperatura y pH que se utilizan en la determinación de los azúcares reductores potenciales, los carbohidratos se descompongan en otros compuestos si bien no parece probable ya que no se detecta presencia de inhibidores en las muestras analizadas.

En la siguiente tabla se recogen los valores de pH medidos en las muestras que no han sufrido tratamiento hidrotérmico. Se puede observar que no hay grandes variaciones entre las diferentes muestras analizadas. Además el pH de las muestras es muy adecuado para el desarrollo de una fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* ya que el pH óptimo para esta levadura es de 5 (66).

Tabla 11: Valores de pH de las muestras sin tratamiento hidrotérmico.

MUESTRAS	pH DE LA MUESTRA SIN TRATAR		
TRATAMIENTO A 120°C			
Cáscara de plátano	5,79	5,74	5,82
Pulpa de plátano	5,31	5,22	5,49
Cáscara de naranja	4,53		4,39
TRATAMIENTO A 128°C			
Cáscara de plátano	5,62	5,57	5,76
Pulpa de plátano	5,43	5,35	5,24
Cáscara de naranja	4,53		4,39
TRATAMIENTO A 135°C			
Cáscara de plátano	5,92	5,72	5,76
Pulpa de plátano	5,27	5,17	5,43
Cáscara de naranja	4,53		4,39

6.2. AZÚCARES EXTRAÍDOS TRAS EL TRATAMIENTO DE HIDRÓLISIS

Como se ha descrito en el apartado 5.2, las muestras, diluidas con agua destilada fueron sometidas a altas temperaturas y una presión de unos 2 bares durante 5 minutos. El objetivo final de este método es degradar los hidratos de carbono complejos, como la celulosa y la hemicelulosa. Tras el tratamiento, se analizaron los azúcares totales y reductores en cada una de las muestras, siguiendo los procedimientos indicados en el apartado 5.3.

Hay que mencionar que, para cada tratamiento hidrotérmico que se llevaba a cabo en las muestras de plátano, se hizo el análisis en fresco y el análisis de los azúcares reductores potenciales. La causa principal fue la elevada heterogeneidad que se encontró en las muestras de plátano. Sin embargo, para las muestras de cáscara de naranja, el análisis en fresco y el análisis para la determinación de la cantidad de azúcares reductores potenciales solo se llevó a cabo una vez, ya que se partió de un conjunto de muestras

que presentaban una gran homogeneidad entre sí en cuanto a aspecto, grado de maduración, etc.

A continuación se describen los resultados obtenidos a las tres temperaturas ensayadas.

6.2.1. TRATAMIENTO HIDROTÉRMICO A 120°C

En la siguiente tabla se recogen los datos obtenidos a 120°C de los análisis de azúcares totales y reductores en las muestras de cáscara de plátano, pulpa de plátano y cáscara de naranja, las desviaciones estándar y la relación entre azúcares reductores y totales, expresados en porcentaje. Se muestran los valores medios de los duplicados o triplicados realizados para cada muestra y las desviaciones estándar correspondientes.

Tabla 12: Contenido de azúcares totales y reductores y su relación expresado en porcentaje de la pulpa del plátano, la cáscara del plátano y la cáscara de naranja tras el tratamiento hidrotérmico a 120°C.

MUESTRA	Azúcares totales (g az./100 g m.s.)	Azúcares reductores (g az./100 g m.s.)	Relación reductores/totales (%)
Cáscara de plátano	17,13 ± 3,3	14,25 ± 3,3	83,2
Pulpa de plátano	104,71 ± 3,2	48,36 ± 1,2	46,2
Cáscara de naranja	48,86 ± 8,5	38,70 ± 0,6	79,2

Si analizamos de manera individual la cantidad de azúcares extraídos después del tratamiento de cada una de las muestras, podemos observar que la pulpa de plátano proporciona una mayor cantidad de azúcares que las cáscaras de plátano y naranja, siendo por tanto el mejor sustrato de los ensayados para la obtención de bioetanol.

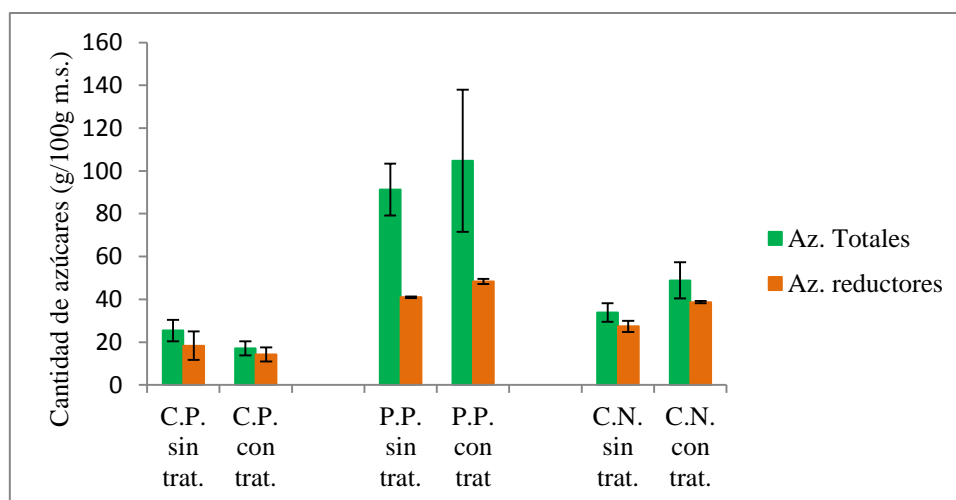


Figura 24: Contenido de azúcares totales y reductores de la pulpa de plátano (P.P.), la cáscara de plátano (C.P.) y la cáscara de naranja (C.N.) con y sin el tratamiento hidrotérmico a 120°C.

Como se puede observar en la tabla y en la figura anterior donde se compara la cantidad de azúcares totales y reductores extraída sin y con tratamiento de hidrólisis a 120°C, la cantidad de azúcares totales y reductores extraídos aumentan en el caso de la pulpa de plátano y de la cáscara de la naranja. Sin embargo, en el caso de la cáscara de plátano, este tratamiento extrajo menos azúcares que con las muestras sin tratar, lo que no es deseable para el objetivo del trabajo.

A continuación se van a exponer los porcentajes de eficacia y de extracción obtenidos con el tratamiento de hidrólisis a 120°C.

Se entiende como porcentaje de eficacia del tratamiento de hidrólisis la proporción en la que aumentaba la cantidad de azúcares reductores extraídos en relación a la cantidad de azúcares reductores que habíamos obtenido en el tratamiento en fresco.

Por otro lado, se entiende como porcentaje de extracción la proporción, expresada en porcentaje, de azúcares simples que somos capaces de obtener frente al total de azúcares simples que puede llegar a obtener la muestra.

Tabla 13: Porcentaje de eficacia y de extracción obtenida de las muestras tratadas a 120°C.

MUESTRA	% eficacia	% extracción
Cáscara de plátano sin tratamiento	-22,34	77,36
Cáscara de plátano con tratamiento		60,08
Pulpa de plátano sin tratamiento	17,95	90,92
Pulpa de plátano con tratamiento		107,24
Cáscara de naranja sin tratamiento	41,48	32,96
Cáscara de naranja con tratamiento		46,63

En la tabla anterior se puede observar que con el tratamiento a 120°C se disminuye la extracción de azúcares reductores en la muestra de cáscara de plátano, en cambio, en la pulpa de plátano y cáscara de naranja la eficacia aumenta. En cuanto al porcentaje de extracción, con respecto a los azúcares potenciales reductores, el mayor porcentaje se obtiene en la pulpa del plátano, tanto en la muestra sin tratar como tras el tratamiento a 120°C, seguido de la cáscara del plátano y, por último, en la cáscara de naranja es la muestra que menor porcentaje de azúcares reductores logra extraer con este tratamiento.

Por último, en la siguiente tabla se recogen los valores de pH obtenidos de las muestras antes y después del tratamiento a 120°C. Puede verse que el tratamiento térmico no influye en gran medida en el valor de pH, aunque se puede observar una ligera acidificación tras el tratamiento. Además, el pH de la cáscara y la pulpa del plátano sería el adecuado para una fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*, en cambio, en el caso de la cáscara de naranja, antes de una fermentación con esta levadura se necesitaría un ajuste del pH hasta un valor en torno a 5.

Tabla 14: Valores de pH de las muestras tratadas a 120°C.

MUESTRAS	pH ANTES DEL TRATAMIENTO			pH DESPUÉS DEL TRATAMIENTO		
	Cáscara de plátano	5,97	5,89	5,82	5,35	5,35
Pulpa de plátano	5,38	5,4	5,49	5,02	5,01	5,08
Cáscara de naranja	3,55		3,7	3,53	3,59	

6.2.2. TRATAMIENTO HIDROTÉRMICO A 128°C

Este tratamiento es muy similar al anterior, lo único que se modificó fue la temperatura de tratamiento, que se aumentó de 120°C a 128°C.

Con esto lo que se pretende es obtener un tratamiento lo más eficiente posible para obtener azúcares fermentables, mediante la hidrólisis de los azúcares complejos, aplicando la menor temperatura posible. El objetivo es conseguir disminuir los costes del tratamiento y, en definitiva, que el proceso sea más económico y viable a nivel industrial.

En la siguiente tabla se exponen los resultados obtenidos de los análisis de las muestras tratadas.

