

**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA**

**“OBTENCIÓN DE BIOETANOL A  
PARTIR DE HIDROLIZADOS DE  
RESIDUOS DE FRUTA”**

**TRABAJO FIN DE MASTER**

**POR**

**CELIA HERNÁNDEZ GALINDO**

**JULIO, 2017**





**PROFESOR TUTOR:**

Dña. Adriana Laca Pérez (Universidad de Oviedo)

Dña. Ana Isabel Díaz González (Universidad de Oviedo)

**CERTIFICA:**

Que D. **Celia Hernández Galindo** ha realizado bajo nuestra dirección el Trabajo Fin de Master al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, 11ª promoción curso 2016-2017.

Oviedo, 14 de Julio de 2017

Dña. Adriana Laca Pérez

Dña. Ana Isabel Díaz González

VºBº

Manuel Rendueles de la Vega

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

## ***Agradecimientos***

*A la doctora Adriana Laca, por transmitirme sus conocimientos, guiarme en la realización de este trabajo y por estar siempre dispuesta a ayudarme y aconsejarme.*

*A Ana Díaz, mi cotutora, por todos los consejos, la dedicación, las horas empleadas, su enorme disponibilidad, su positividad y por el gran esfuerzo dedicado en este trabajo.*

*Al personal del laboratorio, en especial a Amanda Laca por su ayuda desinteresada, sus ganas de enseñar y por el empeño que pone en la búsqueda de soluciones o explicaciones.*

*A Franco, por los días que abríamos y cerrábamos el laboratorio, por su disposición a echar una mano, aunque él tuviese más trabajo, y por hacer esta experiencia mucho más amena.*

*A los compañeros del máster, por el sufrimiento y las alegrías compartidas, las tardes de clase, las comidas en la facultad, los días en el laboratorio, y por hacer de este año un bonito recuerdo.*

*Por supuesto a mis padres, por el enorme esfuerzo que hacen día tras día para que yo pueda llegar a ser lo que me proponga, y por creer en mí.*

*Y, por último, y no menos importante, a Isa por animarme, apoyarme y acompañarme en este viaje.*

# ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
LISTA DE FIGURAS.....	3
LISTA DE TABLAS.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	6
2. MARCO TEÓRICO.....	13
2.1. Biocombustibles.....	13
2.1.1. ¿Qué son los biocombustibles?.....	13
2.1.2. Producción de biocombustibles.....	13
2.1.3. Tipos de biocombustibles según la materia prima utilizada.....	13
2.2. Bioetanol.....	16
2.3. Materias primas para la producción de bioetanol: Carbohidratos.....	16
2.3.1. ¿Qué son los carbohidratos?.....	16
2.3.2. Tipos de carbohidratos.....	17
2.3.3. Tipos de materias primas.....	20
2.3.4. Biomasa lignocelulósica.....	20
2.4. Obtención de bioetanol a partir de material lignocelulosósico.....	23
2.4.1. Pretratamiento.....	24
2.4.2. Hidrólisis.....	27
2.4.3. Compuestos inhibidores y métodos de eliminación.....	30
2.4.4. Fermentación.....	32
2.4.5. Destilación y deshidratación.....	34
2.5. Generación de residuos agroalimentarios.....	34
2.5.1. Desperdicio de alimentos.....	35
2.5.2. Generación de residuos según el nivel social.....	35
2.5.3. Generación de residuos por grupo de alimentos.....	37
2.5.4. Consecuencias derivadas del desperdicio de alimentos.....	38
2.6. Recogida selectiva de biorresiduos.....	39
2.6.1. Recogida selectica de biorresiduos en Asturias.....	40
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
3.1. Substratos utilizados.....	41
3.2. Preparación de materiales no sometidos a hidrólisis.....	42
3.3. Pretratamientos de hidrólisis a 120°C, 128°C y 135°C.....	43

3.4.	Tratamiento de fermentación .....	44
3.4.1.	Material de partida .....	44
3.4.2.	Condiciones de la fermentación .....	45
3.4.3.	Toma de muestras y análisis.....	45
3.4.4.	Análisis microbiológico .....	46
3.5.	Tratamiento para la extracción de azúcares potenciales.....	46
3.6.	Métodos para la cuantificación de azúcares .....	47
3.6.1.	Método Fenol-Sulfúrico para la cuantificación de azúcares totales. ....	48
3.6.2.	Método ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) para la cuantificación de azúcares reductores. ....	49
3.6.3.	Cálculo de azúcares .....	51
3.7.	Determinación del contenido en humedad .....	51
3.8.	Determinación del contenido en inhibidores .....	52
3.9.	Determinación del contenido en bioetanol .....	54
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	56
4.1.	Caracterización de los sustratos .....	56
4.1.1.	Contenido de humedad.....	56
4.2.	Contenido en azúcares potenciales reductores .....	57
4.3.	Extracción de azúcares reductores .....	59
4.3.1.	Sin tratamiento de hidrólisis (“en fresco”) .....	59
4.3.2.	Con tratamientos hidrotérmicos .....	62
4.3.3.	Eficacia de extracción .....	69
4.4.	Determinación de la concentración de inhibidores tras el tratamiento de hidrólisis ...	70
4.4.1.	Furfural.....	71
4.4.2.	Hidroximetilfurfural (HMF).....	73
4.4.3.	Ácido acético.....	74
4.5.	Proceso fermentativo.....	77
4.5.1.	Caracterización del sustrato de partida.....	77
4.5.2.	Azúcares .....	79
4.5.3.	Etanol .....	81
4.5.4.	pH.....	84
4.5.5.	Microbiología.....	85
5.	CONCLUSIONES .....	87
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	88



## RESUMEN

La población mundial es dependiente de la energía, la cual está basada casi al 90% en los combustibles fósiles y la energía nuclear. Pero en las últimas décadas, con el aumento de la población y el uso masivo de las tecnologías, comenzó a crecer la preocupación por el agotamiento de las reservas de petróleo y el deterioro ambiental. Sumado a la creciente producción de residuos, con necesidad de revalorizarse, ha surgido la necesidad de analizar la posibilidad de producir biocombustibles a partir de residuos.

Con el objetivo de reducir ambos problemas, este proyecto forma parte de una línea de investigación con biocombustibles utilizando, como materia prima para generarlos, residuos, en lugar de cultivos con función alimentaria, lo que evita problemas éticos. Para ello, residuos de fruta del supermercado (cáscara y pulpa de plátano y cáscara de naranja) se sometieron a pretratamientos hidrotérmicos a diferentes condiciones, 120°C, 128°C y 135°C, con el fin de analizar el proceso que maximiza la cantidad extraída de azúcares fermentables. En los caldos obtenidos se midió la concentración de compuestos inhibidores (furfural, HMF y ácido acético) que tienen potencialidad de inhibir el proceso fermentativo. Para finalmente realizar un ensayo de fermentación para el caso de la pulpa de plátano.

Para la cáscara de naranja, ninguno de los tratamientos aumenta la concentración de azúcares reductores. En la cáscara de plátano, el tratamiento con mejores resultados fue a 120°C, con una eficacia del 43%, mientras que en la pulpa de plátano las condiciones óptimas fueron a 135°C, llegando a obtenerse una eficacia del 90%. La concentración de azúcares fermentables conseguida, fue mayor en este último caso, con el que se extraen 36,8 g/100 g de residuo seco, escogiéndose por tanto el mismo, para realizar la fermentación.

Al medir los compuestos inhibidores, se ha detectado presencia de los tres en algunas muestras, pero a concentraciones muy por debajo de la concentración mínima inhibitoria, por lo que no suponen ningún impedimento en el proceso fermentativo.

Por último, en la fermentación se observó la disminución de la concentración de azúcares, a medida que se producía etanol por parte de las levaduras, consiguiendo una concentración final de 1,69% (v/v) con un rendimiento de la fermentación del 70.



## ABSTRACT

The world's population is dependent on energy, which is based, almost 90%, on fossil fuels and nuclear energy. In the last decades, with the increase of population and the massive use of technologies, it began to grow concern about the depletion of oil reserves and environmental damage. Besides there is an increasing production of wastes that need to be reevaluated. For these reasons, the possibility of producing biofuels from wastes should be considered.

With the objective of reducing both problems, this project is included in a research line that analyzed the production of biofuels using wastes as raw material, instead of crops with food function, which avoids ethical problems. For this, supermarket fruit wastes (banana peel, banana pulp and orange peel) were subjected to hydrothermal pretreatment AT different conditions, 120°C, 128°C and 135°C, in order to select the process which maximizes the amount of fermentable sugars extracted. The concentrations of inhibitory compounds (furfural, HMF, and acetic acid), which have potential to inhibit the fermentation process, were measured in the obtained broths. finally, a fermentation of the banana pulp broth was carried out.

In the case of orange peel, none of the treatments increased the concentration of reducing sugars. For the banana peel, the treatment with the best results was at 120°C, with an efficiency of 43%. For the banana pulp the optimal conditions were at 135°C, reaching an efficiency of 90%. The concentration of fermentable sugars obtained was higher in this last case, obtaining 36.8 g/ 100 g of dry residue. Therefore, this case was chosen to carry out the fermentation.

When measuring the inhibitory compounds, the presence of the three was detected in some samples, but at levels lower than the minimum inhibitory concentrations, so they do not suppose any impediment for the fermentative process.

Finally, in the fermentation the decrease of sugar concentration was observed, as ethanol was produced by the yeasts, getting a final concentration of 1.69% (v/v), with a fermentation yield of 70.3%.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Consumo de energía primaria en 2015 en España. Fuente: APPA, 2015. ....	6
Figura 2. Perspectivas de crecimiento de la demanda mundial de energía primaria. Fuente: AIE y D. Secretaría Técnica de Repsol, 2013. ....	7
Figura 3. Estructura básica de los carbohidratos.. ....	17
Figura 4. Estructura de la glucosa y la fructosa.....	18
Figura 5. Estructura de la sacarosa y la lactosa .....	18
Figura 6. Estructura del almidón .....	19
Figura 7. Participación del grupo aldehído en disacáridos reductores y no reductores..	19
Figura 8. Estructura de la celulosa .....	21
Figura 9. Estructura de la hemicelulosa. ....	22
Figura 10. Precursores de la estructura de la lignina.....	22
Figura 11. Esquema general de la estructura del material lignocelulósico .....	23
Figura 12. Esquema del proceso de generación de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica. ....	24
Figura 13. Representación esquemática del proceso de pretratamiento .....	24
Figura 14. Representación esquemática del proceso de hidrólisis. ....	28
Figura 15. Principales compuestos de degradación originados en el pretratamiento e hidrólisis de la biomasa lignocelulósica. ....	31
Figura 16. Reacción de fermentación de la glucosa. ....	33
Figura 17. Pérdida y desperdicio de alimentos per cápita (Kg/años, en las fases de consumo y pre-consumo, según diferentes áreas geográficas. ....	37
Figura 18. Distribución de las pérdidas de fruta y hortalizas en las diferentes etapas de la cadena alimentaria de diferentes áreas geográficas. ....	38
Figura 19. Jerarquía de gestión de residuos aplicada a los Biorresiduos. Fuente: MAPAMA, 2013 .....	40
Figura 20. Cáscara de naranja, de plátano y pulpa de plátano cortada en trozos de 2 mm. .....	43
Figura 21. Muestras de pulpa de plátano trituradas junto con agua destilada, antes y después del tratamiento hidrotérmico.....	44
Figura 22. Muestras de pulpa de plátano trituradas junto con agua destilada, antes, y después del tratamiento a 135°C.....	45
Figura 23. Muestras de cáscara de plátano para medir azúcares potenciales, antes de meter al autoclave, y después del tratamiento. ....	47
Figura 24. Curva de calibración para determinar los azúcares totales. ....	48
Figura 25. Patrones de glucosa para realizar la curva de calibrado de los azúcares totales.....	49
Figura 26. Curva de calibración para determinar los azúcares reductores. ....	50
Figura 27. Patrones de glucosa para realizar la curva de calibrado de los azúcares reductores.....	50



Figura 28. Muestras por triplicado de los diferentes residuos resultado de la fase de deshidratación en la estufa a 60°C durante 48 horas, antes, y después de meter en la estufa.....	52
Figura 29. Cromatógrafo Agilent 1200 .....	53
Figura 30. Cromatógrafo de gases CLARUS 400 (Perkin Elmer) .....	54
Figura 31. Curva de calibración del etanol.....	55
Figura 32. Azúcares potenciales en cada uno de los sustratos. ....	58
Figura 33. Azúcares potenciales, totales y reductores obtenidos a partir de los residuos sin tratar.....	62
Figura 34. Azúcares totales, reductores y potenciales a partir de residuos tratados por hidrólisis térmica a 120°C y a partir de residuos sin tratar.. ....	64
Figura 35. Azúcares totales, reductores y potenciales a partir de residuos tratados por hidrólisis térmica a 128°C y a partir de residuos sin tratar.. ....	66
Figura 36. Azúcares totales, reductores y potenciales a partir de residuos tratados por hidrólisis térmica a 135°C y a partir de residuos sin tratar.....	67
Figura 37. Variación del porcentaje de extracción de azúcares reductores en función de la temperatura en las diferentes muestras analizadas. ....	70
Figura 38. Presencia y concentración de furfural e HMF detectado mediante HPLC. ..	71
Figura 39. Concentraciones de furfural, HMF y ácido acético de las muestras sometidas a tratamiento hidrotérmico y la muestra de pulpa de plátano tratado con el método de análisis de azúcares potenciales.....	76
Figura 40. Azúcares totales, reductores y potenciales de la muestra de pulpa de plátano utilizada como sustrato en la fermentación, sin realizar tratamiento y después de someter a tratamiento hidrotérmico a 135°C .....	78
Figura 41. Evolución de la concentración de azúcares totales y reductores a lo largo del proceso fermentativo .....	80
Figura 42. Concentración de etanol correspondiente al tiempo final de la fermentación. ....	82
Figura 43. Evolución de la concentración de etanol durante el proceso fermentativo... 83	
Figura 44. Evolución de la concentración de azúcares totales y de etanol, durante la fermentación .....	84
Figura 45. Evolución del pH a lo largo de la fermentación.....	85
Figura 46. Observación en placa de colonias de <i>S. cerevisiae</i> , correspondiente a las 62 horas de fermentación.....	86



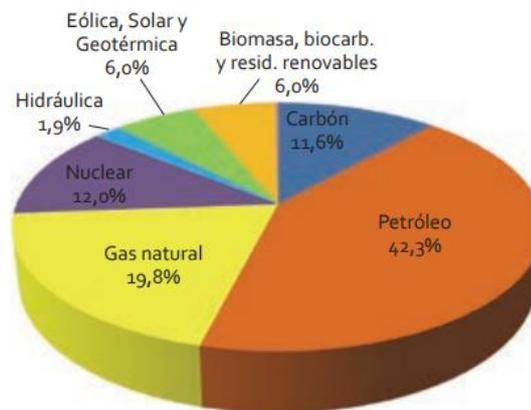
## **LISTA DE TABLAS**

Tabla 1. Composición de la cáscara de naranja, pulpa de plátano y cáscara de naranja, expresada en porcentaje de materia seca. Fuentes: USDA; Granda et al., 2005; Lenihan et al., 2011; García et al., 2012; ASPROCAN, 2016. ....	41
Tabla 2. Humedad de los substratos expresado en porcentaje .....	56
Tabla 3. Resultado del análisis de los azúcares potenciales .....	58
Tabla 4. Resultado de las muestras sin tratar (“en fresco”).....	60
Tabla 5. Concentración de azúcares totales y reductores y su relación expresado en porcentaje, de los residuos tras el tratamiento hidrotérmico a 120°C. ....	63
Tabla 6. Concentración de azúcares totales y reductores y su relación expresado en porcentaje, de los residuos tras el tratamiento hidrotérmico a 128°C. ....	65
Tabla 7. Concentración de azúcares totales y reductores y su relación expresado en porcentaje, de los residuos tras el tratamiento hidrotérmico a 135°C. ....	66
Tabla 8. Porcentaje de extracción de azúcares reductores en las muestras sometidas a los diferentes tratamientos hidrotérmicos. ....	69
Tabla 9. Concentración de furfural en ppm, y área determinada por análisis mediante HPLC. ....	72
Tabla 10. Concentración de hidroximetilfurfural (HMF) en ppm, y área determinada por análisis mediante HPLC. ....	73
Tabla 11. Concentración de ácido acético en ppm, y área determinada por análisis mediante HPLC. ....	75
Tabla 12. Azúcares totales, reductores y potenciales expresados en g azúcar/100 g de residuo seco, de la muestra de pulpa de plátano utilizada como sustrato en la fermentación, sin realizar tratamiento y después de someter a tratamiento hidrotérmico a 135°C. También se indica la relación de azúcares reductores y totales, y el porcentaje de extracción.....	77
Tabla 13. Concentraciones azúcares totales y reductores antes de iniciar la fermentación y del tiempo final de la misma, expresadas en g de azúcar en 100 g de residuo seco. También se indica el porcentaje de relación de azúcares reductores y totales. ....	79



# 1. INTRODUCCIÓN

Desde el inicio de los tiempos hasta la actualidad, el ser humano ha tenido distintas necesidades como proveerse de luz, fuego, comida, etc. Por tanto, abastecerse de energía ha sido una de las preocupaciones más importantes. En un principio, el hombre utilizaba los animales, los vegetales, la fuerza del viento y del agua para obtener energía. Sin embargo, tras el desarrollo industrial, pasó a utilizar como fuente de energía, recursos fósiles como el carbón, el petróleo y el gas natural (De Juana et al., 2003).

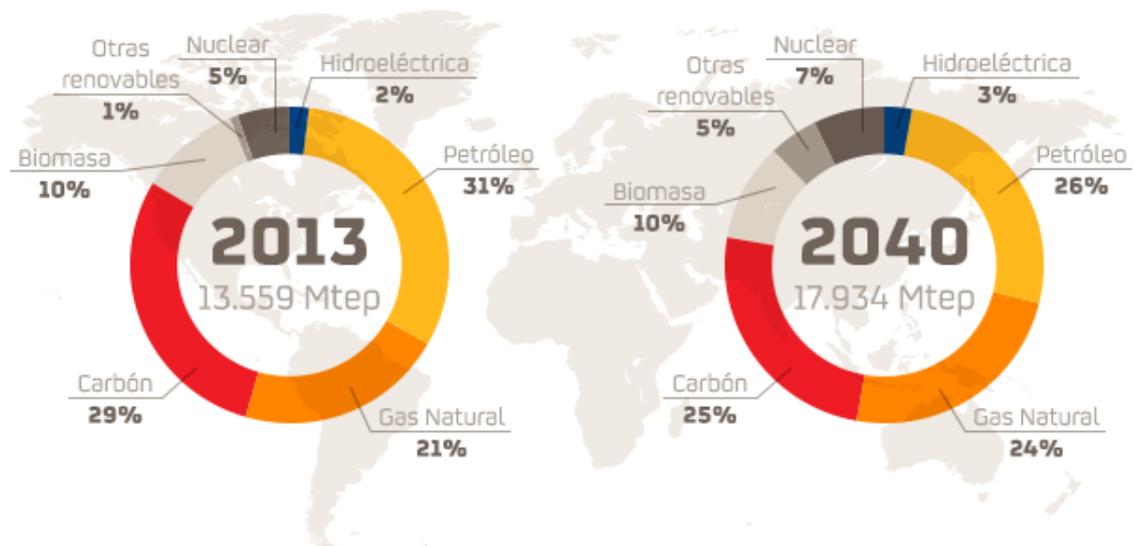


**Figura 1. Consumo de energía primaria en 2015 en España. Fuente: APPA, 2015.**

Actualmente, los combustibles fósiles y la energía nuclear proporcionan aproximadamente el 86% de la energía que se utiliza en todo el mundo (Palomino et al., 2010). Concretamente en España, en el año 2015, el 73.8% de la energía primaria se obtuvo a partir de combustibles fósiles (carbón, petróleo y gas natural) y el 12.1% de la energía nuclear, como se refleja en la Fig. 1.