Tabla 15: Contenido de azúcares totales y reductores y su relación expresado en porcentaje de la pulpa de plátano, la cáscara de plátano y la cáscara de naranja tras el tratamiento hidrotérmico a 128°C.

MUESTRA	Azúcares totales (g az./100 g m.s.)	Azúcares reductores (g az./100 g m.s.)	Relación reductores/totales (%)
Cáscara de plátano	14,35 ± 0,4	10,76 ± 0,1	74,9
Pulpa de plátano	80,33 ± 7,9	35,94 ± 1,6	44,8
Cáscara de naranja	49,14 ± 3,2	42,26 ± 0,03	85,9

En la tabla se puede observar que los azúcares totales de la pulpa del plátano son los que se extraen en mayor cantidad tras el tratamiento hidrotérmico a 128°C durante 5 minutos. Sin embargo, la mayor cantidad de azúcares reductores se obtiene a partir de la cáscara de naranja. Por otra parte, la mayor relación entre azúcares reductores y azúcares totales se obtiene en la cáscara de naranja seguido de la cáscara de plátano.

En la figura siguiente se puede observar con mayor claridad el aumento de azúcares totales y reductores en los tres substratos tras el tratamiento de hidrólisis hidrotérmica, en comparación con los datos obtenidos de los substratos sin dicho tratamiento.

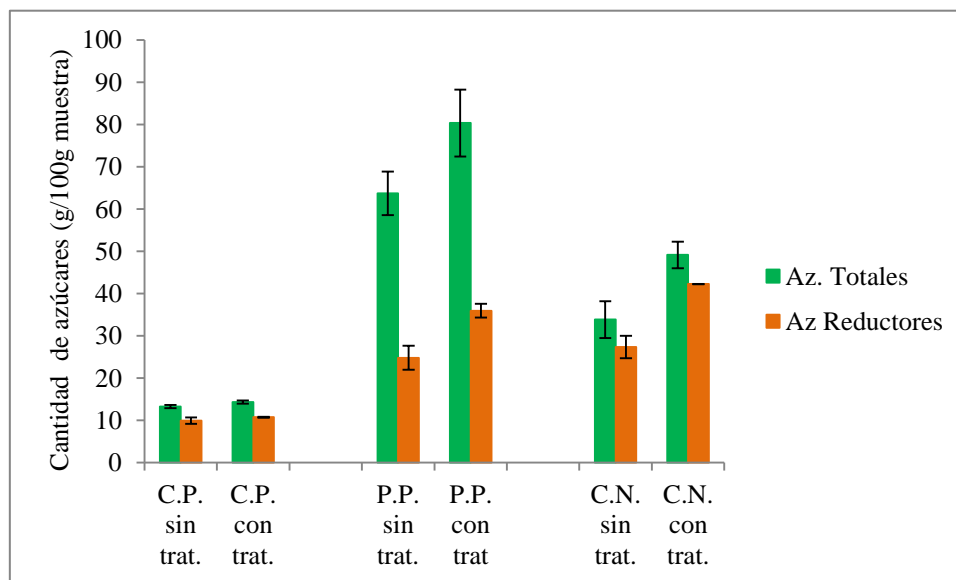


Figura 25: Contenido de azúcares totales y reductores de la pulpa de plátano (P.P.), la cáscara de plátano (C.P.) y cáscara de naranja (C.N.) en fresco y tras el tratamiento hidrotérmico a 128°C.

En la figura anterior puede observarse como aumenta la cantidad de azúcares totales y reductores extraídos en los tres substratos analizados. Podemos observar que el mayor

aumento se consigue en la pulpa del plátano, seguido de la cáscara de naranja y en el caso de la cáscara de plátano no se logra un gran aumento de azúcares reductores.

En la tabla siguiente se representa el porcentaje de eficacia y de extracción obtenido. El mayor porcentaje de eficacia se obtiene con la cáscara de naranja y el mayor porcentaje de extracción con la pulpa del plátano.

Tabla 16: Porcentaje de eficacia y de extracción obtenida de las muestras tratadas a 128°C.

MUESTRA	% eficacia	% extracción
Cáscara de plátano sin tratamiento	8,37	91,09
Cáscara de plátano con tratamiento		98,71
Pulpa de plátano sin tratamiento	44,79	85,60
Pulpa de plátano con tratamiento		123,94
Cáscara de naranja sin tratamiento	54,50	32,96
Cáscara de naranja con tratamiento		50,92

En la siguiente tabla se recogen los valores de pH de las muestras analizadas antes y después del tratamiento de hidrólisis a 128°C. No se detectaron grandes variaciones en los valores de pH en ninguna de las muestras analizadas, sin embargo puede verse una ligera acidificación después del tratamiento. Igual que en el tratamiento anterior, las muestras de cáscara de naranja presentan un pH ácido para llevar a cabo una fermentación con *S. cerevisiae*.

Tabla 17: Valores de pH de las muestras tratadas a 128°C.

MUESTRAS	pH ANTES DEL TRATAMIENTO			pH DESPUÉS DEL TRATAMIENTO		
Cáscara de plátano	5,77	5,71	5,95	5,15	5,07	5,34
Pulpa de plátano	5,55	5,47	5,73	5,01	4,96	4,9
Cáscara de naranja	3,56		3,6	3,63		3,65

6.2.3. TRATAMIENTO HIDROTÉRMICO A 135°C

A continuación se expondrá una tabla en la que se muestra las cantidades de azúcares totales y reductores obtenidos de las muestras tratadas a 135°C durante 5 minutos en el autoclave.

Tabla 18: Contenido de azúcares totales y reductores y su relación expresado en porcentaje de la pulpa de plátano, la cáscara de plátano y cáscara de naranja tras el tratamiento hidrotérmico a 135°C.

MUESTRA	Azúcares totales (g az./100 g m.s.)	Azúcares reductores (g az./100 g m.s.)	Relación reductores/totales (%)
Cáscara de plátano	11,85 ± 2,4	6,02 ± 1,4	50,8
Pulpa de plátano	72,88 ± 5,2	28,77 ± 3,1	39,5
Cáscara de naranja	46,23 ± 0,3	34,38 ± 0,04	74,36

En la tabla anterior puede observarse que la mayor relación entre azúcares reductores y totales se consigue con la cáscara de naranja, seguido de la cáscara de plátano.

De manera más esquemática, en la siguiente figura se exponen las cantidades de azúcares totales y reductores obtenidos de las diferentes muestras analizadas.

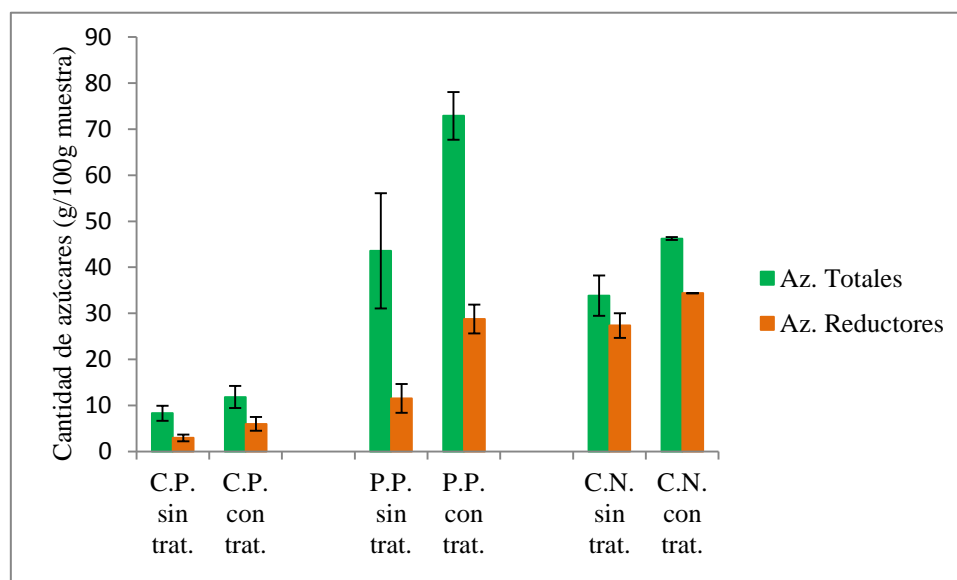


Figura 26: Contenido de azúcares totales y reductores de la pulpa del plátano (P.P.), la cáscara del plátano (C.P.) y cáscara de naranja (C.N.) en fresco y tras el tratamiento hidrotérmico a 135°C.

En la figura se puede observar que en los tres substratos se consigue un aumento de azúcares totales y reductores tras el tratamiento a 135°C durante 5 minutos, por lo que podemos decir que este tratamiento puede ser adecuado para la obtención de azúcares fermentables.

En la siguiente tabla se recogen los porcentajes de eficacia y de extracción obtenidos de cada una de las muestras tratadas con este tratamiento hidrotérmico.

Tabla 19: Porcentaje de eficacia y de extracción obtenida de las muestras tratadas a 135°C.

MUESTRA	% eficacia	% extracción
Cáscara de plátano sin tratamiento	102,63	30,92
Cáscara de plátano con tratamiento		62,65
Pulpa de plátano sin tratamiento	149,35	32,66
Pulpa de plátano con tratamiento		81,45
Cáscara de naranja sin tratamiento	25,68	32,96
Cáscara de naranja con tratamiento		41,42

En esta tabla se puede observar que con este tratamiento se consigue la mayor eficacia y el mayor porcentaje de extracción con la pulpa del plátano.

Por último, en la siguiente tabla se recogen los valores de pH de las muestras antes y después del tratamiento de hidrólisis a 135°C. Como en los tratamientos anteriores, se observa una ligera acidificación en los valores de pH en las muestras después del tratamiento y además el pH de las muestras de cáscara de naranja presenta una acidez excesiva para una fermentación con *S. cerevisiae*.

Tabla 20: Valores de pH de las muestras tratadas a 135°C.

MUESTRAS	pH ANTES DEL TRATAMIENTO			pH DESPUÉS DEL TRATAMIENTO		
Cáscara de plátano	5,87	5,74	5,64	5,04	5,12	5,07
Pulpa de plátano	5,19	5,39	5,09	5,84	4,88	4,8
Cáscara de naranja	4,46		4,52	4,23	4,24	

Por lo tanto, basándonos en los datos que hemos obtenido en este análisis y relacionándolo con los datos obtenidos de los análisis anteriores, nos lleva a descartar el tratamiento a 120°C. La justificación es que, en los otros dos tratamientos conseguimos degradar los azúcares en las tres muestras analizadas, mientras que en el tratamiento a 120°C solo conseguimos aumentar la extracción de azúcares en dos de las tres muestras analizadas, por lo que su eficacia es menor. Por otro lado, en el tratamiento a 128°C se obtiene una mayor extracción de azúcares fermentables que en el tratamiento a 135°C. Además el tratamiento térmico a 128°C supone un menor coste económico que el de 135°C.

6.2.4. COMPARACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS A DIFERENTES TEMPERATURAS

A modo de resumen se van a exponer tres figuras en las que se representan los resultados de las cantidades de azúcares potenciales, reductores en fresco y los azúcares reductores obtenidos de cada una de las muestras en los tres tratamientos de hidrólisis llevados a cabo.

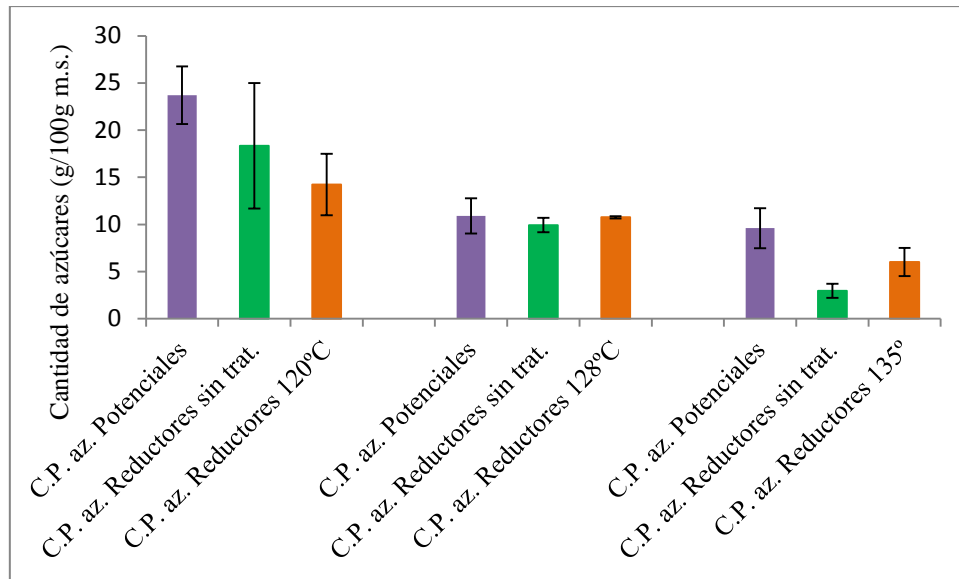


Figura 27: Representación de los azúcares potenciales y reductores de la cáscara de plátano sin tratamiento, a 120°C, a 128°C y a 135°C.

Como puede observarse en esta figura, la cantidad de azúcares reductores aumentan en los tratamientos a 135°C y a 128°C, sin embargo, en el tratamiento a 120°C, no se consigue aumentar el contenido de azúcares reductores.

En esta segunda figura se representan los resultados obtenidos de los diferentes tratamientos realizados en la pulpa del plátano.

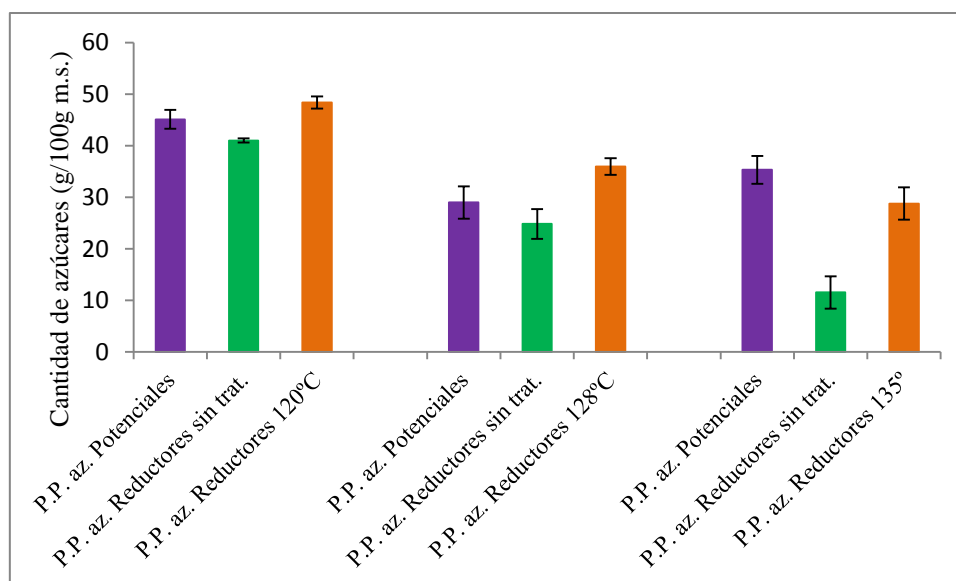


Figura 28: Representación de los azúcares potenciales y reductores de la pulpa de plátano sin tratamiento, a 120°C, a 128°C y a 135°C.

Al igual que en la cáscara, los tratamientos de hidrólisis a 135°C y a 128°C nos permite aumentar la cantidad azúcares reductores extraídos de la pulpa del plátano. Sin embargo, a diferencia de la cáscara de plátano, el tratamiento a 120°C también provoca la hidrólisis de los azúcares complejos en la pulpa del plátano, permitiendo obtener una mayor cantidad de azúcares reductores frente a la concentración obtenida en fresco.

Esto puede explicarse si analizamos la composición de los dos tipos de muestras. La fibra que compone la cáscara del plátano es fundamentalmente hemicelulosa, celulosa y lignina. Mientras que en la pulpa del plátano la cantidad de fibra se debe mayoritariamente a la presencia de almidón. El almidón presenta unos enlaces químicos menos resistentes térmicamente que los que presentan los componentes que se encuentran en la fibra de la cáscara, por lo que, en la pulpa de plátano, es más fácil degradar los enlaces químicos para obtener azúcares simples que en el caso de la cáscara, en la que, como reflejan los resultados, se necesitarán condiciones más drásticas para degradar los azúcares complejos.

Por último, en la figura siguiente se pueden observar los resultados obtenidos de los diferentes tratamientos realizados en la cáscara de naranja.

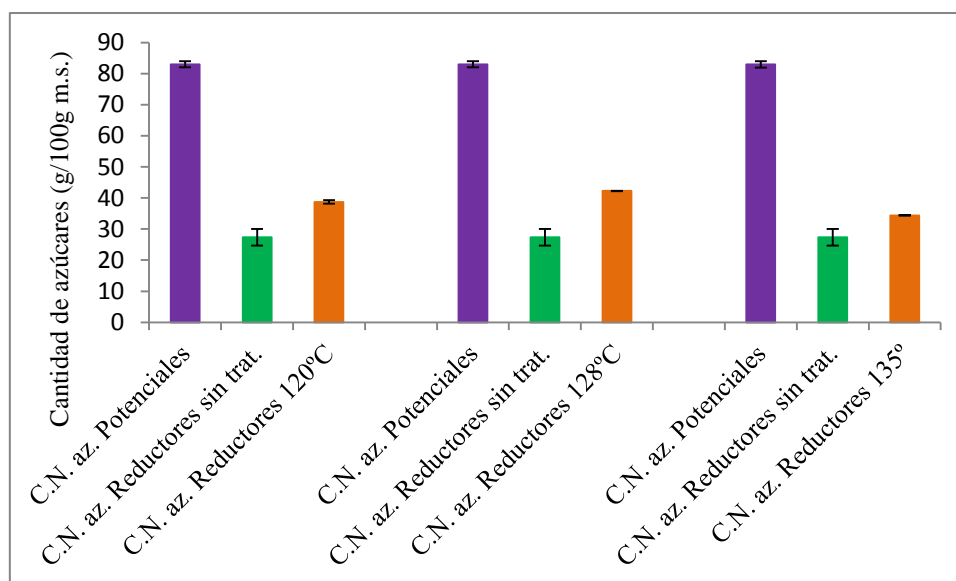


Figura 29: Representación de los azúcares potenciales y reductores de la cáscara de naranja sin tratamiento, a 120°C, a 128°C y a 135°C.

Al igual que en la pulpa del plátano, con las tres muestras se consigue un aumento de los azúcares reductores extraídos. Además el aumento de azúcares es superior que en el caso de la cáscara de plátano.