Los combustibles fósiles constituyen una fuente de energía no renovable y de naturaleza finita. Se estima que las reservas actuales durarán entre 41 y 700 años, dependiendo de los avances tecnológicos y de las tasas de producción y consumo (Orlando et Chaparro, 2009). El aumento de la población, así como el uso masivo de las tecnologías, ha desencadenado que estas fuentes de energía sean cada vez más escasas, y, por tanto, se ha producido un incremento del precio de las mismas.

Cabe destacar que, en España, a pesar de que los combustibles fósiles presentan una fuente importante de energía, se ha mostrado una tendencia a aumentar el consumo de energías renovables, y disminuir el de petróleo y gas natural desde el año 2008 hasta el 2015. La energía nuclear y la procedente del carbón permanecen más estables (APPA, 2015). Esta tendencia se estima también para la demanda mundial de energía, como se observa en la Fig. 2, donde se produce una disminución en la demanda mundial de petróleo, pasando del 31% en el año 2013, al 26% estimado para el 2040. Así mismo, se prevé un aumento del 4% en el uso de las energías renovables, donde se incluyen los biocombustibles.



**Figura 2. Perspectivas de crecimiento de la demanda mundial de energía primaria.**  
Fuente: AIE y D. Secretaría Técnica de Repsol, 2013.

Por otro lado, el empleo de combustibles fósiles causa un importante deterioro ambiental, principalmente por la elevada emisión de gases de efecto invernadero. Tanto por su agotamiento como por su impacto negativo sobre el medio ambiente, en los últimos años se ha generado un gran interés hacia el desarrollo de energías alternativas basadas en recursos naturales renovables y menos contaminantes, como luz solar, agua y la bioenergía proveniente de los biocombustibles (Alarcón, 2010).

Por biocombustibles, se entienden aquellos combustibles que se obtienen de biomasa, es decir, cualquier tipo de materia orgánica que haya tenido su origen inmediato en el proceso biológico de organismos recientemente vivos, como plantas, o sus desechos metabólicos, como el estiércol (Dermirbas, 2009). La grasa animal también se puede utilizar como materia prima para los biocombustibles, pero es menos



habitual (Alarcón, 2010). Por tanto, el término biocombustible sirve para denominar al grupo de productos energéticos y materias primas renovables que se originan a partir de materia prima de origen orgánico. Incluyen el bioetanol, el biobutanol, el biodiesel, los aceites vegetales, el biometanol, los aceites de pirolisis, el biogás y el biohidrógeno (Dermirbas, 2009).

Para que la producción de un biocombustible sea viable, tiene que cumplir los siguientes requisitos: suponer beneficios ambientales con respecto a los combustibles fósiles y competir con ellos económicamente, tener una producción suficiente como para satisfacer la demanda, y producir una ganancia energética en comparación con la invertida en el proceso de producción (Orlando et Chaparro, 2009).

La historia de los biocombustibles se inicia con la idea de emplear aceites vegetales como combustible para motores de combustión interna. Fue el Dr. Rudolf Diesel quien desarrolló en el año 1895 el primer motor diésel, previsto para aceites vegetales. Años después, en 1908, Henry Ford hizo el primer diseño de su automóvil, preparado para utilizar etanol como combustible. A principios de los años veinte, la empresa Standard Oil empleó en sus motores, una mezcla de etanol y gasolina. Sin embargo, el alto coste del maíz, su almacenamiento, y la irrupción del petróleo a un precio más económico, hicieron que hasta 1938 no se emplease por primera vez como biocombustible en el transporte público. Con las crisis de precios del petróleo vividas desde la década de los setenta y el posible agotamiento de los recursos no renovables, se han ido afianzando los biocombustibles como una alternativa prometedora (Salinas et Gasca, 2009).

En España, el consumo de biocombustibles como el bioetanol fue de 296.502 toneladas en el año 2015. La generación de bioetanol en las plantas de producción existentes en España se incrementó un 9% con respecto a 2014, hasta alcanzar 390.109 toneladas. El 57% de producción se destinó al mercado doméstico, mientras que el resto fue exportado (APPA, 2015).

El marco legal entorno a los biocombustibles, también es protagonista del impulso de estas nuevas tecnologías. Durante 2015, en la Unión Europea se introdujo un límite de 7% sobre la energía renovable procedente de cultivos de alimentos y forrajes en el sector del transporte. Para el año 2020, los carburantes obtenidos a partir de cultivos agrícolas no deberían sumar más del 7% del consumo energético del transporte,



Universidad de Oviedo

con el objetivo de liberar las tierras de cultivo para alimentos y recortar las emisiones de gases de efecto invernadero causadas por el aumento del uso de tierra para producir biocombustibles (OCDE/FAO, 2016).

Desde el punto de vista económico, en el año 2015, los precios mundiales del bioetanol y del biodiesel continuaron en declive como resultado de la disminución de los precios del petróleo y de las materias primas para biocombustibles. En ese mismo año, aumentó la demanda de estos biocombustibles en el sector del transporte debido sobre todo a la influencia de las políticas nacionales, las cuales crearon normativas específicas obligando al uso de mezclas de biocombustibles con gasolina en las principales economías. También, el aumento de la demanda se debió al constante uso de combustible en todo el mundo. Se espera que en los próximos años los precios internacionales se recuperen y la producción mundial de bioetanol aumente todavía más (OCDE/FAO, 2016).

Las materias primas empleadas para la producción de bioetanol son habitualmente el azúcar, el trigo, el maíz y las semillas oleaginosas. Dependiendo de la materia prima utilizada para su producción, estos se clasifican en: biocombustibles de primera generación, de segunda generación y de tercera generación (Salinas et Gasca, 2009).

Los biocombustibles líquidos de primera generación (a partir de cultivos básicos que pueden destinarse a la alimentación humana o del ganado) son los más utilizados. Hoy en día se está produciendo aproximadamente el equivalente a 20 millones de toneladas de petróleo, lo que significa el 1% del consumo mundial total (Salinas et Gasca, 2009).

La posibilidad de utilizar estos recursos tanto para alimentación como para la producción de biocombustibles ha generado gran controversia.

En este contexto se enmarcan las declaraciones de los agricultores europeos, quienes afirman que la reciente subida de precios de los productos alimenticios, no se debe a la utilización de estos para generar biocombustibles. Según ellos, la principal razón es la demanda de productos alimenticios y a la escasez de cosechas, puesto que actualmente la población destina más dinero en productos alimenticios que en décadas pasadas, aumentando así la demanda de los mismos. Además, manifiestan que la



Universidad de Oviedo

agricultura de la UE tiene capacidad para producir biocombustibles sin poner en peligro la seguridad alimentaria, ya que solo una pequeña parte de los cereales y oleaginosas se utiliza para producir biocombustibles, y la mayoría se destina al sector alimenticio (COPA-COGECA, 2009)

Contrariamente a la opinión de los agricultores, destacan las declaraciones de Jean Zigler, profesor de la Universidad de Ginebra y relator especial de la alimentación para la ONU. El profesor Zigler afirma que el uso de plantaciones de alimentos para generar biocombustible constituye un “crimen contra la humanidad tomando en cuenta que mil millones de personas sufren hambre en el mundo” (González et al., 2008). Según sus afirmaciones, no solamente los recursos contra el hambre en el mundo son insuficientes, ahora también la generación de alimentos lo será como consecuencia del aumento en la producción de biocombustibles por parte de países desarrollados para así alcanzar sus objetivos en el consumo interno de este tipo de combustible alternativo.

En la misma línea, en los foros mundiales se levantaron voces de protesta en base a que el uso de alimentos como materias primas para generar biocombustibles estaba encareciendo los alimentos, como es el caso de Donald Mitchell. En este caso, Mitchell afirma que la gran producción de biocombustibles en Europa y Estados Unidos ha sido la principal razón para el aumento del precio de los alimentos a nivel mundial. Este aumento se fundamenta en que algunos países como Estados Unidos obligan a competir a los centros de suministro de alimentos con las estaciones de combustible, debido a que ambos demandan el maíz ya sea como producto alimenticio o como materia prima para la producción de bioetanol (González et al., 2008).

A esto, también hay que sumarle otros inconvenientes como la gran cantidad de agua que se consume para regar los cultivos destinados a la producción de bioetanol, los agroquímicos utilizados en los mismos y la deforestación que ha generado este tipo de cultivo, entre otros. Todo ello ha provocado la búsqueda de una alternativa a la utilización de estos biocombustibles que utilizan cultivos alimenticios (Salinas et Gasca, 2009).

Como solución a este problema, se presentan como alternativa los biocombustibles de segunda y de tercera generación. Los biocombustibles de segunda generación se obtienen de materias primas que no tienen una función alimentaria y de biomasa procedente de la basura de desechos industriales o de consumo. Debido a que



Universidad de Oviedo

se obtienen de materias primas no alimentarias, se pueden cultivar en tierras marginales u obtener de bosques, lo que evita el gasto de agua de riego que se produce con los biocombustibles de primera generación (FAO, 2008). En los biocombustibles de tercera generación se utilizan microalgas como fuente de materia prima, pero este tipo de biocombustible se encuentra actualmente en vías de investigación, aún lejos de su comercialización (Alarcón, 2010).

Otro aspecto importante a tener en cuenta, es que la cantidad de residuos agroalimentarios generados a nivel mundial cada vez es mayor. En Europa, se desecha una tercera parte de los alimentos producidos, y la acumulación de estos residuos orgánicos no solo genera una amplia y negativa problemática ambiental por el deterioro gradual del medio, sino que también desde el punto de vista económico, eleva los costes de recolección, transporte y disposición final. Concretamente los residuos agroindustriales se constituyen como la biomasa más abundante del planeta y su uso presenta un amplio potencial debido a que son sustratos renovables y no presentan ningún valor comercial (Murillo et al., 2016).

El empleo de estos residuos para la producción de biocombustibles de segunda generación 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 (Correa et al, 2012). Por ejemplo, los excedentes derivados de frutas durante el proceso agroindustrial son ricos en componentes como el almidón, celulosa, hemicelulosa y lignina, constituyendo una buena fuente para la obtención de azúcares que pueden ser reutilizados para compostaje, alimentación animal, producción de biocombustibles, etc.

Considerados los beneficios de los biocombustibles frente a los combustibles fósiles, los conflictos a raíz de la materia prima empleada para su obtención y en vista a la nueva legislación europea, se ha planteado el siguiente proyecto, donde se investiga el uso de residuos de venta de frutas como materia prima alternativa para la producción de bioetanol. Así, se obtendría un biocombustible con potencial para contribuir a la sustitución de los combustibles fósiles sin afectar a las reservas de alimentos, con un balance positivo de energía y un impacto ambiental mínimo, permitiendo a su vez, la revalorización de estos residuos.



Universidad de Oviedo

La producción de bioetanol a partir de residuos de fruta implica el desarrollo de tres etapas fundamentales: el pretratamiento e hidrólisis de los residuos, el proceso fermentativo y la destilación. Este proyecto se centra en la realización de las etapas de pretratamiento y fermentación, es decir, en el desarrollo de procesos de hidrólisis necesarios para que los carbohidratos complejos presentes en los sustratos se hidrolicen a azúcares fermentables y en la fermentación de los mismos para la obtención de bioetanol.

Los objetivos concretos de este proyecto son:

- Ensayar diferentes pretratamientos de hidrólisis hidrotérmica para los residuos evaluados y analizar los resultados obtenidos.
- Seleccionar el mejor pretratamiento y llevar a cabo un proceso fermentativo con los residuos seleccionados.
- Determinar la cantidad de bioetanol obtenido y evaluar la utilización de estos residuos para la producción de biocombustibles.



## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Biocombustibles**

#### **2.1.1. ¿Qué son los biocombustibles?**

Según la FAO, el biocombustible es aquel combustible que se produce directa o indirectamente a partir de la biomasa. Algunos ejemplos de biocombustible son: la leña, el carbón vegetal, el bioetanol, el biodiesel o el biohidrógeno (FAO, 2013).

En la actualidad, se ha prestado mayor atención a los biocombustibles líquidos (bioetanol, biodiesel y aceite vegetal ordinario), utilizados mayormente por el sector de los transportes, los cuales constituyen alrededor del 3% del combustible mundial. Según la Agencia Internacional de Energía, en 2050, se espera que el 27% del total mundial del combustible destinado al transporte provenga de los biocombustibles.

#### **2.1.2. Producción de biocombustibles**

Los biocombustibles producidos a mayor escala son el bioetanol y el biodiesel. Cerca del 85% de la producción de biocombustibles líquidos está representada por el bioetanol, siendo Brasil y Estados Unidos los dos mayores productores con cerca del 90% de la producción mundial. El 10% restante se reparte entre Canadá, China, la Unión Europea y la India. En cuanto al biodiesel, la producción se concentra principalmente en la Unión Europea, con cerca del 60% de la producción. Otros productores importantes son Estados Unidos, China, La India, Indonesia y Malasia.

#### **2.1.3. Tipos de biocombustibles según la materia prima utilizada**

Dependiendo del tipo de biomasa que se utilice para generar los biocombustibles, se establece la siguiente clasificación:

##### **➤ Biocombustibles de primera generación**

Aquellos generados utilizando cultivos básicos que pueden destinarse a la alimentación humana o del ganado, como azúcar o almidón (en el caso del bioetanol) y cultivos de semillas oleaginosas (en el caso del biodiésel). Dentro de éstas últimas se



Universidad de Oviedo

engloban el ricino, la palma, la soja, el girasol, la colza y el coco. También se puede utilizar grasa animal extraída del procesamiento del pescado y otros animales (Alarcón, 2010).

Este tipo de biocombustible está generando últimamente una gran polémica debido a que constituye una nueva fuente de demanda de productos agrícolas. Por un lado, promete la generación de ingresos y creación de empleos. Pero al mismo tiempo, genera competencia cada vez más fuerte por los recursos naturales, sobre todo la tierra y el agua. La competencia por la tierra se convierte en un problema mayor cuando algunos de los cultivos que actualmente se cosechan para producir alimentos y pienso, se destinan a la producción de biocombustibles, o cuando las tierras agrícolas orientadas hacia la producción de alimentos, se destinan a la producción de biocombustibles. A esto, hay que sumarle las importantes repercusiones que se crean en los mercados agrícolas aumentando las preocupaciones acerca del efecto negativo para la seguridad alimentaria de millones de personas (Zhang et al., 2003).

#### ➤ Biocombustibles de segunda generación

Incluye aquellos realizados a partir de materia prima proveniente de biomasa lignocelulósica, que no tiene función alimenticia. Este tipo de biomasa es el material biológico que más abunda en la tierra. Los desechos de celulosa, sobre todo productos de desecho de la agricultura y la silvicultura, los desechos de procesos de elaboración y las partes orgánicas de desperdician municipales, son fuentes posibles de materia prima. A estos hay que sumarle los cultivos celulósicos como las plantas leñosas de crecimiento rápido, las cuales a veces, crecen en suelos pobres y degradados en los que la producción de cultivos alimentarios no es óptima, como el sauce, el álamo y el eucalipto (FAO, 2008).

Los biocombustibles de segunda generación ofrecen numerosas ventajas, entre las que destacan la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero y el no uso de cultivos con potencial alimenticio para su producción. Además, la biomasa lignocelulósica es más fácil de manipular y de almacenar, especialmente en comparación con los cultivos de azúcar, ya que es resistente al deterioro (Salinas et Gasca, 2009).



En España, dentro del Centro Nacional de Energías Renovables (CENER) se encuentra el Centro de Biocombustibles de Segunda Generación, en donde se desarrollan y validan a escala preindustrial nuevos biocombustibles de segunda generación. En esta instalación se puede procesar un amplio rango de biomásas, pretratamientos y procesos de conversión. Este centro opera de forma continua en ensayos de larga duración simulando las condiciones industriales, de manera que se puedan extrapolar los resultados a escala industrial (MINETAD, 2015).

➤ **Biocombustibles de tercera generación**

Incluye aquellos biocombustibles generados a partir de microalgas como materia prima. Las microalgas son organismos unicelulares procariotas y autotróficos que llevan a cabo la fotosíntesis oxigénica y acumulan glucógeno como principal forma de carbono almacenado (Alarcón, 2010). Tienen requerimientos de crecimiento simples (luz, dióxido de carbono, nitrógeno, fósforo y potasio), y producen lípidos, proteínas y carbohidratos en grandes cantidades y cortos periodos de tiempo (Palomino, 2010). Algunas algas producen fécula que se puede convertir en bioetanol, y otras producen pequeñas gotas de aceite que se puede aprovechar para la producción de biodiésel (Hackenberg, 2008).

Las microalgas tienen numerosas ventajas. Por un lado, crecen rápidamente y son capaces de producirse durante todo el año. Se estima que el rendimiento de algas para la producción de biodiésel es más de 50.000 litros por hectárea cada año. Este rendimiento es muy elevado si se compara con el biodiesel producido a partir del aceite de palma o el bioetanol a partir de maíz, con 5.000 litros por hectárea/año y 3.500 litros por hectárea/año, respectivamente (Hackenberg, 2008).

Entre otras ventajas, las microalgas pueden crecer en medios acuosos necesitando menos agua que los cultivos terrestres, pueden cultivarse en agua salobre por lo que no crean competencia con los cultivos alimenticios por la tierra, su fuente de alimentación es el CO<sub>2</sub> (combina la producción de biocombustibles con la reducción de CO<sub>2</sub> y otras emisiones) y los nutrientes para su cultivo pueden obtenerse de aguas residuales. Estos tipos de cultivo no requieren de la aplicación de herbicidas o pesticidas y su composición bioquímica se puede modular variando las condiciones de crecimiento para obtener un mayor rendimiento (Palomino et al., 2010).



Finalmente, las microalgas son convertidas en biocombustible mediante tecnologías conocidas, como la fermentación, transesterificación o gasificación (Hackenberg, 2008).

Sin embargo, a pesar de todas estas ventajas el empleo de este tipo de biocombustibles está siendo objeto de estudio y se encuentran todavía lejos de su comercialización, realizándose continuas investigaciones a escala de laboratorio (Vivero y Porras, 2008).

## **2.2. Bioetanol**

Se define como el etanol generado a partir de la fermentación de los azúcares presentes en la biomasa o en la fracción biodegradable de los residuos. Es un compuesto volátil, inflamable, incoloro, que en condiciones ambientales se encuentra en estado líquido, y se puede mezclar con agua y solventes no polares. Es el biocombustible más utilizado actualmente, ya que se combina con gasolina con el fin de aumentar el rendimiento de los vehículos y disminuir la contaminación (Stratta, 2000).

## **2.3. Materias primas para la producción de bioetanol: Carbohidratos**

La mayoría de la producción mundial de biocombustible deriva de la caña de azúcar o el maíz, utilizados en Brasil y Estados Unidos respectivamente. Otros cultivos que también se utilizan para producir este bioetanol son, la yuca, el arroz, la remolacha azucarera y el trigo. A nivel general, como materia prima para obtener bioetanol, se puede utilizar cualquier material que contenga hidratos de carbono fermentables. Por ello es preciso comentar los diferentes tipos de carbohidratos (FAO, 2008).