Esto puede deberse a que la fibra que contiene la cáscara de naranja es más fácil de degradar que la que contiene la cáscara de plátano, ya que esta última es más rica en lignina, un polisacárido mucho más difícil de degradar que otros como la hemicelulosa o la celulosa, que están en mayor concentración en la cáscara de naranja (59).

Por otro lado, como se ha indicado en los apartados anteriores, durante el desarrollo de este trabajo también se calculó el porcentaje de eficacia y el porcentaje de extracción. Los resultados obtenidos de los tratamientos de hidrólisis que se llevaron a cabo se exponen en las siguientes tablas.

Tabla 21: Porcentaje de eficacia en las muestras sometidas a los diferentes tratamientos hidrotérmicos.

Temperaturas	C. Plátano	Pulpa plátano	C. Naranja
120	-22,3	18	41,5
128	8,4	44,8	54,5
135	102,6	149,4	25,7

En esta primera tabla se puede observar que la mayor eficacia (entendida como el porcentaje en el que aumenta la cantidad de azúcares reductores extraídos con respecto a la muestra sin tratamiento) se obtiene en el tratamiento a 135°C, menos en el caso de la cáscara de naranja, que el mayor porcentaje de eficacia se obtiene en el tratamiento a

128°C. Por otro lado, en la cáscara de plátano, el tratamiento a 120°C disminuyó el contenido de azúcares reductores extraídos (valor negativo). Esta es una de las principales razones por las que se descartó el tratamiento a 120°C para la obtención de azúcares fermentables.

En la figura 27 puede verse claramente que, a medida que aumentaba la temperatura, el porcentaje de eficacia también crecía, excepto en el caso de la cáscara de naranja que alcanzaba su máximo porcentaje de eficacia a 128°C.

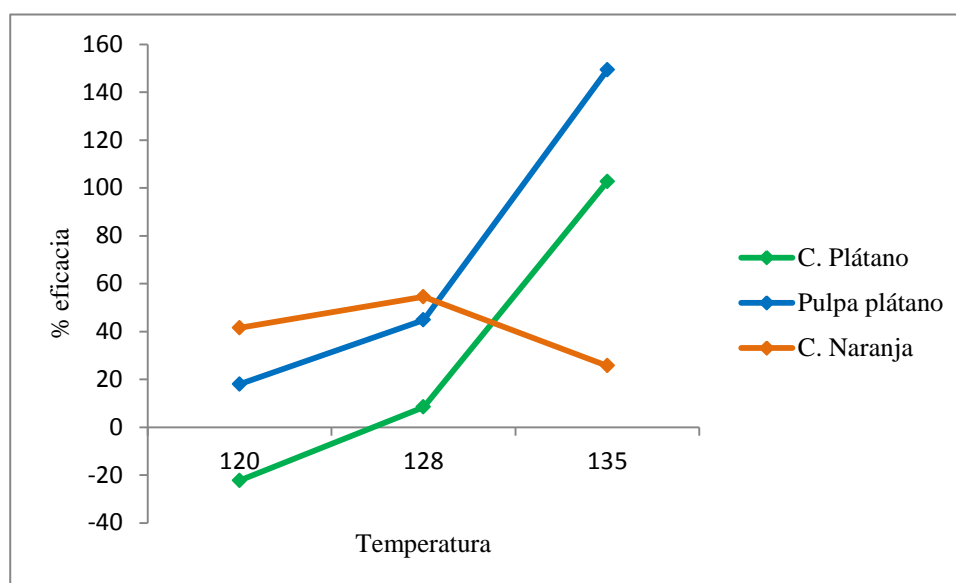


Figura 30: Variación del porcentaje de eficacia en función de la temperatura en las diferentes muestras analizadas.

A continuación se recogen los porcentajes de extracción obtenidos de cada una de las muestras analizadas con respecto a los azúcares potenciales medidos para cada una de las muestras ensayadas.

Tabla 22: Porcentaje de extracción en las muestras sometidas a los diferentes tratamientos hidrotérmicos.

TEMPERATURAS	C. Plátano	Pulpa plátano	C. Naranja
Sin tratamiento	66,5	70	32,9
120	60,1	107,2	46,6
128	98,7	123,9	50,9
135	62,7	81,5	41,4

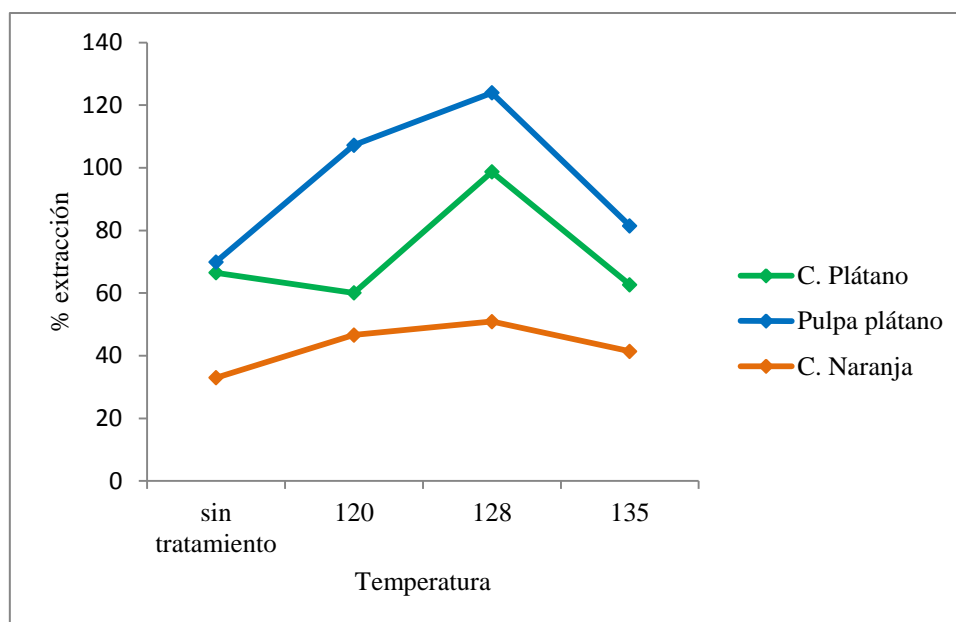


Figura 31: Variación del porcentaje de extracción en función de la temperatura en las diferentes muestras analizadas.

En la tabla anterior se puede observar que con los tres tratamientos conseguimos extraer azúcares reductores, sin embargo, el mayor porcentaje de extracción se obtiene con el tratamiento a 128°C en las tres muestras analizadas. Esto indica que los mayores porcentajes de eficacia observado para el plátano a 135°C, deriva de la baja cantidad de azúcares reductores extraídos en este caso en comparación con las muestras sin tratamiento empleadas y no relativa a una mejora del porcentaje de extracción. En el caso de la cáscara de naranja los porcentajes de extracción de los tres tratamientos son muy similares. Además, la cáscara de naranja es la que menores porcentajes de extracción presenta en los tres tratamientos. Esto puede deberse a que las condiciones del tratamiento no sean las adecuadas para romper los carbohidratos complejos que la componen.

Como conclusión, en base a los resultados de los azúcares extraídos, lo más razonable es decantarse por el tratamiento a 128°C ya que se obtienen mejores resultados que el tratamiento a 120°C y que en el tratamiento a 135°C, siendo además más económico.

6.3. CONCENTRACIÓN DE INHIBIDORES TRAS EL TRATAMIENTO DE HIDRÓLISIS

Como se ha explicado en los apartados anteriores, determinadas condiciones en el tratamiento de hidrólisis pueden provocar el desarrollo de reacciones que dan lugar a compuestos inhibidores del proceso fermentativo. Los principales compuestos son el ácido acético, el furfural y el hidroximetilfurfural (HMF). El furfural proviene de la degradación de las pentosas, como la xilosa, mientras que el HMF es un derivado de las hexosas, como la glucosa, galactosa o la manosa. El ácido acético es otro de los compuestos inhibidores que se obtiene a partir del catabolismo de los azúcares como la glucosa (67). Estos compuestos son capaces de inhibir la fermentación, llevada a cabo por bacterias y levaduras, por lo que resulta un grave inconveniente si se plantea el empleo de estos substratos como base para un proceso fermentativo. Si bien, se ha visto que los pretratamientos de hidrólisis ácida son los que más riesgo tienen de formación de inhibidores, aunque también se pueden formar con otros tratamientos (68) (19). Por esta razón se analizaron las muestras que habían sufrido el tratamiento hidrotérmico, con el objetivo de saber si dichos compuestos se habían formado o no y en que concentración.

6.3.1. ÁCIDO ACÉTICO

El ácido acético es un compuesto que no pertenece a la familia de los compuestos furánicos, como el furfural y el HMF, sin embargo, al igual que esos compuestos, puede provocar la inhibición de la fermentación por parte de las levaduras (68). Se forma a partir de las primeras etapas de la hidrólisis de los grupos acetilados de la hemicelulosa, pero es también un producto final de muchas reacciones de oxidación (69).

El grado de inhibición causado por el ácido acético depende primordialmente de la concentración. Por esta razón, la toxicidad de este compuesto reduciría la producción de etanol si este sobrepasa los 4 g/L, aunque depende de muchos factores como las condiciones de la fermentación, la cepa empleada o la concentración de azúcares entre otros (68) (19).