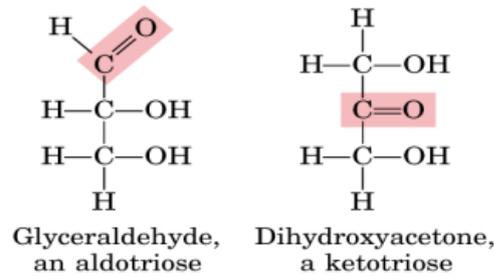
### **2.3.1. ¿Qué son los carbohidratos?**

Los carbohidratos son compuestos esenciales de los organismos vivos y son la clase más abundante de moléculas biológicas cuya composición química es  $(CH_2O)_n$ , donde  $n$  es mayor o igual a 3. Desde el punto de vista químico se diferencian (Toledo, et al., 2006):



Universidad de Oviedo

- Aldehídos o polihidroxialdehidos: cadenas de carbono que contienen un grupo aldehído y varios grupos hidroxilos.
- Cetonas o polihidroxicetonas: cadenas de carbono que contienen un grupo cetónico y varios grupos hidroxilos (Fig. 3).
- Productos derivados de aldehídos y cetonas por oxidación, reducción, sustitución o polimerización.



**Figura 3. Estructura básica de los carbohidratos. Polihidroxialdehido (gliceraldehído, izquierda) y polihidroxiacetona (dihidroxiacetona, derecha). Fuente: WEB1**

Tienen una amplia diversidad de funciones biológicas, como fuentes de energía, elementos estructurales y como precursores de la producción de otras biomoléculas.

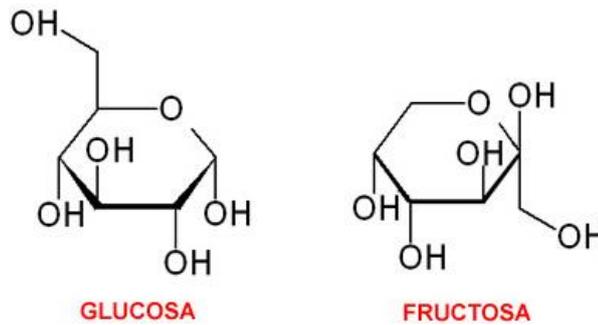
### **2.3.2. Tipos de carbohidratos**

Según el número de unidades de azúcares sencillos que contengan, se clasifican en monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos

#### **➤ Monosacáridos**

Son azúcares no hidrolizables puesto que son las unidades más pequeñas. Son moléculas cristalizables, solubles en agua y directamente fermentables. Ejemplos de monosacáridos son la glucosa y la fructosa (Fig. 4).

Atendiendo a la naturaleza química del grupo funcional carbonílico recibe el nombre de aldosa, si éste es aldehído, y si es cetónico se le designa como cetosa. Dependiendo del número de átomos de carbono de denominan de diferente forma: cuando tienen tres carbonos son triosas; cuando tienen cuatro, tetrasas; cuando tienen cinco carbonos, pentosas; y así sucesivamente hasta los monosacáridos de ocho carbonos. Los más abundantes en las células son las pentosas y las hexosas. Estos últimos tienen la capacidad de formar estructuras de anillo muy estables (WEB1).

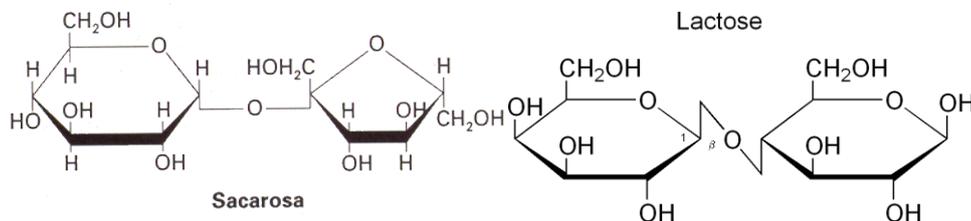


**Figura 4. Estructura de la glucosa y la fructosa.**

➤ **Disacáridos**

Son moléculas formadas por dos monosacáridos, iguales o diferentes, unidos mediante un enlace glucosídico. Debido a que el grupo hidroxilo anomérico potencialmente puede estar en configuración alfa o beta, pueden formarse dos disacáridos posibles cuando se unen dos moléculas de azúcar:  $\alpha(1,4)$  o  $\beta(1,4)$ . Este aspecto es muy importante si se analizan sus propiedades reductoras, como veremos a continuación (WEB1).

Ejemplos de disacáridos son la sacarosa y la lactosa (Fig. 5).



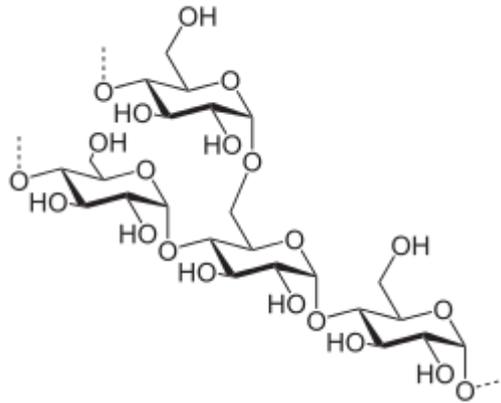
**Figura 5. Estructura de la sacarosa y la lactosa.**

➤ **Polisacáridos**

Están formados por grandes cantidades de monosacáridos conectados por enlaces glucosídicos. Los más pequeños, llamados oligosacáridos, contienen hasta unos 10 o 15 monosacáridos. Los polisacáridos pueden tener estructura lineal o ramificada. Pueden dividirse en dos clases: homoglicanos, formados por un solo tipo de monosacáridos, y heteroglicanos, que contienen dos o más tipos de monosacáridos (WEB2).



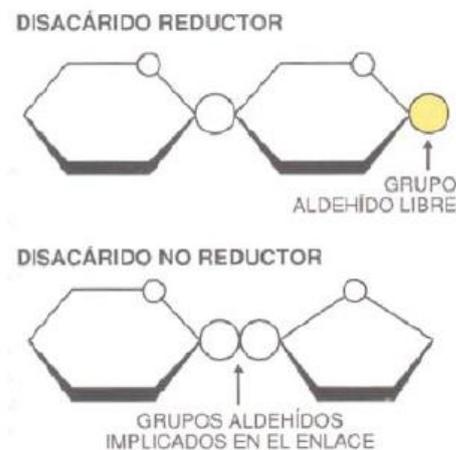
El almidón (Fig. 6) y la celulosa son algunos de los polisacáridos más comunes.



**Figura 6. Estructura del almidón. Fuente: Sela, 2015**

Para que los azúcares sean directamente fermentables, deben de poseer un carácter reductor. Los azúcares reductores son aquellos cuyo grupo funcional no está involucrado en la unión de dos monosacáridos y por tanto conservan el carácter reductor de la molécula, como se observa en la Fig. 7.

Los monosacáridos y los disacáridos, a excepción de la sacarosa, poseen su grupo carbonilo intacto y a través del mismo pueden reaccionar como reductores con otras moléculas en procesos de fermentación. Los polisacáridos como el almidón, la celulosa y la hemicelulosa, tienen el grupo carbonilo involucrado en el enlace de los distintos monosacáridos para la formación de la molécula y por tanto pierden el carácter reductor (Gerena, 2013).



**Figura 7. Participación del grupo aldehído en disacáridos reductores y no reductores. Fuente: WEB3**



### **2.3.3. Tipos de materias primas**

Dependiendo de la composición, la materia prima puede ser azucarada, amilácea o lignocelulósica. La biomasa azucarada es rica en azúcares directamente fermentables, sin embargo, la amilácea (rica en almidón), y la lignocelulósica (rica en celulosa, hemicelulosa y lignina), está formada por carbohidratos que tienen que someterse a hidrólisis para formar azúcares fermentables.

La biomasa azucarada la más empleada para obtener bioetanol junto con la amilácea. Por el contrario, la lignocelulósica se utiliza menos ya que la extracción de azúcares es más complicada, lo que provoca que la tecnología de conversión se encarezca, a pesar de que el costo del material lignocelulósico es menor (Barroso, 2010).

Este trabajo se centra en la generación de bioetanol, a partir de materia prima formada principalmente por biomasa lignocelulósica.

### **2.3.4. Biomasa lignocelulósica**

Como se ha comentado anteriormente, está constituida fundamentalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina.

El interés por el uso de materiales lignocelulósicos como materia prima en procesos de transformación por microorganismos es importante desde hace varias décadas. Bajo este enfoque, su empleo como combustibles representa una forma sostenible y amigable con el medio ambiente de aprovechamiento de la energía solar.

Entre las razones para utilizar este tipo de biomasa en la generación de bioetanol, se tienen que (Viñals-Verde et al., 2012) (Abril et Navarro, 2012):

- La materia lignocelulósica es el producto agroindustrial de mayor abundancia. Sus fuentes son los bosques, cultivos agrícolas, residuos de cosechas y otros residuos industriales como residuos de la industria de la madera y los tableros, residuos de la industria del papel y el papel reciclado.
- Es una fuente de materia prima renovable, por constituir una parte estructural en el reino vegetal.
- Los materiales lignocelulósicos son menos costosos que los materiales convencionalmente utilizados para producir etanol.

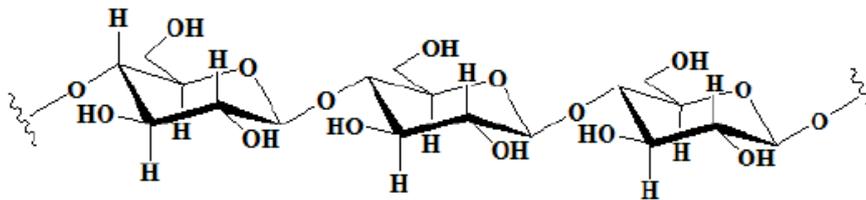


Universidad de Oviedo

- Sus tres mayores constituyentes (celulosa, hemicelulosas y lignina) tienen numerosas aplicaciones, como el uso de celulosa y hemicelulosa para la generación de bioetanol.

➤ **Celulosa**

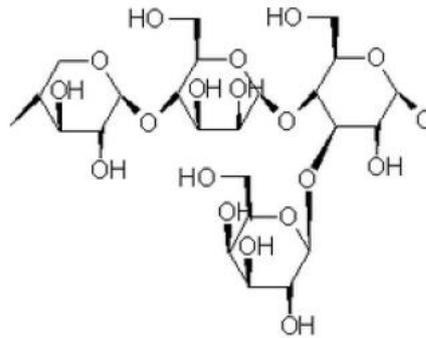
La celulosa es un polisacárido formado por la unión de monómeros D-glucosa mediante enlaces  $\beta$ -(1,4) glucosídicos. Las cadenas lineales de celulosa se unen entre sí mediante puentes de hidrógeno, como se observa en la Fig. 8, formando una estructura cristalina resistente e insoluble. Como en todo polímero, uno de sus parámetros más importantes es la fracción cristalina. En el caso de la celulosa, el valor de esta fracción, que oscila entre 50 y 90%, es importante debido a que, mientras que la fracción amorfa es fácilmente hidrolizable, la cristalina es mucho más resistente (Barroso, 2010). Este es uno de los factores que hará necesaria la realización de pretratamientos para obtener bioetanol (Haghighi et al., 2013).



**Figura 8. Estructura de la celulosa. Fuente: Sela, 2015**

➤ **Hemicelulosa**

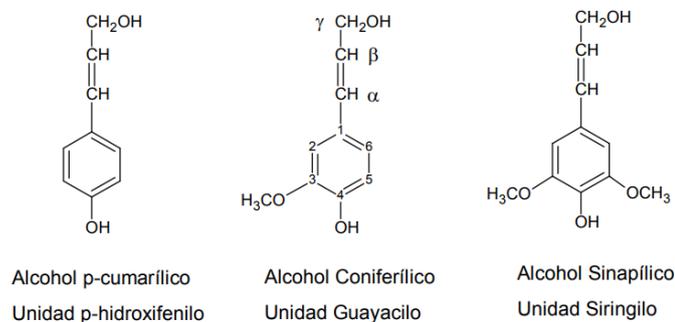
La hemicelulosa está formada por cadenas cortas, principalmente de pentosas y hexosas, como se puede ver en la Fig. 9. Además, contiene pequeñas cantidades de ácidos orgánicos, cuya función principal es unir la celulosa y la lignina. Este polímero no es cristalino y es hidrolizado fácilmente (Cunningham et al, 1994).



**Figura 9. Estructura de la hemicelulosa. Fuente: Sela, 2015**

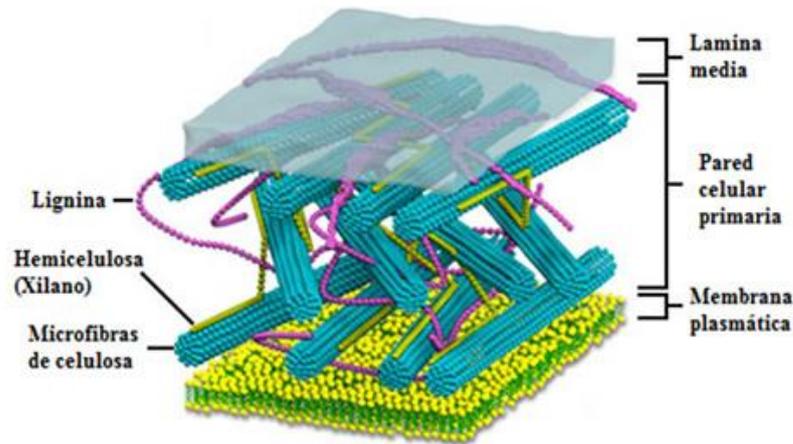
➤ **Lignina**

La lignina es un polímero no carbohidrato que se entremezcla con la celulosa y la hemicelulosa y, proporciona la rigidez a los materiales lignocelulósicos. Puede retirarse mediante distintos pretratamientos con la finalidad de romper la matriz lignocelulósica y así facilitar que la celulosa y la hemicelulosa puedan ser hidrolizadas. En la Fig. 10 se encuentran algunos compuestos encargados de formar la lignina (Tomás, 2009).



**Figura 10. Precursores de la estructura de la lignina. Fuente: Pérez, 2008.**

En la Fig. 11, se observa la estructura tridimensional de la biomasa lignocelulósica y como se encuentran dispuestos los diferentes componentes en ella. El componente mayoritario es la celulosa. La hemicelulosa en menor proporción, une la celulosa con la lignina, siendo ésta última la encargada de proporcionar la rigidez característica de este tipo de material.



**Figura 11. Esquema general de la estructura del material lignocelulósico. Fuente: Robledo et al., 2012.**

## **2.4. Obtención de bioetanol a partir de material lignocelulósico**

Desde el punto de vista técnico, la utilización de biomasa lignocelulósica para la producción de bioetanol, en comparación con el empleo de materias primas de primera generación supone un proceso síntesis más complicado. Este tipo de materia prima consta de una estructura compleja y difícil de penetrar y atacar por agentes químicos, por tanto, se requiere un pretratamiento para “romper” esa estructura y facilitar los procesos posteriores. Por ello, la mayoría de los azúcares presentes no son directamente fermentables o su fermentación es complicada, como el caso de las pentosas. Esto hace que la tecnología de conversión se encarezca, a pesar de que el costo de la materia prima celulósica como tal es inferior al de las materias primas de primera generación. La conversión del material celulósico a bioetanol se lleva a cabo en dos fases:

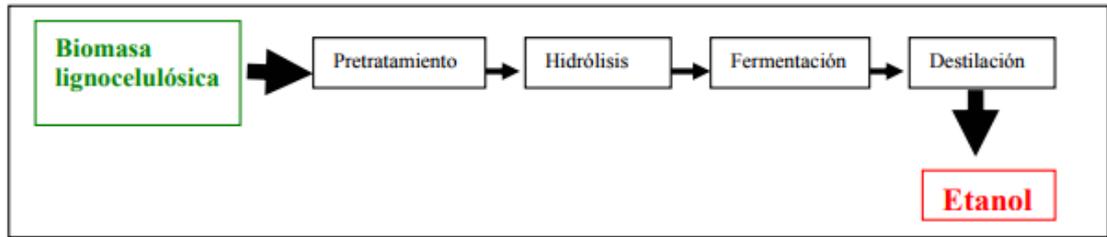
- Los componentes de celulosa y hemicelulosa se hidrolizan en azúcares simples o reductores.
- Los azúcares simples o reductores obtenidos se fermentan para obtener bioetanol.

La celulosa y hemicelulosa se hidrolizan a azúcares simples para luego ser fermentados a bioetanol, pero la lignina es un polifenol y no puede ser fermentada (Abril y Navarro, 2012).



Universidad de Oviedo

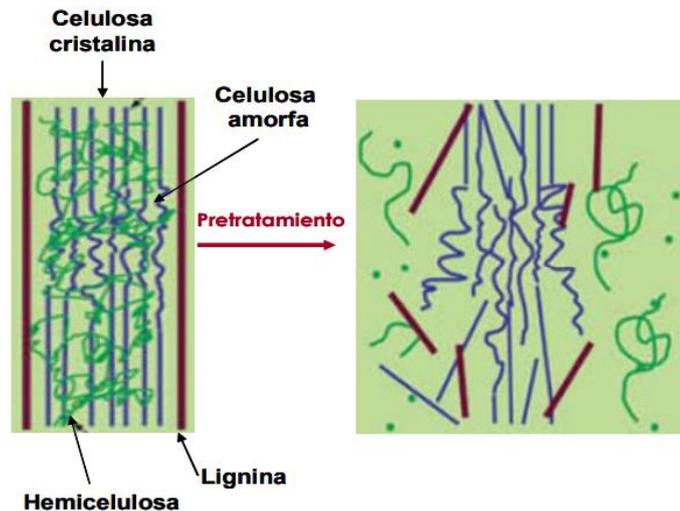
El proceso para la obtención de bioetanol consta de varias fases resumidas en la siguiente imagen (Fig. 12):



**Figura 12. Esquema del proceso de generación de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica. Fuente: Abril et Navarro, 2012.**

### **2.4.1. Pretratamiento**

Esta etapa se realiza con el objetivo de reducir la cristalinidad de la celulosa, disociar el complejo lignina-celulosa, aumentar el área superficial del material, minimizar la presencia de sustancias que puedan dificultar las posteriores etapas y minimizar la pérdida del material original. En la Fig. 13, se muestra el efecto del pretratamiento en la biomasa lignocelulósica (Barroso, 2010)



**Figura 13. Representación esquemática del proceso de pretratamiento. Fuente: Pérez, 2008.**

Se busca que el proceso tenga un bajo consumo energético, reactivos baratos y fácilmente recuperables y que sea aplicable a diversos sustratos.



Hay diversos tipos de pretratamientos dependiendo de si están basados en una rotura mecánica, en la acción de la temperatura, si se realizan con agentes químicos o con microorganismos.

➤ **Pretratamiento mecánico**

- Trituración mecánica: Consiste en una molienda que reduce la cristalinidad de la celulosa, aumenta la superficie específica y densidad aparente, y facilita la hidrólisis posterior. Tiene el inconveniente de su alto consumo energético, que depende tanto del tamaño final de partícula al que se muele el material, como del tipo de material a triturar.

- Molienda comprimida: Consiste en una molienda con un dispositivo sometido a una sobrepresión. Se obtiene un material más homogéneo que con la trituración mecánica y en un tiempo más corto (Pérez, 2008).