En un estudio similar en el que se utilizaba como sustrato cáscara de arroz y se llevaba a cabo una hidrólisis enzimática junto con una fermentación con *S. cerevisiae*, se obtuvo una concentración de ácido acético de 1,6 g/L (70). En nuestro caso, en ninguna de las muestras analizadas se detectó la presencia de ácido acético. Por lo que podemos afirmar que la concentración de este inhibidor, tras los diferentes tratamientos de hidrólisis hidrotérmica, es menor, en todos los casos, que el límite de detección del equipo (1 ppm), por lo que no supone ningún problema para posteriores fermentaciones.

6.3.2. FURFURAL

El furfural es un aldehído aromático con una estructura en anillo. Se obtiene a partir de reacciones de Maillard, que tienen lugar generalmente a elevadas temperaturas o a partir de la descomposición del ácido ascórbico. Dentro de los compuestos furánicos que tienen un efecto inhibitorio sobre la actividad fermentativa de *S. cerevisiae*, el furfural es el que mayor efecto inhibitorio presenta. Sin embargo, el modo en el que afecta al metabolismo de las levaduras fermentativas no se conoce completamente, aunque se piensa que actúa interaccionando con los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos de la célula, causando daños a nivel de la pared y membrana celulares, inhibiendo el crecimiento celular, causando daños a nivel del ADN e inhibiendo la síntesis de proteínas y ARN (67). El furfural también produce la inhibición de enzimas glicolíticas y fermentativas. Una de las enzimas que más se ve afectada es la alcohol deshidrogenasa (ADH), que participa en la formación de etanol, aunque también se ven afectadas otras enzimas involucradas en el ciclo de Krebs o el ciclo del ácido cítrico (67).

En cuanto a la concentración mínima a partir de la cual pueden observarse efectos adversos no está del todo clara. En algunos trabajos analizados se afirmaba que este compuesto era capaz de provocar un descenso de la producción de etanol en un 78% a una concentración de 0,46 g/L, mientras que con 1,2 g/L la inhibición puede ser total. Por otro lado, a concentraciones de 1 g/L se ha descrito que es capaz de inhibir el crecimiento celular, aunque la resistencia de la levadura a sus efectos podría mejorar incrementando la concentración de glucosa en el medio, además de depender de otros factores como la densidad celular, el tipo de levadura y las condiciones del tratamiento (19) (67).

En la siguiente tabla se recogen los resultados de concentración de furfural en las muestras analizadas, indicándose también el tiempo de retención del furfural y el área medida.

Tabla 23: Tiempo de retención, área obtenida y concentración de furfural determinada por análisis mediante HPLC.

MUESTRA	t _R (min)	ÁREA (mAU s)	CONCENTRACIÓN (ppm)
CP (120°C)	-	-	< 1
CP (128°C)	-	-	< 1
CP (135°C)	-	-	< 1
CP potenciales	3,901	678,27	3,7
PP (120°C)	-	-	< 1
PP (128°C)	-	-	< 1
PP (135°C)	-	-	< 1
PP potenciales	3,901	642,06	3,4
CN (120°C)	3,868	815,43	5,1
CN (128°C)	3,882	1068,43	7,7
CN (135°C)	3,883	977,66	6,8
CN potenciales	-	-	< 1

Como se puede observar en la tabla anterior, la concentración de furfural obtenida en todos los procesos de hidrólisis ensayados en la cáscara y pulpa de plátano están por debajo del límite de detección del equipo, por esa razón se indica que la concentración es menor a 1 ppm. En cambio, con el método empleado para la extracción de los azúcares potenciales (detallado en el apartado 5.2.2), aplicado en las muestras de cáscara de plátano y pulpa de plátano, sí que se obtuvo una concentración de furfural en torno a 3 ppm.

Por otro lado, las muestras de cáscara de naranja (CN) tienen un comportamiento diferente. Así, en las muestras tratadas con el tratamiento hidrotérmico sí se forma furfural, en una concentración entre los 5 y los 8 ppm, obteniéndose la concentración más elevada a los 128°C. Esto puede deberse a la concentración de ácido ascórbico presente en la muestra, que puede favorecer las reacciones que dan como producto final este compuesto. Sin embargo, con el tratamiento empleado para la extracción de los azúcares potenciales no se obtiene furfural en la muestra de cáscara de naranja.

Con estos resultados podemos observar que no solo las condiciones del tratamiento (como la presión, la temperatura o el tiempo del tratamiento, entre otras) son capaces de favorecer o inhibir las reacciones que dan lugar a compuestos inhibidores de la fermentación, como es el caso del furfural, sino que la composición de la muestra que se vaya a tratar también es un factor clave para el desarrollo de este tipo de reacciones.

En estudios similares llevados a cabo en cáscara de arroz y empleando una hidrólisis enzimática seguido de una fermentación se obtuvieron concentraciones de furfural de 100 ppm (mg/L) (70).

Por último, si comparamos las concentraciones obtenidas de las muestras, con las concentraciones encontradas en la bibliografía como concentración inhibitoria, vemos que la concentración de furfural obtenida en las muestras está muy por debajo de la concentración inhibitoria del compuesto. Por lo que, a priori, el furfural no debería suponer un problema en la fase de fermentación.

6.3.3. *HIDROXIMETILFURFURAL*

El HMF, al igual que el furfural, afecta a la producción de etanol, al crecimiento celular y a la fase de fermentación, mediante la inhibición de enzimas como la alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa y piruvato deshidrogenasa y también afecta a las reacciones de la glicolisis (71). Sin embargo, se ha demostrado que la levadura *S.cerevisiae* es capaz de reducir estos compuestos transformándolos en otros que presentan una menor toxicidad. Concretamente el HMF es reducido a 2,5-bis-hidroxi metilfurano y 2-furanmetanol. La reducción del HMF es mucho más lenta que la del furfural y tiene lugar solo cuando el furfural está completamente reducido (71) (67).

La concentración a partir de la cual se empiezan a observar los efectos adversos en la fermentación no está del todo clara ya que depende de multitud de factores, desde las condiciones del proceso hasta la presencia de otros compuestos simultáneamente, como es el caso del furfural, que junto con el HMF, aumenta su efecto inhibitorio. Sin embargo, en uno de los estudios analizados realizaban sus experimentos para detectar los efectos de dicho compuesto sobre la fase de fermentación y se concluyó que a una concentración 2500 mg/L de HMF se observan efectos indeseables (72).

A continuación se muestra una tabla que recoge el tiempo de retención obtenido para el HMF, el área en cada una de las muestras analizadas, así como la concentración calculada de HMF a partir del calibrado realizado.

Tabla 24: Tiempo de retención, área obtenida y concentración de HMF obtenida del análisis mediante HPLC.

MUESTRA	t _R	ÁREA (mAU s)	CONCENTRACIÓN (ppm)
CP (120°C)	5,228	71,97	0,6
CP (128°C)	5,239	208,32	1,8
CP (135°C)	5,221	159,8	1,4
CP potenciales	5,242	208,11	1,8
PP (120°C)	5,272	325,49	2,9
PP (128°C)	5,243	1274,3	11,2
PP (135°C)	5,263	3025,7	26,6
PP potenciales	5,276	427,8	3,8
CN (120°C)	5,31	1644,1	14,5
CN (128°C)	5,209	4272,1	37,6
CN (135°C)	5,281	2972,3	26,2
CN potenciales	5,280	27,04	0,2

Como puede observarse en la tabla, las mayores concentraciones de HMF se obtuvieron en las muestras de cáscara de naranja y de pulpa de plátano, siendo más elevada en las temperaturas más altas. Sin embargo, en las muestras que habían sufrido el tratamiento para la extracción de azúcares potenciales, cuyas condiciones de temperatura y pH eran las más severas, no se han encontrado grandes concentraciones de este compuesto. Lo mismo ocurrió para el caso del furfural, por lo que se puede deducir también que las condiciones de dicho tratamiento no eran las favorables para el desarrollo de las reacciones que daban lugar a la síntesis de HMF.

En el caso de la cáscara de plátano, la temperatura a la que se registró una mayor producción de HMF fue a 128°C y con el tratamiento para extraer los azúcares potenciales. En el caso de la pulpa de plátano, la mayor concentración se obtuvo con el tratamiento a 135°C. Hay que mencionar que la cantidad de HMF en el tratamiento a 135°C fue muy similar para el caso de la pulpa del plátano y de la cáscara de naranja. Sin embargo, en este último substrato la mayor concentración de HMF se alcanzó con el tratamiento a 128°C, igual que en la cáscara de plátano.

En un estudio similar realizado en cáscara de arroz en el que se llevaba a cabo una hidrólisis enzimática seguida de una fermentación se obtuvo una concentración de HMF tras la hidrólisis de 70 ppm (mg/L), considerablemente superior a las concentraciones obtenidas en este trabajo (70).

Al igual que en el caso del furfural, si comparamos las concentraciones descritas como inhibitorias con las concentraciones obtenidas en este trabajo, estas últimas son mucho

menores. Por lo que el HMF, en principio, tampoco provocaría inhibiciones en la etapa de fermentación.

Como conclusión, comparando las concentraciones encontradas en las muestras, con las concentraciones mínimas a partir de las cuales se observaron resultados adversos sobre las levaduras, podríamos afirmar que las concentraciones de inhibidores obtenidas no supondrían ningún problema en la etapa de fermentación, no siendo necesaria la etapa de detoxificación.

6.4. PRODUCCIÓN TEÓRICA DE BIOETANOL

El objetivo final del trabajo es extraer la mayor cantidad de azúcares simples de los residuos de frutas para poder llevar a cabo una fermentación de la que se pueda obtener la mayor cantidad de bioetanol posible. La principal reacción llevada a cabo durante el proceso de fermentación es la degradación de la glucosa para dar, como producto final, etanol y CO₂, cuyo balance energético se expone a continuación:



En esta reacción podemos observar que por cada mol de glucosa consumido se producen dos moles de etanol. Sin embargo, esto es lo que ocurriría si la reacción tuviera un rendimiento del 100%, pero en una situación real, no toda la glucosa se transforma en etanol, sino que un porcentaje se destina a la síntesis de las estructuras celulares y el mantenimiento de la célula.

Para la realización de los cálculos se ha estimado una eficacia del proceso de fermentación alcohólica por *S.cerevisiae* de un 80%. Se ha elegido esa levadura porque es la más conocida y empleada a nivel industrial, además de ser capaz de llevar a cabo fermentaciones rápidas y fiables (73).

Lo primero que se hizo fue analizar la cantidad de azúcares simples obtenidos en las muestras tras las diferentes hidrólisis hidrotérmicas y coger aquel tratamiento del que mejores resultados se habían obtenido. No se tuvo en cuenta la concentración de inhibidores ya que, como se ha explicado en el apartado anterior, las concentraciones de inhibidores presentes eran tan bajas que no se espera que tengan efectos negativos sobre

la fermentación. Por otro lado, todos los azúcares reductores se van a considerar como glucosa para realizar los cálculos que se detallan a continuación.

Los resultados elegidos fueron los obtenidos a partir del tratamiento hidrotérmico a 128°C, ya que es el que mejores resultados ha presentado y además es más rentable económicamente que el tratamiento a 135°C, como se explicó en el apartado 6.3.

En la siguiente tabla se exponen las cantidades de etanol que se podrían obtener de las muestras en fresco y tratadas con el pretratamiento hidrotérmico a 128°C, pudiendo obtenerse etanol en cantidades comprendidas entre 4 y 17 gramos de etanol por gramo de residuo seco procesado. Asimismo, en la tabla 26 se muestran las concentraciones de azúcares reductores en los caldos resultantes del tratamiento hidrotérmico así como el etanol obtenido.

Tabla 25: Cantidad de azúcar y de etanol que se obtendría tras la fermentación.

MUESTRA	CANTIDAD DE AZÚCAR (g az./100g m.s.)	CANTIDAD DE ETANOL (g et./100g m.s.)
Cáscara plátano tratada (128°C)	10,76	4,40
Pulpa plátano tratada (128°C)	35,94	14,69
Cáscara naranja tratada (128°C)	42,26	17,28
Mezcla de las tres muestras	29,65	12,12

Tabla 26: Concentración de azúcar y de etanol que se obtendría tras la fermentación.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN DE AZÚCAR (g az./L)	CONCENTRACIÓN ETANOL (g et./L)
Cáscara plátano tratada (128°C)	13,4	13,40
Pulpa plátano tratada (128°C)	58	58,00
Cáscara naranja tratada (128°C)	59,3	59,35
Mezcla de las tres muestras	43,6	43,58

En la tabla puede observarse que las mayores concentraciones de etanol se obtendrían a partir de la cáscara de naranja y la pulpa de plátano y siendo la cáscara de plátano el substrato en el que menos etanol se obtuvo. Además, considerando que se partiría de una mezcla compuesta por cáscara de plátano, pulpa de plátano y cáscara de naranja a

partes iguales, tras el tratamiento a 128°C, se podría obtener una concentración de etanol de 44 g de etanol/L. Comparando los resultados con un estudio similar, en el que se empleaba como sustrato cáscara de arroz y el pretratamiento consistía en una hidrólisis enzimática y en el que se consiguió una concentración de etanol de 14,5 g de etanol /L, vemos que la concentración de etanol obtenida en este trabajo es aceptable (70).

Con el objetivo de aumentar la concentración de etanol en el producto final, las modificaciones que se pueden llevar a cabo en el pretratamiento de hidrólisis hidrotérmica pueden ser variaciones en las condiciones del método, como la temperatura, presión o cantidad de agua añadida en el pretratamiento. En cuanto a la etapa de fermentación, puede ser de gran interés el estudio de diferentes cepas de *S. cerevisiae* o de otros tipos de microorganismos, como *Zymomona mobilis*, así como el desarrollo de mutaciones de dichos microorganismos, como los llevados a cabo sobre cepas de *E. coli*, que permite aumentar los rendimientos del tratamiento.

Por último, teniendo en cuenta que no se ha adicionado ningún compuesto o sustancia que resulte perjudicial para el medio ambiente o para los seres vivos, tras el tratamiento de obtención de bioetanol diseñado, el residuo obtenido se puede destinar para alimentación animal, ya que es una fuente rica en proteínas, debido a la elevada carga en levaduras que presentaría, o como fertilizante de suelos, ya que no deja de ser un residuo orgánico y biodegradable.

7. CONCLUSIONES

A continuación se exponen las principales conclusiones que se extrajeron de los resultados obtenidos del trabajo que se ha llevado a cabo:

- El tipo de muestra y la composición de ésta, así como las condiciones del tratamiento, puede influir en la cantidad de azúcares simples a obtener en cada uno de los pretratamientos de hidrólisis.
- En el caso de la cáscara de plátano, el pretratamiento de hidrólisis hidrotérmica a 120°C, disminuía la cantidad de azúcares simples, mientras que, con el tratamiento a 128°C era con el que conseguía una mayor extracción de estos azúcares.
- Por otro lado, para la pulpa de plátano, la mayor extracción de azúcares simples fue a una temperatura de 128°C.
- En el caso de la cáscara de naranja, también fue el pretratamiento a 128°C con el que se consiguió una mayor extracción de azúcares fermentables, si bien las diferencias observadas en los tratamientos fueron muy pequeñas.
- La concentración de compuestos inhibidores de la fermentación analizados (ácido acético, furfural e HMF) estaba por debajo de las concentraciones mínimas inhibitorias en todas las muestras analizadas, por lo que se llegó a la conclusión de que no supondrían un problema en la etapa de fermentación.
- Considerando todos los resultados, se optó por seleccionar el tratamiento a 128°C como el más adecuado, tanto desde el punto de vista técnico como económico.
- En cuanto al cálculo de la producción de bioetanol que se obtendría a partir del tratamiento a 128°C se obtuvo una producción de bioetanol que variaba entre los 4 y los 17 g de etanol por gramo de residuo seco, lo que se corresponde con concentraciones de etanol entre 13 y 59 g de etanol/L.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Quintero Castaño, Victor, Cárdenas Valencia, Carlos y Lucas Aguirre, Juan. *Caracterización de los residuos vegetales generados en el centro mayorista de acopio de la ciudad de Armenia (MERCAR) para su utilización industrial en la producción de biocombustibles*. 2014. Scientia et Technica, Vol. 19, págs. 261-267.
2. *Residuos Industriales* . [En línea] [Citado el: 22 de 12 de 2015.] <http://www.gestioncalidad.com/residuos-industriales.html>.
3. *Tipos de residuos: clasificación y características*. [En línea] [Citado el: 22 de 12 de 2015.] <http://www.emgrisa.es/wiki/tipos-de-residuos/>.
4. *Clasificación de los residuos*. Recuperado a partir de: <http://www.planetica.org/clasificacion-de-los-residuos>.
5. *Pérdidas y desperdicios de alimentos en el mundo*. [En línea] 2011. [Citado el: 26 de 12 de 2015.] <http://www.fao.org/docrep/016/i2697s/i2697s.pdf>.
6. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. [En línea] 2014. [Citado el: 26 de 12 de 2015.] http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/estrategia-mas-alimento-menos-desperdicio/Resumen_ejecutivo_Industria_.
7. *NPResiduos2012nacional.doc - np866.pdf* Recuperado a partir de: <http://www.ine.es/prensa/np866.pdf>.
8. Correa, John Fernando, Ruiz, Ángela Adriana y Garrote, Gil. *Estudio del tratamiento hidrotérmico de fruta de banano*. Vigo : Afinidad LXIX, Julio de 2012, Afinidad LXIX, Vol. 559, págs. 191-196.
9. *No al desperdicio, no a la escasez*. [En línea] 2014. [Citado el: 26 de 12 de 2015.] <http://www.bvcooperacion.pe/biblioteca/handle/123456789/287>.
10. *Estrategia "más alimento, menos desperdicio": Programa para la reducción de las pérdidas y el desperdicio alimentario y la valoración de los alimentos desechados*. [En línea] 2013. [Citado el: 26 de 12 de 2015.] <http://oa.upm.es/35348/>.