- Extrusión: La biomasa se calienta, se mezcla y se corta produciéndose cambios físicos y químicos en el material durante el paso por la extrusora. La velocidad del tornillo y la temperatura de la extrusora rompen la estructura del material lignocelulósico (Díaz, 2015).

- Radiación de alta energía: En el material de partida se rompen los enlaces beta glucosídicos y los enlaces entre la celulosa y la lignina. Este tratamiento es de difícil aplicación al necesitar instalaciones complejas y de alto coste (Pérez, 2008).

➤ **Pretratamientos térmicos**

- Explosión por vapor: Combina altas temperaturas (180-240°C) y presiones junto con una brusca descompresión posterior, provocando disgregación y ruptura de las fibras, y despolimerización y rotura de enlaces. Se obtiene un producto fibroso cuya celulosa es más accesible a la hidrólisis (Tomás, 2009).



- Pretratamiento con agua caliente en fase líquida (PACL): La biomasa es tratada directamente con agua caliente (160-240°C) durante unos 45 minutos. Se solubiliza parte de la hemicelulosa de la celulosa, haciéndola más accesible. Además, si se controla adecuadamente el pH, manteniéndolo en valores comprendidos entre 4 y 7, se reduce la formación de inhibidores (Pérez, 2008).

- Pretratamiento con microondas: En el material de partida, por acción de las microondas se provoca la liberación de los grupos acetilos de las hemicelulosas.

- Pirólisis: Con este tratamiento se produce la descomposición de la materia bajo la acción del calor y en ausencia de un medio oxidante. Se realiza a temperaturas entre 300 y 900°C.

➤ **Pretratamiento físico-químico**

- Explosión por vapor con amoníaco (AFEX): Similar a la explosión por vapor en el que la biomasa es impregnada con amoníaco líquido, a una temperatura en torno a los 90°C durante 30 minutos aproximadamente, junto con una brusca descompresión posterior. Modifica las características estructurales de la lignina, favoreciendo el acceso de las enzimas celulolíticas y polimeriza las hemicelulosas.

- Percolación reciclada de amoniaco (ARP): Para este tratamiento, una solución de amoníaco en agua entre el 5-15% en peso se hace pasar a través de la biomasa a temperaturas comprendidas entre 150-180°C. El amoniaco acuoso actúa despolimerizando la lignina y rompiendo sus enlaces con los carbohidratos.

Tanto el ARP como el AFEX, son tratamientos recomendables para maderas duras y residuos agrícolas, siendo menos eficientes para residuos orgánicos (Pérez, 2008).



➤ **Pretratamientos químicos**

- Oxidación húmeda: La biomasa se somete a la acción de agua a elevadas temperaturas (160-180°C) en presencia de oxígeno. La solubilización de hemicelulosas suele ser más alto que en otros pretratamientos, y la celulosa presenta un alto grado de desestructuración, aumentando el rendimiento de la hidrólisis posterior.

- Ozonólisis: El pretratamiento con ozono que básicamente actúa como deslignificador provoca que la hemicelulosa sea atacada ligeramente y la celulosa apenas se vea afectada. No genera subproductos tóxicos y se elimina fácilmente, pero requiere gran cantidad de ozono, haciendo el proceso caro y menos aplicable (Pérez, 2008).

- Tratamiento con organosolventes: mezcla de solventes orgánicos o acuosos junto con un catalizador para llevar a cabo el tratamiento.

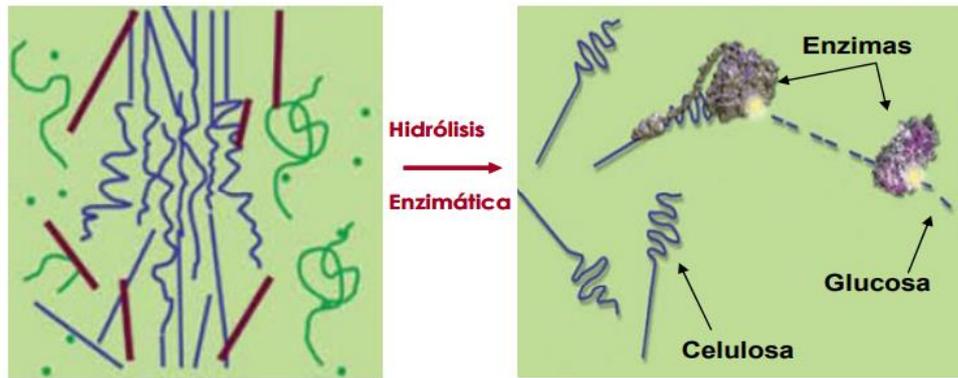
➤ **Pretratamientos biológicos**

- Se basa en la acción de microorganismos con la propiedad de generar maquinaria enzimática capaz de hidrolizar los polímeros constituyentes de la materia prima. Los microorganismos más efectivos son los hongos de la podredumbre blanca, blanda y parda. El principal inconveniente es que la tasa de hidrólisis es demasiado lenta (Pérez, 2008).

### **2.4.2. Hidrólisis**

Segunda etapa del proceso de pretratamiento que consiste en romper los carbohidratos complejos en azúcares simples para utilizarlos como sustrato en la posterior fermentación. La celulosa se hidroliza en monosacáridos de D-glucosa, mientras que la hemicelulosa lo hace en pentosas y hexosas (manosa, glucosa, xilosa, etc.)

En la Fig. 14 se muestra un esquema del efecto que tiene la hidrólisis en los carbohidratos.



**Figura 14. Representación esquemática del proceso de hidrólisis. Fuente: Pérez, 2008**

### ➤ **Hidrólisis ácida**

Uso de catalizadores ácidos para transformar las cadenas de polisacáridos en monosacáridos. Se pueden utilizar distintos ácidos (sulfúrico, clorhídrico, fosfórico, nítrico, etc.), que se pueden emplear concentrados trabajando a bajas temperaturas o diluidos a mayores temperaturas y menores tiempo de reacción.

Es un proceso más rápido que el tratamiento enzimático, pero en condiciones ácidas y altas temperatura, se facilita la formación de productos de degradación de los azúcares que constituyen un serio inconveniente. Estos productos de degradación son el furfural y el hidroximetilfurfural, afectando negativamente al proceso de fermentación ya que actúan como inhibidores y disminuyen el rendimiento del proceso.

### ➤ **Hidrólisis básica**

Se utilizan compuestos básicos como agentes de la reacción. Estos compuestos suelen ser los hidróxidos de sodio y calcio, junto con temperaturas elevadas. La más empleada es el NaOH diluido, que causa un hinchamiento de la biomasa, facilitando así la actuación de enzimas y bacterias. Permite eliminar la lignina, al causar la rotura de su estructura y la separación de esta de los carbohidratos a los que va ligada. Finalmente, continua la degradación rompiendo los polisacáridos (Díaz, 2015).

### ➤ **Hidrólisis enzimática**

En este método, se emplean catalizadores biológicos (enzimas) para romper los polisacáridos. La ventaja que presenta este tipo de hidrólisis es que las enzimas son



Universidad de Oviedo

específicas de la reacción que catalizan por lo que se pueden obtener altos rendimientos de hidrólisis y se evita la formación de productos de degradación. Las reacciones enzimáticas tienen lugar en condiciones suaves de temperatura y pueden emplearse enzimas como celulasas, amilasas y amiloglicosidasas. Estas enzimas se encargan de degradar polisacáridos como la celulosa y el almidón.

Este tipo de hidrólisis, presenta ventajas con respecto las hidrólisis ácida y básica, ya que no provoca corrosión de los materiales, los costes de equipamiento son menores, no se necesita el empleo de agentes químicos y no se producen compuestos inhibidores de la fermentación. Por otro lado, presenta largos tiempos de reacción, los precios de las enzimas suelen ser elevados, y los monosacáridos y disacáridos que se forman como producto de la hidrólisis pueden dificultar la progresión de la misma.

### ➤ **Hidrólisis hidrotérmica**

El material de partida se mezcla con agua y se somete a altas temperaturas y presiones. Las condiciones de estas variables y la relación entre masa del material y el volumen de agua, cambian el grado de degradación final de la materia (Barroso, 2010).

Al emplear condiciones de presión y temperatura, el tratamiento se encarece, y además se pueden obtener compuestos inhibidores, como el furfural, HMF y el ácido acético, aunque en menor concentración que en la hidrólisis ácida.

A pesar de ello, este es un modelo de hidrólisis con grandes ventajas, como la disminución del impacto ambiental por la ausencia de reactivos químicos distintos del agua y materiales vegetales, el encarecimiento por el empleo de temperatura y presión elevadas se compensa por el ahorro al no utilizar catalizadores químicos ni enzimas, y el uso de pH moderados produce menores daños en los equipos y costes de neutralización, no se necesita un proceso de recuperación de ácidos (Díaz, 2015).

Estas ventajas hacen que este tratamiento sea uno de los más utilizados en la industria, y por ello se ha seleccionado en este trabajo para degradar los polisacáridos de los residuos en azúcares fermentables.



### **2.4.3. Compuestos inhibidores y métodos de eliminación**

Como se ha comentado anteriormente, cuando los materiales lignocelulósicos se someten a condiciones severas durante el tratamiento, como alta temperatura, alta presión o un ambiente ácido, pueden generarse productos tóxicos que pueden afectar a las siguientes etapas de hidrólisis y fermentación.

La naturaleza y concentración de estos compuestos dependen de la materia prima, el pretratamiento utilizado, las condiciones del mismo y de la utilización o no de catalizadores.

#### **➤ Compuestos inhibidores:**

En procesos hidrotérmicos, los principales inhibidores que se generan son el ácido acético y compuestos furanos tales como el furfural (FUR) y el hidroximetilfurfural (HMF) (Jonsson y Martín, 2016).

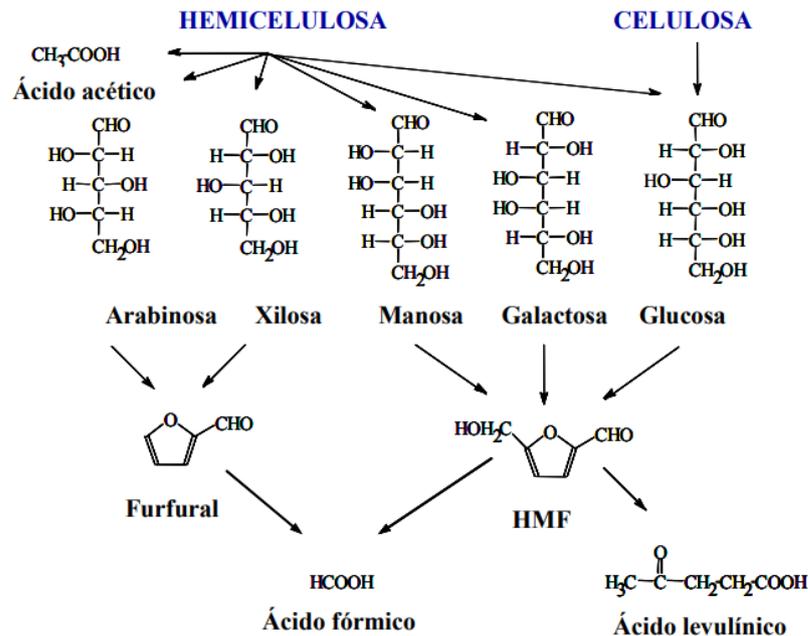
El furfural se origina a partir de la degradación de las pentosas (xilosa y arabinosa) y el hidroximetilfurfural (HMF), se forma como consecuencia de la degradación de las hexosas (glucosa, manosa y galactosa). En anaerobiosis, la mayoría de los microorganismos fermentadores son capaces de reducir los furanos a sus correspondientes alcoholes de menor toxicidad. En este caso, el furfural se degrada a alcohol furfurílico y furoico, y el HMF a alcohol hidroximetilurfurílico. Sin embargo, si los furanos están presentes en altas concentraciones ejercen un efecto inhibitorio sobre el microorganismo. Los efectos producidos por el HMF son menores que el furfural, pero son los mismos (Pérez, 2008).

El ácido acético se forma a partir de los grupos acetilados de la hemicelulosa, pero es también un producto final de muchas reacciones de oxidación.

El ácido acético es uno de los ácidos alifáticos que se genera durante el pretratamiento, junto con el ácido fórmico, que procede de la degradación de furfural e HMF. El HMF, también se descompone en ácido levulínico, aunque normalmente se encuentra en menores concentraciones. Estos compuestos son ácidos débiles cuya forma no disociada puede atravesar la membrana de las células, lo que provoca una disminución del pH intracelular que debe ser compensado por un bombeo de protones al exterior mediante una ATPasa de membrana. Cuando las concentraciones de ácidos en

forma no disociada son elevadas, se supera la capacidad de bombeo de protones, lo que provoca acidificación del citoplasma y consiguiente muerte celular (Tomás, 2009).

En resumen, el efecto que tienen estos compuestos inhibidores sobre las levaduras es básicamente la reducción de rendimiento en etanol y de la producción de biomasa.



**Figura 15. Principales compuestos de degradación originados en el pretratamiento e hidrólisis de la biomasa lignocelulósica. Fuente: Tomás (2009)**

En la Fig. 15 se muestra un esquema de la degradación de hemicelulosa y celulosa y las degradaciones sucesivas, que tienen lugar en el pretratamiento y la hidrólisis. Se incluyen también los compuestos inhibidores y los resultados de su degradación a compuestos menos tóxicos.

Cuando se combinan varios compuestos inhibidores se produce un efecto sinérgico, ya que el efecto combinado de estos compuestos en conjunto es más alto que el ocasionado por cada uno de manera individual (Mussatto y Roberto, 2004).

➤ **Detoxificación**

Dependiendo del pretratamiento e hidrólisis utilizados, es necesario llevar a cabo la detoxificación del material que se someterá a fermentación para tener una mayor producción de bioetanol.



Por tanto, la detoxificación busca eliminar todos aquellos compuestos que pudieron formarse durante el sometimiento de la materia prima al pretratamiento e hidrólisis y que resultan inhibitorias en la fermentación posterior. Para ello existen métodos biológicos y físico-químicos.

Los métodos biológicos involucran el uso de enzimas y microorganismos específicos que actúan sobre los compuestos inhibitorios cambiando su composición. Para el caso de la detoxificación con enzimas se encuentran principalmente el uso de peroxidasas y lacasas, y en cuanto a los microorganismos empleados, se encuentran tanto de tipo bacteriano como fúngico.

Hay diversos métodos físico-químicos, pero los de mayor difusión son los que emplean hidróxidos de cualquier tipo para aumentar el pH hasta 10, y así formar precipitados con sales de calcio, los cuales son retirados antes de la fermentación. Este método es el más conocido, no sólo por sus resultados exitosos en reducción de inhibidores y altos rendimientos en fermentación, sino igualmente por su bajo costo frente a otras metodologías. Por otro lado, al comparar los métodos físicos y químicos con los biológicos, estos últimos han venido tomando notoriedad, en especial en cuanto al uso de cepas bacterianas y fúngicas, ya que la biorremediación ofrece ventajas económicas, de proceso y ambientales (Sánchez et al., 2010).

#### **2.4.4. Fermentación**

Una vez que por hidrólisis se han obtenido las pentosas y hexosas a partir del material lignocelulósico y se han eliminado los compuestos inhibidores, en caso de que los hubiera, se lleva a cabo la fermentación que constituye la tercera fase en la producción de bioetanol.

La fermentación es un proceso, en condiciones anaerobias 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 causantes de la degradación de la materia orgánica y de obtener energía en forma de ATP (Rodríguez, 2016).

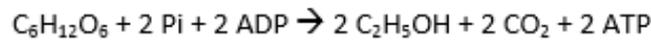
Para obtener bioetanol, se realiza la fermentación alcohólica, que consiste en un proceso anaerobio exotérmico, en el que las levaduras, normalmente, procesan los azúcares. Como productos finales se obtienen un alcohol en forma de etanol, dióxido de



Universidad de Oviedo

carbono en forma de gas y unas moléculas de ATP que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular.

Debido a que el proceso es anaeróbico, la respiración celular de la cadena del ADP en ATP queda completamente bloqueada, siendo la única fuente de energía para las levaduras la oxidación de la glucosa.



**Figura 16. Reacción de fermentación de la glucosa.**

Los principales microorganismos que llevan a cabo este tipo de fermentación son las levaduras, *Saccharomyces cerevisiae*, en concreto, es la especie utilizada con mayor frecuencia, pero no es el único microorganismo con el que se pueden obtener biocombustibles. Este tipo de cepas se aísla de remolacha azucarera y, por lo tanto, se considera que está bien adaptada para la fermentación de sustratos ricos en azúcar. Su alto rendimiento se convierte en una excelente opción para la obtención de alcohol (Artime, 2014).

Para conseguir un rendimiento adecuado en el proceso fermentativo, se deben controlar muchos parámetros durante su realización. El crecimiento de *S. cerevisiae* se ve favorecido a un pH próximo a 4.0-5.0., con su máxima actividad entre 30 y 35°C, aunque la fermentación es posible entre los 15 y los 40, y con una fase aerobia previa, a pesar de que la fermentación se lleva a cabo en condiciones anaerobias. También hay que vigilar la presión, ya que un aumento de ésta por el aumento en la concentración de CO<sub>2</sub> provoca una disminución en la actividad celular.

En cuanto a los requerimientos nutricionales, es necesaria una adecuada concentración de azúcares y de agua mínima para poder llevar a cabo su función, también requiere una base nutricional adecuada con un medio rico en nitrógeno, fósforo, carbono, azufre, potasio, calcio, magnesio y vitaminas. Por último, tanto la excesiva concentración de etanol como de partículas sólidas en el caldo de fermentación pueden inhibir el proceso (Sela, 2015).



### **2.4.5. Destilación y deshidratación**

La última etapa del proceso es la destilación, método por el que se separa el etanol del agua debido a la mayor volatilidad del etanol.

A presión atmosférica las temperaturas de ebullición son 78,2 y 100°C para el etanol y el agua respectivamente, por lo que para separar ambos compuestos se realizan destilaciones sencillas repetidas. Para ello, durante el proceso se va obteniendo un vapor que es cada vez más rico en el componente más volátil (el etanol), que se vuelve a destilar sucesivamente. De este modo, la fracción líquida se va enriqueciendo progresivamente con etanol.

Cuando en la mezcla se alcanza el punto del azeótropo, la mezcla no se puede destilar más. Para obtener alcohol al 100% es necesario romper el azeótropo lo que resulta un proceso complejo y caro, existiendo varias técnicas. Para lograrlo se puede emplear un tercer componente, generalmente benceno, para alterar la relación de la tensión de vapor del azeótropo. En el caso del bioetanol resulta más útil emplear el alcohol sin deshidratar o usar emulsiones para mezclarlo con gasolina (Barroso, 2010).

## **2.5. Generación de residuos agroalimentarios**

El volumen mundial de residuos agroalimentarios generados tiende a incrementarse cada vez más. Como consecuencia, aumenta significativamente el coste de tratamiento de estos residuos y se hace necesaria la búsqueda de una vía de aprovechamiento que permita disminuir su volumen a la vez generar un producto de valor añadido. Tanto la prevención como la gestión correcta de los residuos son esenciales para evitar impactos negativos como la contaminación del agua, del suelo, del aire, potenciar el cambio climático y afectar a la salud humana. En cambio, cuando los residuos se gestionan de forma adecuada se pueden convertir en recursos que contribuyan al ahorro de materias primas y garanticen la sostenibilidad económica.