11. *Aplicación de la metodología de producción más limpia a los procesos de transformación de frutas y verduras - RI001726.pdf* Recuperado a partir de: <http://ri.uaq.mx/bitstream/123456789/2224/1/RI001726.pdf>.
12. Pérez Jiménez , J.A. *Estudio del pretratamiento con agua caliente en fase líquida de la paja de trigo para su conversión biológica a etanol*. [En línea] 2008. [Citado el: 17 de 1 de 2016.] <http://ruja.ujaen.es/bitstream/10953/542/1/9788484398332.pdf>.
13. Barroso Casillas , M. *Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de bioetanol en el marco de una biorrefinería*. [En línea] 2010. [Citado el: 17 de 1 de 2016.] http://oa.upm.es/10559/1/MIGUEL_BARROSO_CASILLAS.pdf.
14. Oliva Dominguez, J.M. *Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre Kluyveromyces marxianus*. [En línea] 2003. [Citado el: 17 de 1 de 2016.] <http://biblioteca.ucm.es/tesis/bio/ucm-t26833.pdf>.
15. Sanchez Riaño, A.M. y otros. *Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos*. [En línea] 2010. [Citado el: 17 de 1 de 2016.]
16. Dagnino, Eliana P. y otros. *Hidrólisis enzimática de la cascarilla de arroz pretatada con ácido diluido para evaluar la eficacia de la etapa de pretratamiento*. [En línea] [Citado el: 17 de 1 de 2016.] <http://fre.utn.edu.ar/IIJCyT/clean/files/get/item/2151..>
17. Igbinador, R.O. y Onilude, A.A. *Bioprocess systems applied for the production of bioethanol from lignocellulosic biomass of cocoa podhusk (Theobroma cacao L.) and other agricultural residues: a review*. 28 de Agosto de 2013. African Journal of Biotechnology, Vol. 12, págs. 5375-5388.
18. León Torres, Carlos y otros. *Extracción de azúcares reductores totales de "coronta" de Zea Mays "maíz amarillo duro"*. 2011. Scientia, Vol. 3, págs. 214-218.
19. Bernier Oviedo, Daniel José y Rincón Moreno, John Anderson. *Estudio de agentes inhibitorios en el proceso de fermentación en la obtención de etanol a partir de material lignocelulósico y amiláceo*. 2012. [ed.] Programa de Ingeniería Agroindustrial. s.l. : Universidad del Tolima. Facultad de Ingeniería Agronómica., pág. 121.
20. Garzón Castaño , Sandra Catalina y Henández Londoño, Catalina. *Estudio comparativo para la producción de etanol entre Saccharomyces cerevisiae silvestre,*

Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763 y *Candida utilis* ATCC 9950. [En línea] 2009.

[Citado el: 17 de 1 de 2016.]

<http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/11059/1689/1/66182G245.pdf>.

21. Fernandez Arenivar, Jacqueline Michell, Magaña Núñez, Marta María y Pineda Alfaro, Karla María. *Evaluación de la huella ecológica de la producción de bioetanol y biodiesel en el salvador*. [En línea] 2015. [Citado el: 17 de 1 de 2016.]

<http://ri.ues.edu.sv/7507/1/Evaluaci%C3%B3n%20de%20huella%20ecol%C3%B3gica%20de%20la%20producci%C3%B3n%20de%20bioetanol%20y%20biodiesel%20en%20El%20Salvador.pdf>.

22. *Biocombustibles*. [En línea] [Citado el: 26 de 12 de 2015.]

<http://www.argenbio.org/ad/uploads/pdf/biocombustibles.pdf>.

23. Elsayed B., Belal. *Bioethanol production from rice straw residues*. 2013. *Brazilian Journal of Microbiology*, Vol. 44, págs. 225-234.

24. Thakur, S. y otros. *Degradation and selective ligninolysis of wheat straw and banana stem for an efficient bioethanol production using fungal and chemical pretreatment*. 2012. *Biotechnology*, Vol. 3, págs. 365-372.

25. Waleed K., El-Zawawy y otros. *Acid and enzyme hydrolysis to convert pretreated lignocellulosic materials into glucose for ethanol production*. Egypt. 2010. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 84, págs. 865-871.

26. Santa María, M. y otros. *Assessing the feasibility of biofuel production from lignocellulosic banana waste in rural agricultural communities in Peru and Colombia*. 2013. *Bioenergy Res.*, Vol. 6, págs. 1000-1011.

27. Gabhane, Jagdish y otros. *Pretreatment of banana agricultural waste for bioethanol production: Individual and interactive effects of acid and alkali pretreatments with autoclaving, microwave heating and ultrasonication*. 2014. *Waste Management*, Vol. 34, págs. 498-503.

28. Velázquez Arredondo, H.I., Ruiz Colorado, A.A. y Del Oliveira Junior, S. *Ethanol production process from banana fruit and its lignocellulosic residues: Energy analysis*. 2010. *Energy*, Vol. 35, págs. 3081-3087.

29. Wilkins, Mark R., Suryawati, Lilis y Maness, Niels O. *Ethanol production by Saccharomyces cerevisiae and Kluyveromyces marxianus in the presence of orange peel oil*. 2007. World Journal Microbiology Biotechnology, Vol. 23, págs. 1161-1168.
30. Wilkins, Mark R., Widmer, Wilbur W. y Grohmann, Karel. *Simultaneous saccharification and fermentation of citrus peel waste by Saccharomyces cerevisiae to produce ethanol*. 2007. Process Biochemistry, Vol. 42, págs. 1614-1619.
31. Tsukamoto, Junko, Durán, Nelson y Tasic, Ljubica. *Nanocellulose and bioethanol production from orange waste using isolated microorganisms*. 2013. Journal Brazilian of Chemistry Society, Vol. 24, págs. 1537-1543.
32. *Orange peels, newspapers may lead to cheaper, cleaner ethanol fuel*. ScienceDaily. Recuperado a partir de:
<http://www.sciencedaily.com/releases/2010/02/100218090814.htm>.
33. Mora, LP y otros. *Evaluación de residuos de papa, yuca y naranja para la producción de etanol en cultivo discontinuo utilizando Saccharomyces cerevisiae*. 2015, Revista ION, Vol. 28, págs. 43-53.
34. Jesús, Martín Gil. *El futuro de los biocombustibles: biorrefinerías integradas*. 2009 Universidad de Valladolid, págs. 1-59.
35. Han, S.H. y otros. *Biobutanol production from 2 year old willow biomass by acid hydrolysis and acetone-butanol-ethanol fermentation*. 2013. Energy, Vol. 61, págs. 13-17.
36. Cheng, Chieh-Lun y otros. *Biobutanol production from agricultural waste by an acclimated mixed bacterial microflora*. 2012. Applied Energy, Vol. 100, págs. 3-9.
37. Devi Gottumukkala, Lalitha y otros. *Biobutanol production from rice straw by a non acetone producing Clostridium sporogenes BE01*. 2013. Bioresource Technology, Vol. 145, págs. 182-187.
38. Loyarkat, Sawang, Cheirsilp, Benjamas y Umsakul, Kamontam. *Decanter cake waste as a renewable substrate for biobutanol production by Clostridium beijerinckii*. 2013. Process Biochemistry, Vol. 48, págs. 1933-1941.

39. Ponthein, Watchara y Cheirsilp, Benjamas. *Development of acetone butanol ethanol (ABE) production from palm pressed fiber by mixed culture of Clostridium sp. and Bacillus sp.* 2011. Energy Procedia, Vol. 9, págs. 459-467.
40. *El sector del biogás agroindustrial en España.* [En línea] 16 de 9 de 2010. [Citado el: 26 de 12 de 2015.] http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/temas/requisitos-y-condicionantes-de-la-produccion-ganadera/DOCBIOGASVersion21-09-2010_tcm7-5925.pdf.
41. *Boletín monográfico: Energía renovable a partir de los residuos de la industria alimentaria: BIOGÁS.* [En línea] [Citado el: 26 de 12 de 2015.] http://www.fiab.es/es/zonadescargas/boletines/ARTICULO_BIOGAS.pdf.
42. Alzate, CAC y otros. *Biodegradación de residuos orgánicos de plazas de mercado.* 2007. Revista Colombiana de Biotecnología, Vol. 6, págs. 78-89.
43. Wijandari, R. y otros. *Improvement of biogas production from orange peel waste by leaching of limonene.* 2015. BioMed Research International, Vol. 2015, págs. 1-6.
44. Pei, Pei y otros. *Optimitation of NaOH pretreatment for enhancement of biogas production of banana pseudo-stem fiber using response surface methodology.* 2014. Bioresources, Vol. 9, págs. 5073-5087.
45. Gonzalez Sanchez, María E. y otros. *Residuos agroindustriales con potencial para la producción de metano mediante la digestión anaerobia.* 2015. Revista Argentina de Microbiología, Vol. 47, págs. 229-235.
46. Varela, Santiago A. y Basil, Gustavo. *Uso de compost en la producción de plantines de especies forestales.* 2011. Silvicultura en vivero, págs. 1-11.
47. Riancho, MRS y otros. *Aplicación del composteo como método de tratamiento de los residuos de frutas producidos en zonas de alta generación.* 2002. Ingeniería, Vol. 6, págs. 13-20.
48. Ramos Agüero, D. y otros. *Bocashi: abono orgánico elaborado a partir de residuos de la producción de plátanos en Bocas del Toro, Panamá.* 2014. Cultivos Tropicales, Vol. 35, págs. 90-97.