La disminución de la masa de alimentos comestibles en la parte de la cadena de suministros que conduce específicamente a los alimentos comestibles para el consumo humano es lo que se conoce como pérdida de alimentos. Estas pérdidas tienen lugar en las etapas de producción, poscosecha y procesamiento de la cadena de suministro de alimentos (Parfitt et al., 2010).



### **2.5.1. Desperdicio de alimentos**

Este concepto, hace referencia a las pérdidas de alimentos que ocurren al final de la cadena alimentaria (venta minorista y consumo final), más relacionado con el comportamiento de los vendedores minoristas y los consumidores.

Por ello, los alimentos que estaban destinados en un principio a consumo humano pero que el azar ha sacado de la cadena alimentaria humana se consideran pérdidas o desperdicios de alimentos, incluso cuando posteriormente son utilizados para uso no alimentario (pienso, bioenergía, etc.)

Aproximadamente un tercio de las partes comestibles de los alimentos producidos para el consumo humano se pierde o desperdicia, lo que representa alrededor de 1300 millones de toneladas al año, de los cuales 89 millones de toneladas corresponden a la Unión Europea y 8 millones a España, siendo el sexto país de Europa que más comida desperdicia. En España el desperdicio medio por hogar es de 1.3 kg/semana o 76 kg/año, lo que equivale a más de medio kilo de alimentos por persona y semana (MAPAMA, 2013). En un hogar, de media se desecha cerca del 25% de los alimentos que compra (CNEA, 2016)

Al problema de la pérdida y desperdicio de alimentos hay que sumarle la falta de disponibilidad de alimentos de todas las personas del planeta. En el mundo siguen desnutridos 795 millones de personas, según un informe difundido en mayo de 2015 por las agencias de la ONU en Roma. Una de cada nueve personas es incapaz de consumir suficiente comida para llevar a cabo una vida activa y sana (CNEA, 2016).

Una de las causas por las que existe el hambre en el mundo, es por el desperdicio de alimentos, ya que representa una oportunidad perdida en la lucha por mejorar la seguridad alimentaria global.

### **2.5.2. Generación de residuos según el nivel social**

El grado de nivel social también influye en la génesis de residuos alimentarios. En los países de ingresos altos y medianos, los alimentos se desperdician en gran medida, lo que significa que se tiran incluso si todavía son adecuados para el consumo humano. No obstante, los alimentos también se pierden y desperdician al principio de la



Universidad de Oviedo

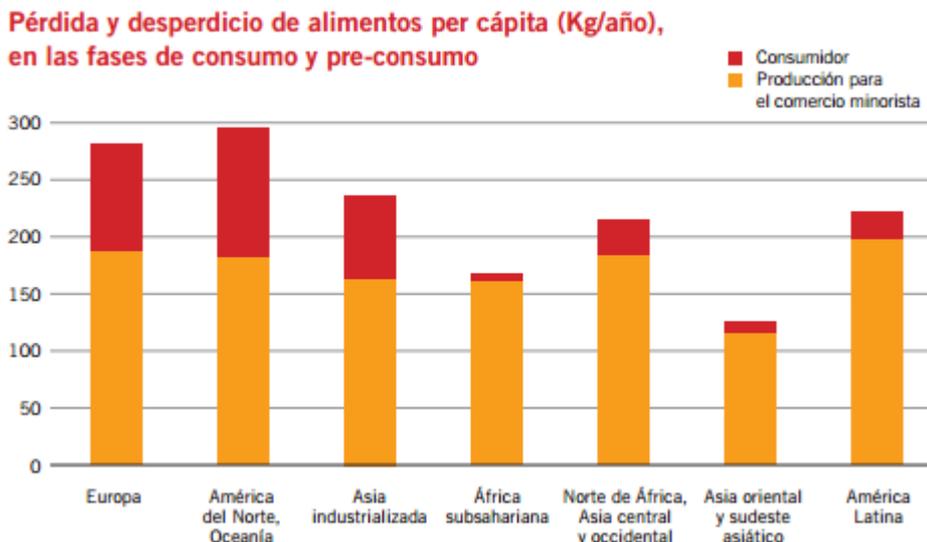
cadena de suministro de alimentos. En los países de ingresos bajos, los alimentos se pierden principalmente durante las primeras etapas y etapas intermedias de la cadena de suministro de alimentos y se desperdician muchos menos alimentos en el consumo.

Los países industrializados y en desarrollo desperdician aproximadamente la misma cantidad de alimentos, 670 y 630 millones de toneladas, respectivamente. Sin embargo, como puede observarse en el Figura 17, en los países en desarrollo más del 40% de las pérdidas de alimentos se produce en las etapas de poscosecha y procesamiento, mientras que en los países industrializados más del 40% de las pérdidas de alimentos se produce en la venta minorista y el consumo. Los consumidores de los países industrializados desperdician casi la misma cantidad de alimentos que la producción de alimentos neta total del África subsahariana (FAO, 2012.a).

El desperdicio per cápita de alimentos por consumidor es de 95 a 115 kg/año en Europa y América de Norte, mientras que en el África subsahariana y en Asia meridional y sudoriental esta cifra representa solo de 6 a 11 kg/año.

En las regiones en desarrollo, las pérdidas en la producción agrícola dominan el total de pérdidas de la cadena de suministro de alimentos. Las pérdidas en las fases de poscosecha y distribución también son graves; esto se debe tanto al deterioro de los cultivos perecederos en los climas calientes y húmedos de muchos países en desarrollo, como al carácter estacional que conlleva un excedente imposible de vender.

Como se observa en la Fig. 17, dominan las pérdidas en la producción agrícola en las tres regiones industrializadas (Europa, América del Norte y Oceanía y Asia industrializada). Esto se debe principalmente a la clasificación de las cosechas de frutas y hortalizas impuestas por los estándares de calidad establecidos por los vendedores minoristas. El desperdicio al final de la cadena de suministro de alimentos también es abundante en las tres regiones, con de 15 a 30% de las compras por masa desechada por los consumidores.



**Figura 17. Pérdida y desperdicio de alimentos per cápita (Kg/años, en las fases de consumo (en rojo) y pre-consumo (naranja), según diferentes áreas geográficas. Fuente: FAO, 2012.a.**

En los países de ingresos bajos, las pérdidas de alimentos se deben en gran medida a las limitaciones de infraestructuras debido a malas instalaciones y servicios de transporte, almacenaje, elaboración y envasado, además de carencias de capacidades que llevan a que la producción, la cosecha, la elaboración y el transporte de alimentos no sean eficientes.

En cambio, en los países de ingresos medios y altos, las causas están principalmente relacionadas con el comportamiento del consumidor y las políticas y normativas existentes para tratar otras prioridades del sector, como la aplicación de estándares de calidad.

### **2.5.3. Generación de residuos por grupo de alimentos**

Los residuos de frutas y hortalizas son muy abundantes. Como se puede ver en la Fig. 18, en casi todas las zonas geográficas sobrepasan el 50% de la cantidad producida, es decir, se tiran una de cada dos piezas de fruta u hortaliza generada. Sólo se salen de la media la zona industrializada de Asia, con el valor más bajo, y Europa. Para los cereales, las pérdidas son del 30%, un 20% para cultivos oleaginosos y legumbres, carne y productos lácteos, y un 35% para el pescado (FAO, 2012.b.).



Figura 6. Parte de la producción inicial que se pierde o desperdicia en las diferentes etapas de la CSA de frutas y hortalizas en diferentes regiones

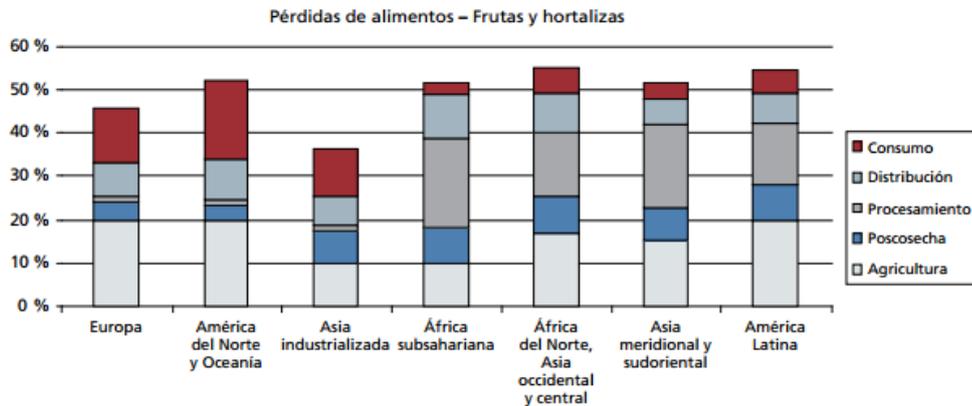


Figura 18. Distribución de las pérdidas de fruta y hortalizas en las diferentes etapas de la cadena alimentaria de diferentes áreas geográficas. Fuente: FAO (2012.b)

### 2.5.4. Consecuencias derivadas del desperdicio de alimentos

Es importante recalcar el impacto negativo que tienen las pérdidas y desperdicios de alimentos.

Este impacto es muy significativo en el medioambiente debido a la utilización de agua, tierra, energía y otros recursos naturales para producir alimentos que nadie consumirá. Las pérdidas también crean inseguridad alimentaria en los sistemas agrícolas de subsistencia de los pequeños productores pobres, donde las pérdidas afectan directamente a la reducción de los alimentos disponibles. Las pérdidas en las cualidades de alimentos pueden reducir el estado nutricional de los productos. El desperdicio de alimentos supone una pérdida del valor económico para las cadenas de producción y suministro de alimentos (se estima el valor de los alimentos perdidos o desperdiciados cada año en todo el mundo en cerca de 900 millones de euros). Por último, los productos que se desperdician en una parte del mundo pueden afectar a la disponibilidad y precio de los alimentos en otros lugares del mundo por la globalización de las cadenas de suministro de alimentos (FAO, 2015).

Para abordar el desperdicio de alimentos y todas las consecuencias descritas, se llevan a cabo intervenciones que previenen que se originen éstas pérdidas y desperdicios de alimentos, seguidas de aquellas para reducirlas. También se realizan acciones de



Universidad de Oviedo

reutilización (para producir pienso) y reciclado (compostaje) ecológicos y costo-efectivos de los alimentos.

## **2.6. Recogida selectiva de biorresiduos**

Una de las acciones que se realizan para abordar este problema es la recogida selectiva de biorresiduos. Este término hace referencia a residuos vegetales de las zonas verdes y jardines, residuos alimenticios y de cocina, así como residuos procedentes del procesado de alimentos.

La prevención y gestión adecuada de los biorresiduos no sólo afecta positivamente a la gestión de residuos en general, sino que también contribuye a la gestión sostenible de los recursos, la protección de suelo y ayuda a combatir el cambio climático y a alcanzar los objetivos establecidos en relación con el desvío de residuos de los vertederos, el reciclado y las energías renovables.

Respecto a esto, la Ley 22/2011 de residuos y suelos contaminados establece que las autoridades competentes deberán adoptar las medidas necesarias para garantizar que, antes de 2020, la cantidad de residuos domésticos y comerciales destinados a la preparación para la reutilización y el reciclado para las fracciones de papel, metales, vidrio, plástico, biorresiduos u otras fracciones reciclables alcance, en conjunto, como mínimo, el 50% en peso (MAPAMA 2013).

No existe una solución única y definitiva para desarrollar la gestión de los biorresiduos. La jerarquía de gestión enfocada a este tipo de residuo se traduce en la siguiente figura de gestión:



**Figura 19. Jerarquía de gestión de residuos aplicada a los Biorresiduos. Fuente: MAPAMA, 2013**

### **2.6.1. Recogida selectiva de biorresiduos en Asturias**

En Asturias, la recogida selectiva de residuos se lleva a cabo desde diciembre de 2013. El tratamiento de estos residuos se realiza en las instalaciones de COGERSA, mediante una planta de digestión anaerobia con capacidad inicial de 30.000 t/año y que tiene prevista su ampliación para alcanzar en 2020 las 90.000 t. A partir de los biorresiduos, uno de los productos finales que se generan es compost con fines agrícolas. Para facilitar a los ayuntamientos asturianos el cumplimiento de la Ley 20/2011, COGERSA aprobó la convocatoria pública de ayudas económicas a los ayuntamientos que realicen esta recogida con destino a su planta (MAPAMA, 2013).

En vista al problema mundial que supone el agotamiento de los combustibles fósiles, la alta generación de residuos, y por último la controversia en cuanto al empleo de materias primas para la génesis de biocombustibles, desarrollar líneas de investigación que permitan solventar estos problemas es de sumo interés. En este contexto se plantea este trabajo, que presenta como alternativa la producción de bioetanol a partir de residuos de fruta.



### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

Para realizar este trabajo, se seleccionaron diferentes residuos agroalimentarios procedentes de la venta de frutas, que fueron sometidos a tratamientos de hidrólisis y fermentación. Hasta su utilización los residuos fueron guardados en una cámara frigorífica entre 4-6°C.

Las muestras finales se analizaron empleando distintos métodos analíticos con el fin de evaluar la eficacia de los tratamientos.

#### **3.1. Substratos utilizados**

En base a la cantidad de residuos generados por la industria agroalimentaria y a su contenido en carbohidratos complejos, se seleccionaron como substratos para la realización de este trabajo la cáscara de plátano, la pulpa de plátano y la cáscara de naranja. En todos los casos, aproximadamente más del 90% de su composición corresponde a los carbohidratos totales, según la base de datos española de la composición de alimentos. Son frutas que se encuentran durante todo el año en los comercios, exceptuando la naranja durante los meses de verano. Además, las partes no comestibles de la naranja y del plátano corresponden al 37% y 44%, respectivamente, generándose por tanto una gran cantidad de residuos (BEDCA, 2017). En la Tabla 1 se muestra la composición de los distintos substratos empleados.

**Tabla 1. Composición de la cáscara de naranja, pulpa de plátano y cáscara de plátano, expresada en porcentaje de materia seca. Fuentes: USDA; Granda et al., 2005; Lenihan et al., 2011; García et al., 2012; ASPROCAN, 2016.**

Componente	Cáscara de naranja (%m.s.)	Pulpa de plátano (%m.s.)	Cáscara de plátano (%m.s.)
<b>Humedad</b>	72.5	64.7	87
<b>Carbohidratos</b>	63	83.9	67.7
<b>Fibra</b>	13	5.2	5.7
<b>Proteínas</b>	6	5.6	7
<b>Grasas</b>	4	0.9	7.0
<b>Cenizas</b>	7	5.5	12.6



Para la caracterización de los substratos en cuanto a su composición de celulosa, hemicelulosa y lignina se atendió a lo reportado por otros autores anteriormente. En vista los datos bibliográficos encontrados, la fibra de la cáscara de naranja, está constituida por hemicelulosa (18%) y celulosa (12%), que junto a la lignina (1,7%), son los azúcares complejos que necesitan una hidrólisis para su transformación en azúcares reductores y, por tanto, fermentables (Villanueva et al., 2013)

En la pulpa de plátano, el azúcar soluble más predominante es la sacarosa (10%), seguido de la glucosa (3%) y la fructosa (2.2%), lo que significa que los azúcares totales corresponden al 47.3% m.s. Otros carbohidratos presentes son el almidón (8.5%) y la fibra, formada por la hemicelulosa (4.4%), la lignina (4.2%) y la celulosa (4%) (Velásquez-Arredondo et al., 2010).

La cáscara de plátano posee elevadas cantidades de celulosa (7.5-13%), hemicelulosa (6-15%) y lignina (7-14%). El contenido de almidón y azúcares oscila según el grado de madurez, al igual que en el caso de la pulpa. Aproximadamente se tiene un 10% de fructosa, un 10% de glucosa y un 10% de almidón (Teixeira et al., 2015).

### **3.2. Preparación de materiales no sometidos a hidrólisis**

Con el fin de comparar la eficacia de los tratamientos realizados en los diferentes residuos, se determinó por separado la cantidad inicial de azúcares, tanto totales como reductores, de las muestras sin hidrolizar. Para llevar esta caracterización se realizó un tratamiento basado en la extracción de azúcares mezclando el material de partida exclusivamente con agua, sin someterse a ningún tratamiento térmico. Para ello, se cortó el material de partida en trozos de 2 mm aproximadamente, como puede verse en la Fig. 20.



**Figura 20. Cáscara de naranja, de plátano y pulpa de plátano cortada en trozos de 2 mm**

A continuación, se homogenizó con agua destilada en una relación 1:3 (peso/volumen), tomando 10 g de muestra y añadiendo 30 mL de agua destilada. Posteriormente, se trituró en una batidora (Princess Royal Blender Turbo) durante 5 minutos a velocidad 1. Los sólidos de mayor tamaño fueron retirados empleando un tamiz tipo colador. La fracción líquida se centrifugó durante 15 minutos a 5000 rpm para retirar el exceso de sólidos. Finalmente, se conservó el sobrenadante obtenido y se ajustó el pH entre 6 y 7. La muestra final se conservó congelada hasta el momento del análisis.

Las muestras sometidas a este tratamiento, se denominarán en el apartado de Resultados como muestras “en fresco”.

### **3.3. Pretratamientos de hidrólisis a 120°C, 128°C y 135°C**

Se realizaron tres tratamientos hidrotérmicos a distintas temperaturas, con la finalidad de obtener una mayor cantidad de azúcares reductores que puedan emplearse en la fase posterior de fermentación. Los tratamientos hidrotérmicos se llevaron a cabo en los tres residuos y por triplicado.

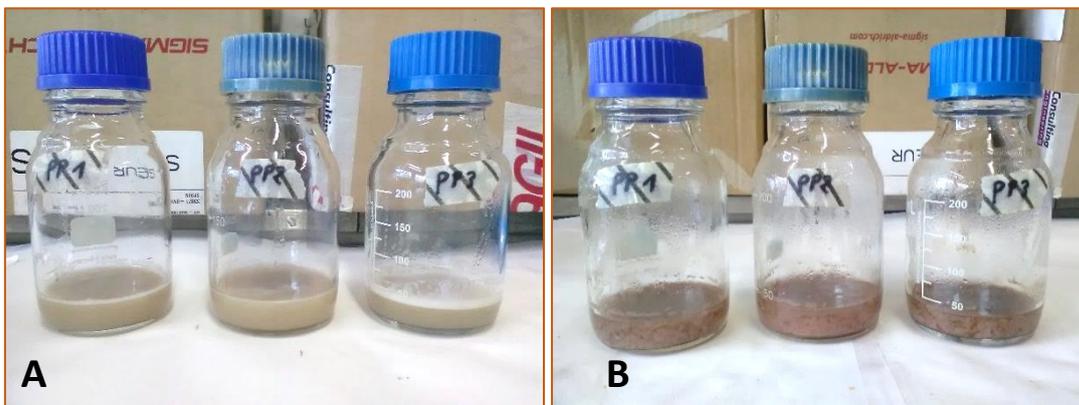
Inicialmente, el material de partida se homogenizó en una relación 1:3 (peso/volumen) con agua destilada tomando 10 g de muestra y añadiendo 30 mL de



Universidad de Oviedo

agua destilada. A continuación, se trituró en una batidora (Princess Royal Blender Turbo) durante 5 minutos a velocidad 1.

La mezcla obtenida se vertió en una botella Pyrex de 250 mL de capacidad y se introdujo al autoclave (Raypa Trade Steam Sterilizer) durante 5 minutos, a la temperatura correspondiente dependiendo del tratamiento (120°C, 128°C o 135°C). Llegados a este punto, cabe destacar por tanto que el tratamiento inicial de las muestras fue el mismo en todos los casos y que lo único que varió fue la temperatura de tratamiento en el autoclave. El aspecto de las muestras varía después de someterlas al tratamiento, como se observa en la Fig. 21.



**Figura 21. Muestras de pulpa de plátano trituradas junto con agua destilada, antes (A) y después (B) del tratamiento hidrotérmico.**

Finalizado el tratamiento hidrotérmico, se enfrió la muestra a temperatura ambiente y se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos con la finalidad de retirar los sólidos presentes. El sobrenadante obtenido se ajustó a un pH entre 6 y 7 empleando NaOH 6M, NaOH 1 M y HCl 1 M. La muestra final se congeló hasta el momento del análisis.

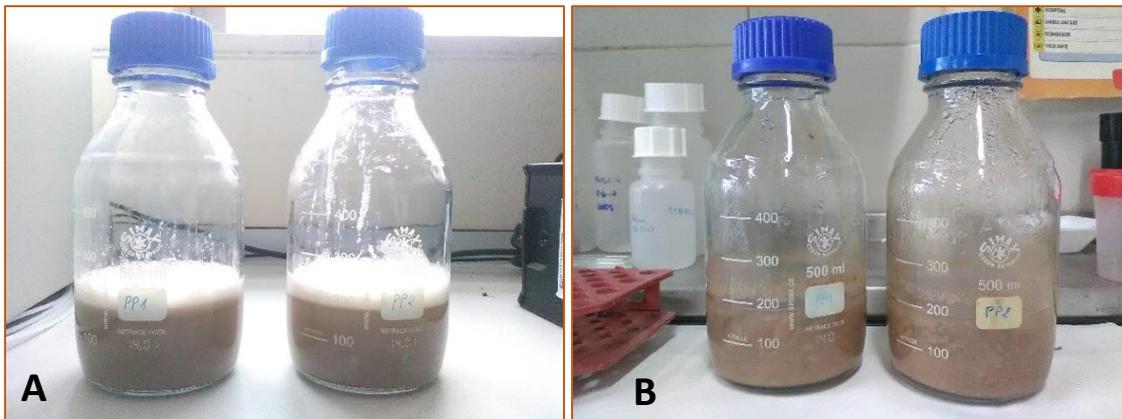
### **3.4. Tratamiento de fermentación**

#### **3.4.1. Material de partida**

Para el proceso de fermentación alcohólica, el substrato inicial se sometió a un pretratamiento hidrotérmico a 135°C siguiendo el método explicado en el apartado 3.3, salvo que en este caso se partió de 50 g de residuo inicial para tener un volumen suficiente durante la fermentación. Posteriormente, se enfrió la muestra a temperatura ambiente y se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos con la finalidad de retirar los sólidos presentes. La fracción sólida fue descartada mientras que 100 mL del

Universidad de Oviedo

sobrenadante se conservaron para el proceso posterior de fermentación. En la Fig. 22 puede observarse el aspecto de las muestras antes y después del pretratamiento.



**Figura 22. Muestras de pulpa de plátano trituradas junto con agua destilada, antes (A), y después (B) del tratamiento a 135°C. Muestra que, debidamente preparada, servirá como medio de cultivo de la fermentación.**

### **3.4.2. Condiciones de la fermentación**

El proceso de fermentación se llevó a cabo en botellas Pyrex de 100 mL de capacidad, previamente autoclavadas, que actuaron como biorreactor. La fracción líquida obtenida del pretratamiento se inoculó con la levadura 46 EDV, nombre comercial para denominar a cepas seleccionadas de *Saccharomyces cerevisiae*. Las levaduras en formato liofilizado fueron inoculadas directamente al medio de cultivo, sin necesidad de un preinóculo. La concentración de levaduras en el liofilizado fue del orden de  $10^9$  ufc/g. Las cantidades de liofilizado inoculadas en los medios de cultivo fueron de 0.05 g/L, lo que supuso una concentración inicial de levaduras de aproximadamente  $5 \times 10^4$  ufc/mL.

Una vez inoculada la muestra, se introdujo en un incubador (New Brunswick G-25 Incubator Shaker) a 30°C, con una agitación de 50 rpm, durante 69 horas.

El proceso de fermentación se realizó en dos biorreactores desfasados 7 horas entre sí con la finalidad de obtener una mayor información a lo largo de la toma de muestras.

### **3.4.3. Toma de muestras y análisis**

Se realizó de forma periódica y durante todo el proceso de fermentación una toma de muestras, con la finalidad de estudiar la evolución del pH, la concentración de azúcares totales y reductores, así como la cantidad de etanol producido en cada punto.



Universidad de Oviedo

El volumen final retirado del biorreactor durante el proceso fue en todos los casos, inferior o igual al 20% del volumen inicial.

De forma paralela, se realizó una siembra en placa de las muestras extraídas. Para ello, se preparó 1 L del medio YPG (1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 2% de glucosa y 2% de agar), que se esterilizó a 121°C durante 20 minutos. Una vez estéril, se prepararon las placas Petri de YPG y se conservaron en la nevera hasta su utilización.

El tipo de siembra utilizado para seguir el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* fue por extensión, empleando 100 µl de muestra en cada caso. La muestra fue diluida con una solución de NaCl al 0.7% (peso/volumen) para realizar correctamente el recuento de colonias posterior. Según incrementó el tiempo de fermentación, se realizaron diluciones de mayor magnitud.

Todo el material empleado durante la toma de muestras (puntas de pipeta, tubos eppendorf, solución salina, etc) fue esterilizado previamente.

Para determinar la evolución del pH en cada punto se utilizó un pH-metro (Basic 20 pH-Meter)

#### **3.4.4. Análisis microbiológico**

Las placas sembradas con las muestras extraídas estuvieron en la estufa entre 4 y 7 días. Pasado ese tiempo se realizó un recuento del número de colonias obtenidas.

### **3.5. Tratamiento para la extracción de azúcares potenciales.**

Con la finalidad de comparar el azúcar final extraído tras el tratamiento hidrotérmico, con la cantidad total de azúcar presente en los substratos que se podría extraer, se llevó a cabo un tratamiento para la extracción de azúcares potenciales. Para ello se siguió el método descrito por Lenihan et al. (2011), en el que se somete a las muestras a fuertes condiciones de hidrólisis.

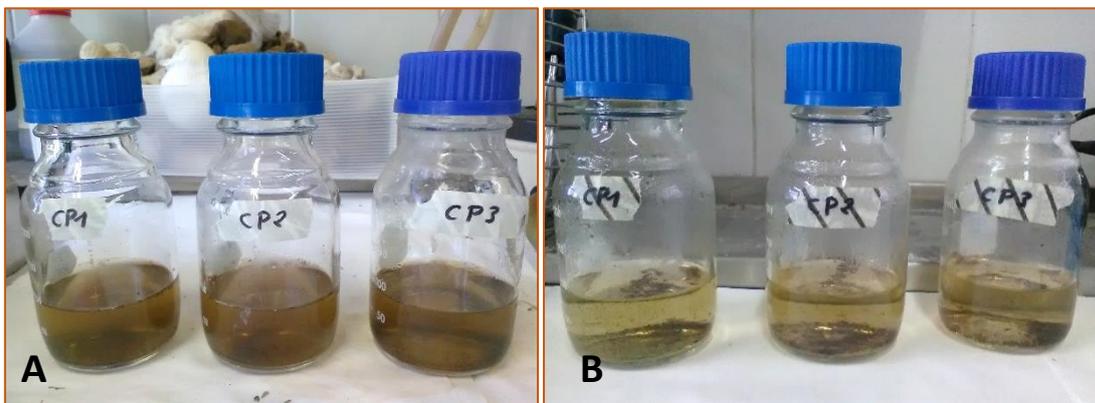
El material de partida inicial se trituró en fragmentos menores de 2 mm. Una cantidad de 0.3 g se introdujo en un tubo de ensayo de 12 mL y se añadieron 3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 85%. Las muestras se agitaron cada 10 minutos, manteniéndose en un baño de agua a 30°C durante 2 horas. Una vez pasado ese tiempo, la mezcla se vertió en una



Universidad de Oviedo

botella Pyrex de 250 mL y se añadió agua destilada hasta alcanzar 89.11 g. La solución diluida se autoclavó a 121°C y 1 atm durante 1 hora. La muestra se enfrió a temperatura ambiente y se filtró con papel de filtro de 20µm, mediante una bomba de vacío para eliminar las partículas restantes. El pH se ajustó entre 6 y 7 con NaOH 6M, NaOH 1M y HCl 1M. Las muestras se congelaron hasta el momento de ser analizadas. Todos los azúcares extraídos con este método se analizaron como azúcares reductores, ya que se considera una conversión total de los carbohidratos complejos a carbohidratos simples.

En este caso, las muestras también cambian de aspecto después del tratamiento, como se observa en la Fig. 23.



**Figura 23. Muestras de cáscara de plátano para medir azúcares potenciales, antes de meter al autoclave (A), y después del tratamiento (B).**

### **3.6. Métodos para la cuantificación de azúcares**

Para la cuantificación de azúcares totales y reductores se emplearon métodos espectrofotométricos. Los análisis se han realizado por triplicado para cada medida y para cada tratamiento escogiendo el valor medio para el cálculo de la concentración de azúcares presentes en la muestra.

Los métodos empleados para la cuantificación de los azúcares totales y reductores fueron el método del Fenol-Sulfúrico y el método del reactivo DNS, respectivamente.

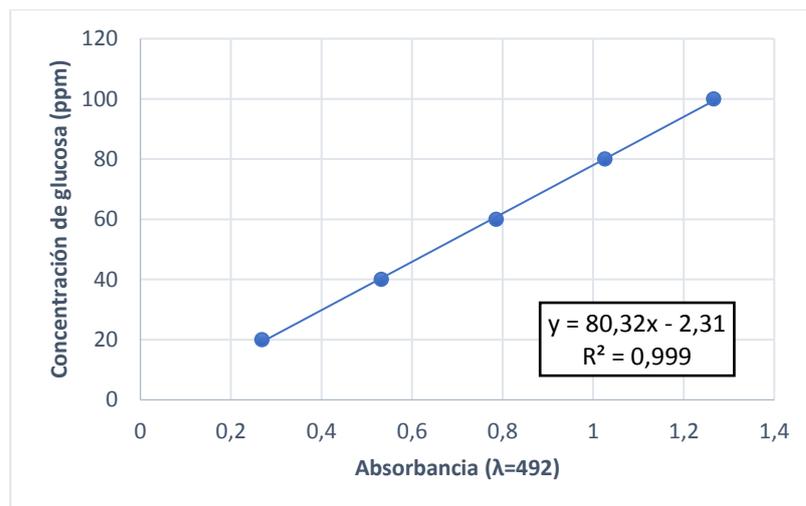


### **3.6.1. Método Fenol-Sulfúrico para la cuantificación de azúcares totales.**

La determinación de carbohidratos totales presentes en la muestra se realizó a través de una adaptación del método del fenol sulfúrico descrito por Dubais et al., 1956.

Para llevar a cabo el análisis, se mezcló 1 mL de muestra con 0.5 mL de fenol al 5%, se añadieron 2.5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 96% y se agitó rápidamente. Se dejó reposar una hora hasta que se enfrió la muestra, y se analizaron en el espectrofotómetro (SPEKOL 1500 UV VIS Spectrophotometer) a una longitud de onda de 492 nm.

Con el fin de determinar la concentración de carbohidratos totales, se realizó una curva de calibración (Fig. 24), empleando patrones de glucosa y siguiendo el mismo método que para el análisis de las muestras. Para el blanco, se utilizó agua destilada en lugar de las muestras.



**Figura 24. Curva de calibración para determinar los azúcares totales, realizada con patrones de glucosa desde 20 hasta 100 ppm y medida en espectrofotómetro a 492 nm.**

La coloración final de las muestras fue mayor a medida que aumentó la concentración de glucosa, como puede observarse en la Fig.25.



**Figura 25. Patrones de glucosa para realizar la curva de calibrado de los azúcares totales. De izquierda a derecha, las muestras corresponden al blanco, patrón de 20 ppm, de 40, de 60, 80 y 100 ppm.**

A partir de los valores de absorbancia obtenidos se calculó la concentración de azúcares tal y como se detalla en el apartado 3.6.3

### **3.6.2. Método ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) para la cuantificación de azúcares reductores.**

Para la medición de los azúcares reductores se empleó la metodología descrita por Bello Gil et al. (2006) basada en el método del DNS.

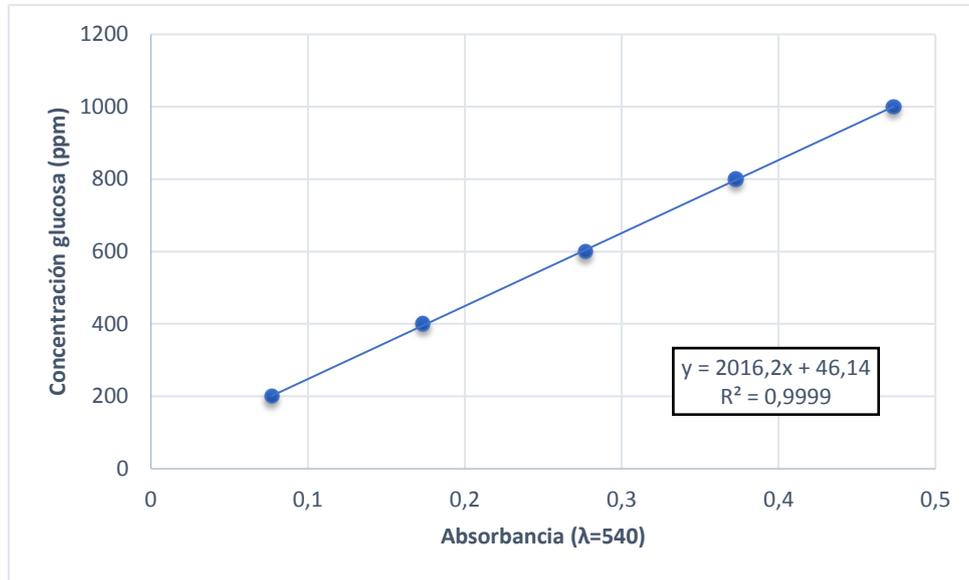
El ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) puede ser reducido por los azúcares en determinadas condiciones, y se genera un cambio de color que puede ser medido (Wood et al, 2012).

Para realizar el análisis se mezclaron 0.5 mL de muestra con 0.5 mL de reactivo DNS en tubos de ensayo de 12 mL y se mantuvieron en el baño de agua a 95°C durante 5 minutos. Inmediatamente pasado ese tiempo, se introdujeron los tubos de ensayo en hielo durante otros 5 minutos. Posteriormente se añadieron 5 mL de agua destilada a cada muestra, se agitaron y se analizaron en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.



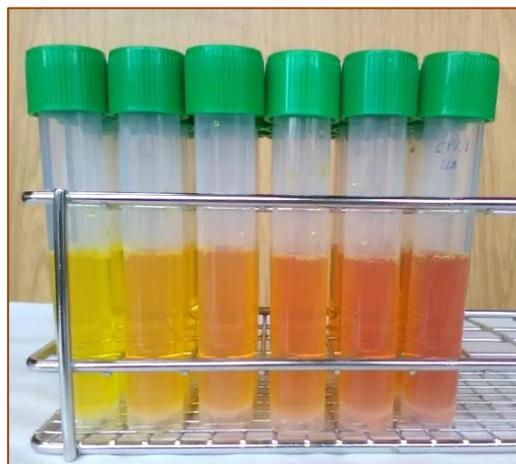
Universidad de Oviedo

Al igual que en el caso de los azúcares totales, la concentración de azúcares reductores se determinó a través de una curva de calibración (Fig. 26) empleando patrones de glucosa. Para el blanco se utilizó agua destilada en lugar de las muestras.



**Figura 26. Curva de calibración para determinar los azúcares reductores, realizada con patrones de glucosa desde 200 hasta 1000 ppm y medida en espectrofotómetro a 520 nm.**

Al igual que en el método anterior, en la Fig. 27, se observa un aumento de la coloración de las muestras según incrementa la concentración de glucosa.



**Figura 27. Patrones de glucosa para realizar la curva de calibrado de los azúcares reductores. De izquierda a derecha, las muestras corresponden al blanco, patrón de 200 ppm, de 400, de 600, 800 y 1000 ppm.**



### **Preparación de reactivo DNS:**

Para preparar el reactivo DNS, se disolvieron 1.6 g de NaOH, 30 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado y 1 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico en agua destilada. El reactivo se dejó agitando entre 12 y 15 horas envuelto en papel de aluminio ya que es un reactivo fotosensible. El reactivo se guardó en la nevera y se empleó durante un máximo 30 días desde su preparación.

#### **3.6.3. Cálculo de azúcares**

Para calcular los gramos de azúcares totales, reductores y potenciales presentes en cada 100 g de residuo seco, se utilizó la siguiente ecuación:

$$\frac{g \text{ azúcar}}{100 g \text{ residuo seco}} = \frac{Abs * R * F}{1000} * \frac{1 \text{ Litro}}{1000 \text{ ml}} * \frac{Vf}{Po} * \frac{100 g \text{ de residuo fresco}}{X g \text{ de residuo seco}} * 100$$

Siendo:

- **Abs:** la absorbancia medida
- **R:** valor de la recta de calibrado, en la cual el eje de ordenadas es la concentración en ppm (mg/L) y en abcisas se representa la absorbancia.
- **F:** factor de dilución
- **Vf:** volumen final de la muestra después de realizar los diferentes tratamientos.
- **Po:** peso inicial del substrato que se utiliza para cada tratamiento.
- **X:** porcentaje de residuo seco real calculado restando al 100% el porcentaje de humedad.

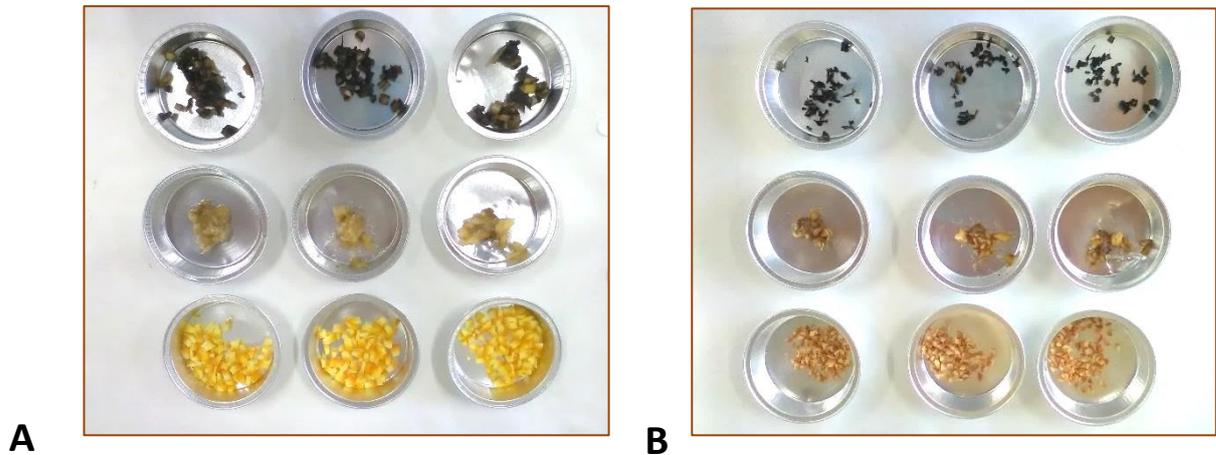
### **3.7. Determinación del contenido en humedad**

Cada uno de los substratos fue troceado en fragmentos menores de 2 mm. Se pesó 2 g de muestra y se introdujo en la estufa a 60°C durante 48 horas. Pasado ese tiempo, las muestras se dejaron enfriar en el desecador hasta alcanzar temperatura ambiente. Una vez pasado ese tiempo, se pesaron sucesivamente hasta alcanzar peso constante. La humedad se determinó para cada uno de los residuos por triplicado. En la



Universidad de Oviedo

Figura 28, puede verse la diferencia de las muestras con humedad, y sin ella, después de haber estado 48 horas en la estufa.