49. Asokan, Pappu y otros. *Advances in industrial prospective of cellulosic macromolecules enriched banana biofibre resources: A review*. 2015. International Journal of Biological Macromolecules, Vol. 79, págs. 449-458.
50. Kalemelawa, Frank y otros. *An evaluation of aerobic and anaerobic composting of banana peels treated with different inoculums for soil nutrient replenishment*. 2012. Bioresource Technology, Vol. 126, págs. 375-382.
51. Carranza, Jorge y Sánchez, Manuel. *Cinética de secado de Musa paradisiaca L. (plátano) y Manihot esculenta Grantz (yuca)*. 2012. [ed.] Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias. Revista Amazónica de Investigación, Vol. 2, págs. 15-25.
52. Mazzeo Meneses, Miguel y otros. *Aprovechamiento industrial de residuos de cosecha y poscosecha del plátano en el departamento de caldas*. 2010. Educación en Ingeniería, Vol. 9, págs. 128-139.
53. [En línea] [Citado el: 07 de 06 de 2016.]
<https://books.google.es/books?id=tNwOAQAIAAJ&pg=PA126&lpg=PA126&dq=%22composici%C3%B3n%22+%22pulpa+de+pl%C3%A1tano%22&source=bl&ots=FcgknFYqyy&sig=8u0D6NkewKuII8pHr5Y5quMl5ro&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwi9z4TAtpbNAhXG1RoKHQ-zB9oQ6AEIMDAD#v=onepage&q=%22composi>.
54. Intriago Flor, Frank Guillermo y Paz Mejía, Sergio Alejandro. *Ensilaje de cáscara de banano maduro con microorganismos eficaces como alternativa de suplemento para ganado bovino*. 2000. Trabajo final de grado en ingeniería agrónoma de la Universidad Earth.
55. Ferrer Mairal, A., Marques López, I. y Vercet Tormo, A. *Informe sobre las características diferenciales entre el plátano de canarias y la banana de distintas procedencias*. [En línea] 2009. [Citado el: 30 de 12 de 2015.]
http://www.sportlife.es/rcs/comun/ficheros/121/Estudio_Nutricional_Platano_de_Canarias.pdf.
56. *Efecto del tratamiento químico en las propiedades físicas y mecánicas de las fibras naturales como sustitutas de la fibra de vidrio en composites*. [En línea] [Citado el: 30 de 12 de 2015.]
<https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/17049/1/Efectos%20del%20trata>

miento%20qu%C3%ADmico%20en%20las%20propiedades%20f%C3%ADsicas%20y%20mec%C3%A1nicas%20de%20las%20fibras%20naturales%20como%20sustitutas%20de%20la%20fibra%20de%20vidrio%20en%20.

57. [En línea] [Citado el: 07 de 06 de 2016.] <http://elaboracionpapel.blogspot.com.es/>.

58. Macagnana, F.T. y otros. *Biological properties of apple pomace, orange bagasse and passion fruit peel as alternative sources of dietary fibre*. 2015. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, Vol. 6, págs. 1-6.

59. Villanueva, Z. y otros. *Comportamiento productivo de corderos de pelo alimentados con residuo fresco de naranja (Citrus sinensis) en sustitución de granos de sorgo (Sorghum vulgare)*. 2013. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, Vol. 47, págs. 27-31.

60. Lenihan, P. y otros. *Kinetic modelling of dilute acid hidrolisis of lignocellulosic biomass*. [ed.] Queen's University Belfast School of Chemistry and Chemical Engineering. Northern Ireland : *Biofuel Production*, Vol. 12, págs. 293-307.

61. A.A., Albalasmeh, A.A., Berhe y T.A., Ghezzhei. *A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry*. 2013. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 97, págs. 253-261.

62. J.F., Monsalve, V.I., Medina y A.A., Ruiz. *Producción de etanol a partir de la cáscara de banano y de almidón de yuca*. ISSN 0012-7353, 2006.

63. I.P., Wood y otros. *Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrosysates: improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay*. 2012. *Biomass and Bioenergy*, Vol. 44, págs. 117-121.

64. Alonso, S. y otros. *Physiological heterogeneity in Lactobacillus casei fermentations on residual yoghurt whey*. 2014. *Process Biochemistry*, Vol. 49, págs. 732-739.

65. Gomis, D.B. y otros. *High-performance liquid chromatographic determination of furfural and hydroxymethylfurfural in apple juices and concentrates*. 1991. *Chromatographia*, Vol. 32, págs. 45-48.

66. Aguilar Uscanga, B., Solís Pacheco, J. y Francios, J. *Influencia de los parámetros cinéticos de la fermentación en la composición y estructura de los polisacáridos*

contenidos en la pared celular de la levadura Saccharomyces cerevisiae. 2005. II encuentro de participación de la mujer en la ciencia, págs. 1-5.

67. Vejarano Mantilla, Ricardo David. *Utilización de bloqueadores metabólicos y optimización de las condiciones de aplicación para la reducción del grado alcohólico en vinos elaborados a partir de uva procedente de zonas cálidas*. 2013. Universidad Politécnica de Madrid, 2013, Tesis Doctoral, pág. 293.

68. Zheng, Yi y otros. *Dilute acid pretreatment and fermentation of sugar beet pulp to ethanol*. 2013. Applied Energy, Vol. 105, págs. 1-7.

69. Hedegaard Thomsen, Mette, Thygesen, Anders y Thomsen, Anne Belinda. *Identification and characterization of fermentation inhibitors formed during hydrothermal treatment and following SSF of wheat straw*. 2009. Appl Microbiol Biotechnol. s.l. : Biotechnological Products and Process Engineering, Vol. 83, págs. 447-455.

70. Hickert, Lilian Rquel y otros. *Simultaneous saccharification and co-fermentation of un-detoxified rice hull hydrolysate by Saccharomyces cerevisiae ICV D254 and Spathaspora arborariae NRRL Y-48658 for the production of ethanol and xylitol*. 2013. Bioresource Technology, Vol. 143, págs. 112-116.

71. Almeida, Joao R.M. y otros. *NADH vs NAPH-couple reduction of 5-hydroxymethyl furfural (HMF) and its implications on product distribution in Saccharomyces cerevisiae*. 2008. Appl Microbiol Biotechnol, Vol. 78, págs. 939-945.

72. Lewis Liu, Z., Ma, Menggen y Song, Mingzhou. *Evolutionarily engineered ethanologenic yeast detoxifies lignocellulosic biomass conversion inhibitors by reprogrammed pathways*. 2009. Mol Genet Genomics, Vol. 282, págs. 233-244.

73. Sela Barrial, Andrés. *Hidrólisis de residuos lignocelulósicos procedentes del comercio de frutas y hortalizas como paso previo a la producción de bioetanol*. 2015. Escuela Politécnica de Ingeniería de Gijón, Trabajo final de grado, págs. 1-118.

74. Ramírez Hernández, A. y otros. *Thermal behavior of banana starch films with degraded polyethylene terephthalate*. 2015. Revista Mexicana de Ingeniería Química, Vol. 14, págs. 513-521.

75. Araya Quesada, Yorleny y otros. *Potencial tecnológico de harina de plátano verde con cáscara como sustituto de la grasa para geles cárnicos*. 2014. Vol. 50, págs. 50-60.
76. Maha M. , Ibrahim y otros. *Banana fibers nad microfibrils as lignocellulosic reinforcements in polymer composites*. 2010. Carbohydrate Polymers, Vol. 81, págs. 811-819.
77. Babbar, Neha y otros. *Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues*. 2011. Food Research International, Vol. 44, págs. 391-396.
78. Naranjo, Javier M., Cardona, Carlos A. y Higueta, Juan C. *Use of residual banana for polyhydroxybutyrate (PHB) production: Case of study in an integrated biorefinery*. 2014. Waste Management, Vol. 34, págs. 2634-2640.
79. Oliveira, Lúcia y otros. *Lipophilic extracts from banana fruit residues: A source of valuable phytosterols*. 2008. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol. 56, págs. 9520-9524.
80. *Composición química y compuestos bioactivos de las harinas de cáscara de naranja, mandarina y toronja cultivadas en Venezuela*. [En línea] 2005. [Citado el: 30 de 12 de 2015.] http://www.alanrevista.org/ediciones/2005-3/composicion_quimica_bioactivos_harinas_naranja_mandarina_toronja.asp.
81. Martínez, Olga y otros. *Desarrollo y evaluación de un postre lácteo con fibra de naranja*. 2008. Vitae. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica, Vol. 15, págs. 219-225.
82. M., Alicia, V.A., Marina y P., Fanny. *Composición química y compuestos bioactivos de las harinas de cáscara de naranja (Citrus sinensis), mandarina (Citrus reticulada) y toronja (Citrus paradisi) cultivadas en Venezuela*. [En línea] [Citado el: 3 de 1 de 2016.] http://www.alanrevista.org/ediciones/2005-3/composicion_quimica_bioactivos_harinas_naranja_mandarina_toronja.asp.
83. <http://es.biomass-china.com/wood-chips-dryer/18241361.html>. <http://es.biomass-china.com/wood-chips-dryer/18241361.html>. [En línea] [Citado el: 30 de 3 de 2016.] <http://es.biomass-china.com/wood-chips-dryer/18241361.html>.

84. <http://www.slideplayer.es/slide/24575/>. *http://www.slideplayer.es/slide/24575/*. [En línea] [Citado el: 30 de 03 de 2016.] <http://www.slideplayer.es/slide/24575/>.

85. <http://www.foodnewlatam.com>. *http://www.foodnewlatam.com*. [En línea] [Citado el: 30 de 03 de 2016.] <http://www.foodnewlatam.com/inocuidad/53-control-calidad/3198-higienizaci%C3%B3n-por-cavitaci%C3%B3n-limpieza-ultras%C3%B3nica.html>.

86. <http://es.chinacyjx.com>. *http://es.chinacyjx.com*. [En línea] [Citado el: 30 de 03 de 2016.] http://es.chinacyjx.com/products_detail_yyzx/&productId=ce7739a8-e857-4974-9d4a-583e6066f5bb.html.

87. Arroyo Orbegoso, Alexis Germán. *Producción de enzimas pectinasas por actinomycetos en cultivo sumergido utilizando pectina y cáscara de naranja*. [En línea] [Citado el: 07 de 06 de 2016.] http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/tesis/salud/arroyo_o_a/cap_2.pdf.