**Figura 28. Muestras por triplicado de los diferentes residuos (cáscara de plátano, pulpa de plátano y cáscara de naranja, de arriba abajo) resultado de la fase de deshidratación en la estufa a 60°C durante 48 horas, antes (A), y después de meter en la estufa (B).**

Para determinar el porcentaje de humedad, se realizó el siguiente cálculo:

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} * 100$$

Entendiendo como “Peso inicial”, los gramos de substrato antes de meter la muestra a la estufa, y “Peso final” los gramos después de estar 48 horas a 60°C.

### **3.8. Determinación del contenido en inhibidores**

El tratamiento a elevada presión y temperatura sobre materiales ricos en hidratos de carbono complejos puede provocar la síntesis de compuestos que provoquen la inhibición de la fermentación. En procesos hidrotérmicos, los principales inhibidores que se generan son el ácido acético y compuestos furanos como el furfural (FUR) y el hidroximetilfurfural (HMF) (Jonsson y Martín, 2016).

La concentración de estos compuestos (ácido acético, FUR y HMF) se midió en todas las muestras tras el pretratamiento de hidrólisis, con el fin de conocer su influencia en el proceso de fermentación posterior. Para ello, las muestras se centrifugaron a 13200 rpm durante 5 min y se filtraron a través de 0.45 µm.



Universidad de Oviedo

Para el análisis de inhibidores se siguió la metodología descrita por Díaz et al, (2017). La concentración de estos compuestos se analizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), empleando un cromatógrafo Agilent 1200 (Fig.29). Para determinar la concentración de ácido acético se utilizó la columna ICSep ICE-ION 300, acoplada a un detector de índice de refracción (RID). La fase móvil empleada fue ácido sulfúrico (0.450 Mm, pH 3.1) y el flujo de 0.3 mL/min con la temperatura de la columna a 75°C.



**Figura 29. Cromatógrafo Agilent 1200**

Para la medición de FUR y HMF se utilizó la columna Gemini-NX 5  $\mu$ m C18 110A (Phenomenex) acoplada a un sistema de detección de formación de diodos (DAD) y el flujo fijado a 1 mL/min. La fase móvil fue diferente en función del compuesto analizado. En el caso del FUR, la fase móvil empleada fue acetonitrilo/agua en una relación (20:80) fijando la detección final de la señal UV en 260 nm. En cambio, para el HMF la fase móvil fue metanol/agua (10:90) y la detección UV se fijó a 285 nm.

La obtención de los datos y su posterior análisis se realizó empleando el software ChemStation (Agilent Technologies). Todos los compuestos se determinaron empleando como patrones de referencia los estándares analíticos externos (Sigma-Aldrich).

Cabe aclarar que los límites de detección del equipo para el furfural y el HMF fueron de 1 ppm, y para el ácido acético de 5 ppm.



### **3.9. Determinación del contenido en bioetanol**

Para el análisis de bioetanol se empleó un cromatógrafo de gases CLARUS 400 (Perkin Elmer) (Fig. 30), acoplado a un detector de ionización de llama (FID). La columna empleada para la separación fue una Elite.WAX TR-810532 (30 m x 0.32 mmID x 0.5  $\mu$ m df, Perkin Elmer). Se utilizó como patrón interno 4-metil-2-pentanol.



**Figura 30. Cromatógrafo de gases CLARUS 400 (Perkin Elmer)**

Antes de ser analizadas, las muestras se diluyeron con agua Milli-Q en función del tiempo de fermentación, siendo mayor la dilución de la muestra correspondiente a la última toma. En cada una de las muestras se añadió una cantidad conocida de patrón interno. Finalmente se filtraron por un tamaño de poro 0.45  $\mu$ m y se introdujeron en los viales para su análisis.

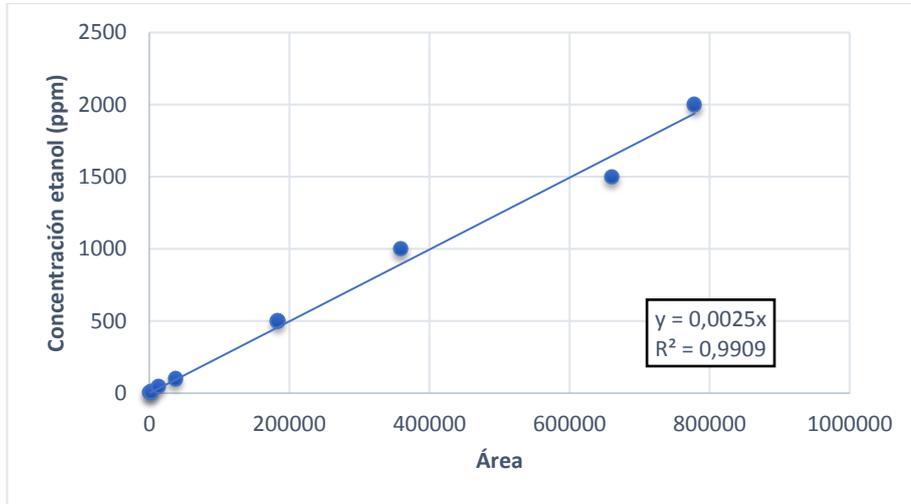
Las condiciones empleadas durante el análisis fueron las siguientes: inicialmente el horno del cromatógrafo se mantuvo a 60°C durante 5 minutos, después se aplicó una rampa de temperatura de 45°C/min hasta alcanzar los 220°C manteniéndose dicha temperatura durante 1 minuto. La temperatura del inyector fue de 220°C y la del detector de 280°C. Se utilizó Helio como gas portador durante el proceso.

Las concentraciones de bioetanol finales se calcularon a partir de una curva de calibrado empleando como patrón diluciones seriadas de etanol en agua Milli-Q. En la



Universidad de Oviedo

figura se muestra la recta de calibrado obtenida con un coeficiente de correlación lineal de 0.99



**Figura 31. Curva de calibración del etanol, realizada con patrones de etanol desde 10 ppm hasta 2000 ppm.**



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Caracterización de los sustratos

#### 4.1.1. Contenido de humedad

Los sustratos que se emplearon como material de partida para el desarrollo de los experimentos fueron residuos de plátano y naranja, en base a las características descritas en el apartado 3.2.

En las muestras, se determinó el contenido de humedad. Se analizó con el fin de poder expresar las cantidades de azúcar en relación al peso seco de las muestras iniciales. El procedimiento que se siguió para este análisis y el cálculo de los resultados, viene detallado en el apartado 3.7. En la Tabla 2. se muestra la humedad de los triplicados con la media, y la media total de cada residuo, considerando los distintos empleados.

Para la realización de los cálculos se utilizó la media de cada triplicado correspondiente al mismo material de partida con el que se realizó el tratamiento.

**Tabla 2. Humedad de los sustratos expresado en porcentaje. Humedad de cada triplicado, la media de los triplicados con la desviación estándar y la humedad media total de cada residuo con la desviación estándar.**

Humedad					
Residuo	Humedad de cada triplicado (%)			Media de triplicados (%)	Humedad media total (%)
Cáscara plátano	86,71	86,49	87,08	86,76 ± 0,23	87,50 ± 1,32
	86,65	86,88	86,63	86,72 ± 0,14	
	88,66	89,29	89,13	89,03 ± 0,33	
Pulpa plátano	68,75	69,85	69,77	69,46 ± 0,61	68,98 ± 3,54
	63,12	65,56	66,98	65,22 ± 1,95	
	72,4	72,07	72,28	72,25 ± 0,17	
Cáscara naranja	74,8	74,44	75,34	74,86 ± 0,46	75,16 ± 0,74
	74,62	74,5	74,74	74,62 ± 0,12	
	76,29	75,82	75,90	76,01 ± 0,25	



Según los resultados obtenidos, la cáscara de plátano es la muestra que presenta mayor humedad, seguido de la cáscara de naranja y por último la pulpa de plátano.

A la vista de los resultados, la humedad medida para la cáscara de plátano coincide con el dato bibliográfico referenciado en la Tabla 1. Respecto a las humedades medidas para la pulpa de plátano y la cáscara de naranja, son ligeramente superiores a lo referenciado en la Tabla 1.

Los distintos lotes analizados no presentan exactamente el mismo contenido de humedad, siendo las diferencias más acusadas en el caso de la pulpa de plátano, la cual, puede deberse a la heterogeneidad presente entre las muestras y a factores como el grado de maduración, la manipulación o las condiciones de conservación que hayan podido sufrir.

## **4.2. Contenido en azúcares potenciales reductores**

Los azúcares potenciales corresponden a la máxima cantidad de azúcares fermentables que podría ser obtenido a partir de una muestra. Se midieron para poder comparar los azúcares extraídos, tanto totales como reductores, con respecto al máximo que se podría obtener. Estos se midieron por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico, como se explica en el apartado 3.7.2.

En la Tabla 3 se muestran los datos obtenidos de azúcares potenciales en los diferentes residuos. Los resultados están expresados en gramos de azúcar potenciales por cada 100 gramos de residuo seco.

Como se observa en la Fig. 32, la cáscara de plátano es el residuo que menos carbohidratos tiene, siendo la mitad que en los otros dos residuos. En la cáscara de plátano y la cáscara de naranja, los azúcares potenciales obtenidos, no presentan gran variación entre los lotes analizados. En el caso de la pulpa de plátano, al igual que ocurría con la humedad, tiene una desviación estándar más alta, lo que de nuevo demuestra la heterogeneidad entre los lotes de este sustrato.



Tabla 3. Resultado del análisis de los azúcares potenciales expresados en g de azúcar en 100 gramos de residuo seco.

Azúcares potenciales reductores		
Residuo	Media de los triplicados (g/100 g residuo seco)	Media total (g/100 g residuo seco)
Cáscara plátano	20,26 ± 0,52	20,08 ± 0,24
	19,91 ± 0,58	
Pulpa plátano	40,88 ± 1,57	41,59 ± 10
	42,3 ± 0,65	
Cáscara naranja	45,29 ± 0,16	44,99 ± 0,43
	44,69 ± 0,53	

La cantidad teórica de carbohidratos en la cáscara de plátano es del 67,7% m.s. (Tabla 1), siendo notablemente superior que la obtenida en los análisis (20% m.s.). Lo mismo ocurre con la pulpa de plátano y la cáscara de naranja, siendo 83,9% (Tabla 1) y 72,5% (Tabla 1) los datos referenciados respectivamente, y los medidos, 41.6% y 45%. Estas diferencias entre los datos bibliográficos y los obtenidos experimentalmente se deben a que el método empleado no es capaz de extraer e hidrolizar hasta azúcares reductores todos los carbohidratos presentes en los substratos.

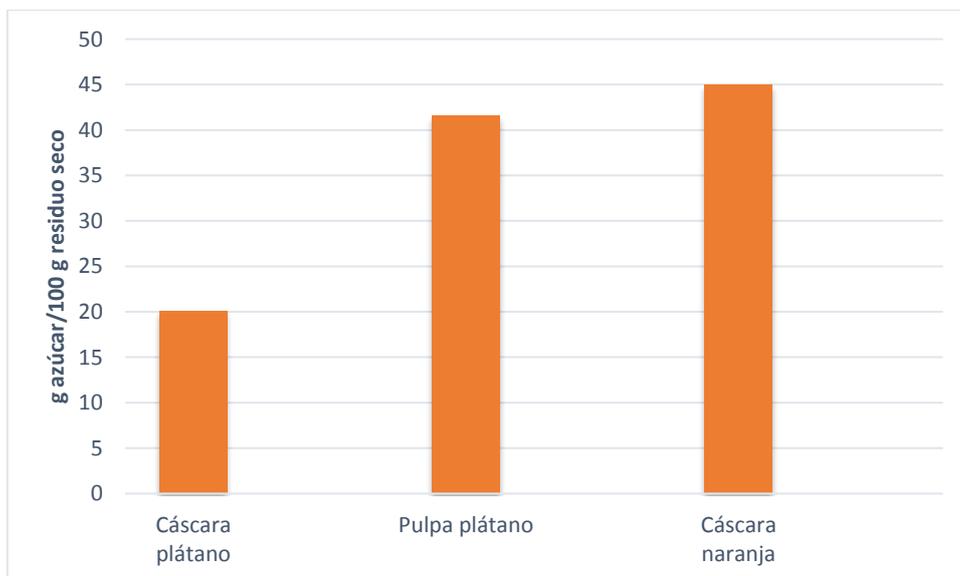


Figura 32. Azúcares potenciales en cada uno de los substratos, expresados en gramos de azúcar por cada 100 gramos de residuo seco.



### **4.3. Extracción de azúcares reductores**

#### **4.3.1. Sin tratamiento de hidrólisis (“en fresco”)**

Una vez que se tiene el dato del total de carbohidratos de las muestras, se analizó la cantidad de azúcares, tanto totales como reductores, que se podrían extraer de los substratos sin someter a tratamiento de hidrólisis (“en fresco”) empleando únicamente agua como agente de extracción.

Hay que diferenciar entre los azúcares y los carbohidratos. Normalmente, el término azúcares se refiere únicamente a monosacáridos y disacáridos, y son solubles en agua. Los carbohidratos son moléculas más complejas, compuestas por más de dos moléculas de azúcar. En cuanto a la diferencia entre azúcares totales y reductores, estos últimos permiten estimar la cantidad de azúcares sencillos directamente fermentables (glucosa y fructosa), mientras que los azúcares totales incluyen tanto a los reductores como a otros compuestos que no son directamente fermentables por la mayor parte de los microorganismos, como la sacarosa. Dentro de los carbohidratos totales se encuentran compuestos que necesitan un pretratamiento de hidrólisis para convertirse en azúcares fermentables.

Los substratos se prepararon como se indica en el apartado 3.6, añadiendo agua destilada y triturando. En el medio así obtenido, se midieron los azúcares totales y reductores que resultan solubles sin necesidad de hidrólisis. En la Tabla 4 se indica el contenido de azúcares totales y reductores extraídos para cada substrato, expresado en gramos de azúcar por 100 gramos de residuo seco. Además, se indica el porcentaje de azúcares reductores, con respecto a los azúcares totales.



**Tabla 4. Resultado de las muestras sin tratar (“en fresco”). Se indican los gramos de azúcar obtenido por cada 100 gramos de residuo seco.**

<b>Residuo</b>	<b>Azúcares totales (g azúcar/100 g residuo seco)</b>	<b>Azúcares reductores (g azúcar/100 g residuo seco)</b>	<b>Relación reductores/totales (%)</b>
Cáscara plátano	15,93 ± 0,09	11,80 ± 2,63	74,07
Pulpa plátano	47,04 ± 1,87	27,14 ± 4,98	57,7
Cáscara naranja	28,53 ± 3,57	18,42 ± 1,82	61,06

Según datos bibliográficos, la cáscara de plátano posee un 68% en materia seca de carbohidratos totales, de los cuales, el 20% corresponde a azúcares reductores, valor superior al 12% extraído en este trabajo. Los azúcares totales obtenidos para la cáscara de plátano, son 16 g/100 g de residuo seco, lo que corresponde al casi 16%, porcentaje muy alejado del valor referenciado de carbohidratos totales, lo cual resulta lógico, ya que no se ha realizado ningún tratamiento que permita su solubilización e hidrólisis.

Para la pulpa de plátano, en la bibliografía se referencia el 84% en materia seca de carbohidratos totales, correspondiendo el 47.3% a azúcares, valor similar a la cantidad aquí extraída, de 47% m.s. El dato de los azúcares reductores medidos, 27% m.s., es mayor que el hallado en la bibliografía (17%).

En el caso de la cáscara de naranja, el dato bibliográfico de carbohidratos totales es de 63% (Tabla 1), más del doble del 28.5%, correspondiente a los azúcares totales, obtenido al realizar el análisis. El dato bibliográfico de los azúcares reductores es de 11% m.s., inferior a la cantidad extraída experimentalmente.

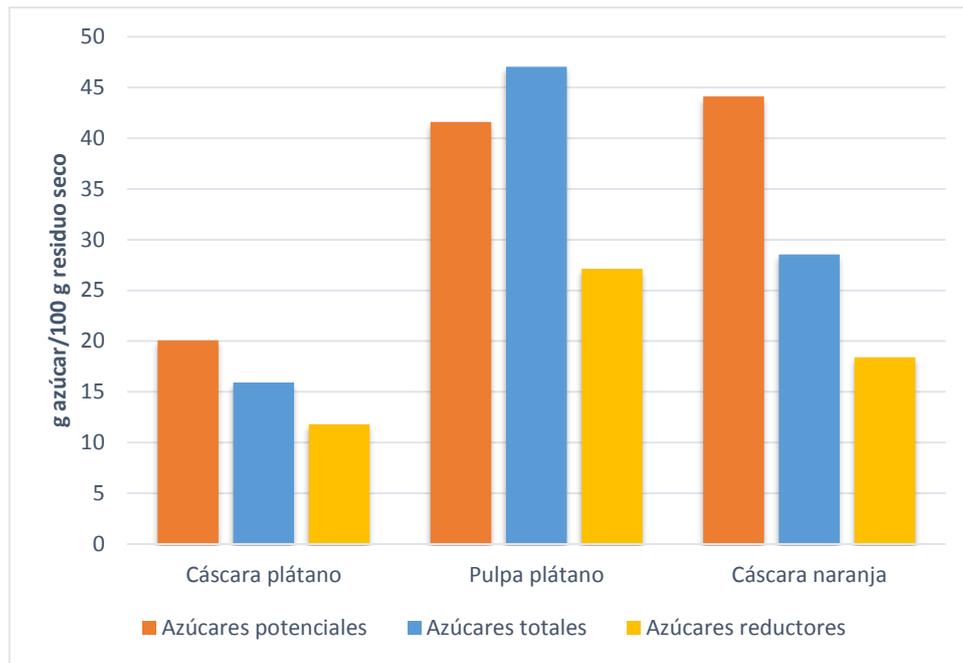
En todos los residuos el valor referenciado en la bibliografía de carbohidratos totales es superior al obtenido en azúcares totales mediante los análisis, esto es debido a que no se disuelve la totalidad de los carbohidratos del residuo, por la diferente solubilidad de los compuestos que forman la fibra alimentaria (Cerón-Salazar et Cardona–Alzate, 2011). La celulosa, presente en los tres residuos, es altamente insoluble debido a su alto grado de cristalinidad. El almidón también es insoluble y las hemicelulosas están formadas por una amplia gama de compuestos que pueden ser solubles o no. Por otra parte, los monosacáridos como la glucosa y la fructosa, azúcares reductores, se disuelven fácilmente en agua (Rodríguez 2016).



Respecto a las concentraciones de azúcares reductores medidos, en el caso de la pulpa de plátano y la cáscara de naranja son superiores a los datos referenciados, y para la cáscara de plátano este dato es menor. Esta variación puede deberse principalmente al grado de maduración de los substratos, de tal manera que en la fruta verde hay alta concentración de almidón y baja de azúcares (sacarosa, fructosa y glucosa) y en la fruta madura, la concentración de almidón disminuye, formando azúcar (Ly, 2004).

La cáscara de plátano, es el residuo que presenta una mayor relación de azúcares reductores frente a los totales extraídos (74%). En cambio, la pulpa de plátano, con el 58%, es el residuo con menor relación de azúcares reductores frente a los totales. Esto puede deberse a que la sacarosa, correspondiente a azúcares totales, se encuentre en mayor porcentaje en la pulpa de plátano que en la cáscara. Para la cáscara de naranja, el 61% de todos los azúcares corresponde a azúcares reductores.

En la Fig. 33, se puede ver gráficamente la relación entre los azúcares totales, reductores y los potenciales en los tres substratos. La extracción de azúcares, tanto totales como reductores en fresco, es mayor en la pulpa de plátano. Cabe esperar que el valor de azúcares potenciales sea mayor que el de azúcares totales, y por tanto, que el de reductores. Esto es así en la cáscara de plátano y en la cáscara de naranja, pero en la pulpa de plátano, el valor de azúcares potenciales obtenido es menor que el de azúcares totales. Esto puede deberse a que durante el tratamiento para extraer los azúcares potenciales, explicado en el apartado 3.6., ciertos compuestos de la pulpa, en vez de extraerse como azúcares, se transformen en inhibidores, como veremos más adelante, u otros compuestos que no hayan sido analizados.



**Figura 33. Azúcares potenciales, totales y reductores obtenidos a partir de los residuos sin tratar. Se expresan como gramos de azúcar extraídos por cada 100 gramos de residuo seco.**

#### **4.3.2. Con tratamientos hidrotérmicos**

Se sometieron las muestras, formadas por agua destilada y sustrato, a altas temperaturas y presión, según está explicado en el apartado 3.4. El objetivo final de este método es degradar los hidratos de carbono complejos, como la celulosa y la hemicelulosa. Después de realizar el tratamiento, se analizaron los azúcares totales y reductores.

Debido a la heterogeneidad de las muestras, sobre todo en las muestras de pulpa de plátano, cada vez que se utilizaba una nueva partida de muestra para realizar un tratamiento, se analizaban los azúcares potenciales y la cantidad que podía ser extraída en fresco, para que la comparación de los resultados obtenidos fuera más exacta.

En los siguientes apartados se exponen los resultados obtenidos en los tratamientos hidrotérmicos realizados en las diferentes temperaturas, 120°C, 128°C y 135°C.

##### **➤ Temperatura 120°C**

Los residuos experimentaron un tratamiento hidrotérmico en un autoclave a 120°C durante 5 minutos. En la Tabla 5 se recogen las cantidades medias de los



Universidad de Oviedo

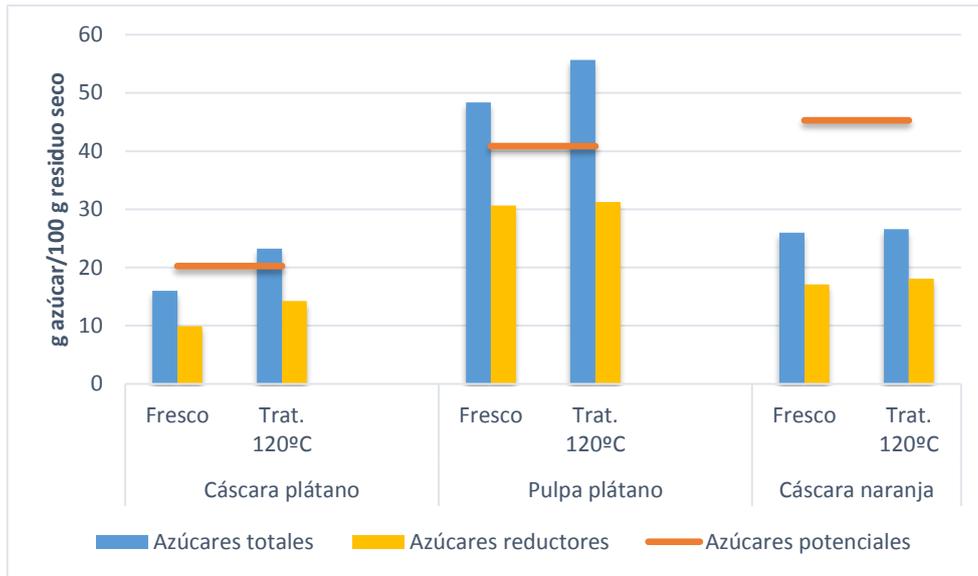
triplicados de azúcares presentes en las muestras después del tratamiento y la relación de reductores y totales en porcentaje.

**Tabla 5. Concentración de azúcares totales y reductores y su relación expresado en porcentaje, de los residuos tras el tratamiento hidrotérmico a 120°C.**

<b>Residuo</b>	<b>Totales (g/100 g residuo seco)</b>	<b>Reductores (g/100 g residuo seco)</b>	<b>Relación reductores /totales (%)</b>
Cáscara plátano	23,23 ± 0,95	14,24 ± 0,28	61,29
Pulpa plátano	55,67 ± 1,00	31,27 ± 2,11	56,18
Cáscara naranja	26,58 ± 1,25	18,08 ± 1,01	68,03

A la vista de la Tabla 5 y la Fig. 34, se puede observar que tanto los azúcares totales como reductores de la pulpa de plátano, son los que se extraen en mayor cantidad tras el tratamiento a 120°C durante 5 minutos.

La cáscara de plátano, presentó buenos resultados, pero en el caso de la pulpa de plátano y la cáscara de naranja se extrajeron prácticamente los mismos azúcares que en las muestras sin tratar. En la cáscara de plátano se extraen todos los azúcares totales presentes en la muestra, ya que su valor alcanza el de los azúcares potenciales, y se produjo un incremento de azúcares reductores del 21%. La concentración de azúcares totales de la pulpa de plátano aumenta un 18% respecto a las muestras sin tratar, y los azúcares reductores permanecen casi invariables.



**Figura 34. Azúcares totales, reductores y potenciales a partir de residuos tratados por hidrólisis térmica a 120°C y a partir de residuos sin tratar. En ambos casos se expresan como gramos de azúcar extraídos por cada 100 gramos de residuo seco.**

Respecto a la relación de azúcares reductores y totales, disminuye notablemente en la pulpa de plátano, por el aumento de extracción de azúcares totales, en la cáscara de plátano se mantiene la relación y en la cáscara de naranja sufre un ligero aumento, siendo el residuo con mayor relación de azúcares reductores y totales en el tratamiento a 120°C.

➤ **Temperatura 128°C**

Este tratamiento se realizó del mismo método que el anterior, pero modificando la temperatura de tratamiento a 128°C.

En la Tabla 6, se exponen los resultados de las medias de los triplicados obtenidos de azúcares totales y reductores y las desviaciones estándar correspondientes, y la relación de azúcares reductores y totales de las muestras sometidas a este tratamiento.



**Tabla 6. Concentración de azúcares totales y reductores y su relación expresado en porcentaje, de los residuos tras el tratamiento hidrotérmico a 128°C.**

<b>Residuo</b>	<b>Az totales (g/100 g residuo seco)</b>	<b>Az reductores (g/100 g residuo seco)</b>	<b>Relación reductores /totales (%)</b>
Cáscara plátano	23,00 ± 0,62	9,03 ± 0,34	39,28
Pulpa plátano	57,50 ± 5,67	30,91 ± 2,11	53,76
Cáscara naranja	34,08 ± 0,71	17,33 ± 1,55	50,84

Al igual que en el tratamiento anterior, la pulpa de plátano es el residuo que tiene una mayor extracción de azúcares totales y reductores.

Como se puede observar en la Fig. 35, con el tratamiento a 128°C aumentó la cantidad extraída de azúcares totales en todos los substratos, respecto a las muestras sin tratar, pero los azúcares reductores mantuvieron prácticamente invariable su porcentaje de extracción.

En la cáscara de plátano, al igual que con el tratamiento a 120°C, se extrajeron todos los azúcares totales presentes en la muestra, pero los azúcares reductores disminuyeron un 4,5%. Para la pulpa de plátano, el aumento de azúcares totales es del 22% y en el caso de la cáscara de naranja del 18%. En ambos residuos la extracción de azúcares reductores fue la misma que en las muestras sin tratar.

Para este tratamiento, a 128°C, la relación de azúcares reductores y totales, disminuyó en los tres residuos, ya que como se ha dicho anteriormente, en todos los casos aumentó la extracción de azúcares totales, pero no la de azúcares reductores, provocando que la relación entre los azúcares disminuya con respecto a las muestras sin tratar.

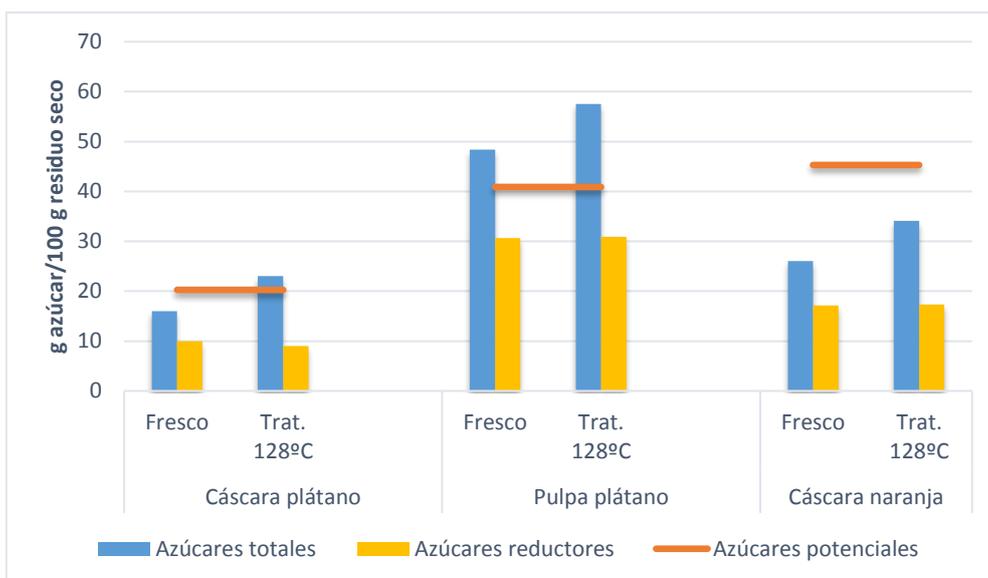


Figura 35. Azúcares totales, reductores y potenciales a partir de residuos tratados por hidrólisis térmica a 128°C y a partir de residuos sin tratar. En ambos casos se expresan como gamos de azúcar extraídos por cada 100 gamos de residuo seco.

➤ Temperatura 135°C

El último tratamiento hidrotérmico, se realizó en las mismas condiciones que los otros dos anteriores, variando únicamente la temperatura a 135°C.

En la Tabla 7. Se pueden observar los azúcares totales y reductores obtenidos por este tratamiento, y la relación de los mismos, en porcentaje.

Tabla 7. Concentración de azúcares totales y reductores y su relación expresado en porcentaje, de los residuos tras el tratamiento hidrotérmico a 135°C.

Residuo	Az totales (g/100 g residuo seco)	Az reductores (g/100 g residuo seco)	Relación reductores/totales (%)
Cáscara plátano	15,23	4,33	28,43
Pulpa plátano	65,02	36,79	56,59
Cáscara naranja	36,04	16,39	45,47

Con este tratamiento se consiguió aumentar la extracción de azúcares totales de la cáscara de naranja y sobre todo de la pulpa de plátano en 11% y 41%,

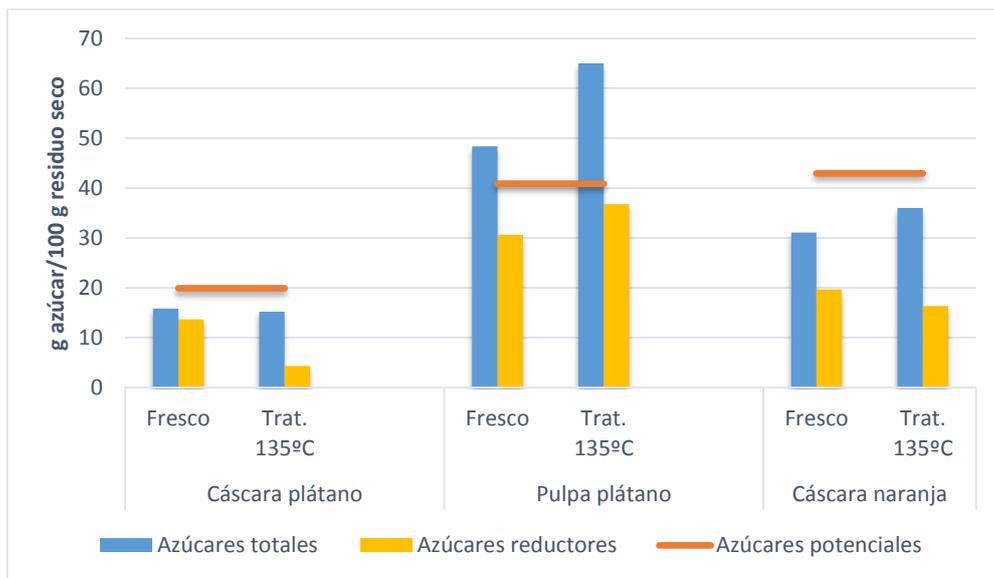


Universidad de Oviedo

respectivamente. En cambio, en la cáscara de plátano, la cantidad extraída de estos azúcares no varió.

Respecto a los azúcares reductores, sólo se consigue una mayor concentración en la pulpa de plátano, concretamente el aumento es del 14%. En la cáscara de naranja, la extracción de estos azúcares es un 7% menor que en las muestras sin tratar. Cabe destacar la gran pérdida de azúcares reductores que produjo este tratamiento en la cáscara de plátano, siendo ésta de casi el 50%, como puede observarse en la Fig. 36.

Debido a esta disminución de azúcares reductores y la estabilidad de los azúcares totales en la cáscara de plátano, la relación entre ambos disminuyó considerablemente, el 57%, con respecto a las muestras sin tratar. En la cáscara de naranja, la relación de azúcares, también disminuyó, al igual que en la pulpa de plátano, a pesar de ser éste el residuo donde ésta relación era mayor.



**Figura 36. Azúcares totales, reductores y potenciales a partir de residuos tratados por hidrólisis térmica a 135°C y a partir de residuos sin tratar. En ambos casos se expresan como gramos de azúcar extraídos por cada 100 gramos de residuo seco.**

Como hemos visto en algunos casos, como le ocurre a la pulpa de plátano a 128°C, al realizar el tratamiento se consiguió un aumento en la extracción de azúcares totales, pero la concentración de azúcares reductores no se modifica. Esto significa que los carbohidratos complejos, presentes en las muestras (celulosa, hemicelulosa y almidón) sufren hidrólisis y forman azúcares solubles, por eso aumenta la concentración de azúcares totales. Pero esos azúcares solubles que se forman no corresponden a



Universidad de Oviedo

azúcares directamente fermentables (glucosa y fructosa), por lo tanto, la concentración de los azúcares reductores, no varía.

Como podemos ver, en los tres tratamientos comentados anteriormente, la pulpa de plátano fue el sustrato donde se consiguió una mayor extracción tanto de azúcares totales como reductores, siendo a 135°C el mejor de los tratamientos analizados en este trabajo. En los otros dos tratamientos, los azúcares medidos a esta temperatura fueron similares entre sí, habiendo aumento en el caso de los azúcares totales, pero no en los reductores

Cabe destacar que, entre todos los tratamientos realizados en este trabajo, el tratamiento a 120°C para la cáscara de plátano, es el que consiguió una mayor extracción respecto a la muestra no tratada. No le ocurre lo mismo en los otros tratamientos, ya que a 128°C no se consigue aumentar la extracción de azúcares reductores y a 135°C, la concentración de estos es menor que en las muestras sin tratar. También hay que destacar que en el tratamiento a 120°C y 128°C, se extrajo el total de los azúcares respecto a los potenciales reductores determinados.

En la cáscara de naranja no se consigue un notable aumento de azúcares reductores en ninguno de los tratamientos lo que indica que no se trata de una técnica adecuada para conseguir la hidrólisis de este sustrato.

Según hemos visto, en la pulpa de plátano es el residuo que se consiguió una mayor concentración de azúcares, y esto puede explicarse al analizar la composición de los sustratos. Los carbohidratos complejos que componen la cáscara de plátano es fundamentalmente celulosa, hemicelulosa y lignina, mientras que, en la pulpa de plátano, mayoritariamente es almidón. El almidón presenta enlaces químicos menos resistentes térmicamente que los otros carbohidratos nombrados. Por esto, en la pulpa, 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 necesitarían condiciones más radicales para degradar los carbohidratos complejos. (Villanueva et al., 2013).

Esta necesidad de someter a los residuos a condiciones más severas, se corresponde con lo descrito por Correa et al., (2012), en cuyo estudio se analizó la extracción de azúcares de pulpa de plátano por medio de tratamiento hidrotérmico a



Universidad de Oviedo

temperaturas entre 110 y 200°C, obteniendo la mayor concentración de azúcares a 180°C, siendo esta de 81 g/L.

### **4.3.3. Eficacia de extracción**

En la Tabla 8 y Fig. 37, se recogen las eficacias de extracción de los azúcares reductores obtenidos de cada una de las muestras analizadas con respecto a los azúcares potenciales medidos.

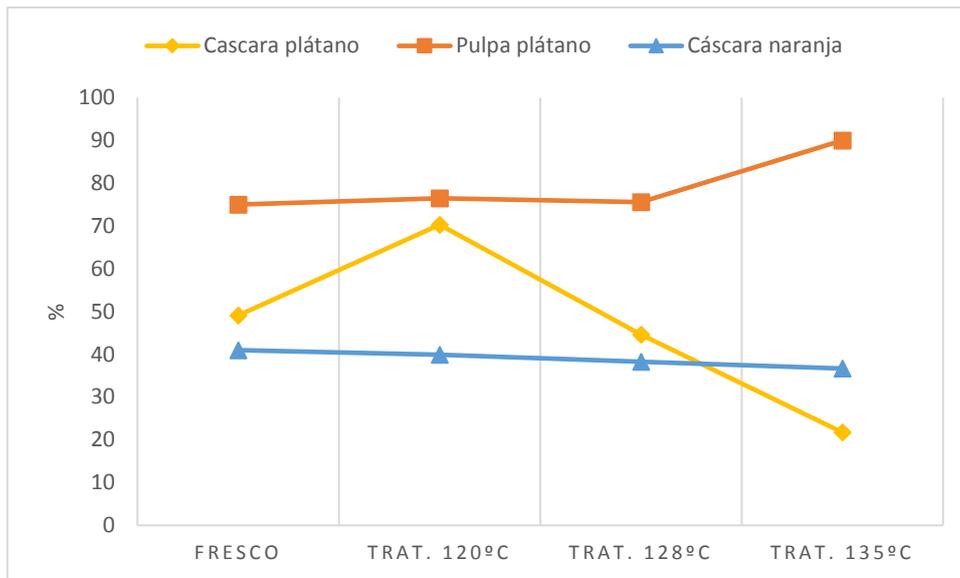
**Tabla 8. Porcentaje de extracción de azúcares reductores en las muestras sometidas a los diferentes tratamientos hidrotérmicos.**

<b>Residuo</b>	<b>Extracción en fresco (%)</b>	<b>Extracción Trat. 120°C (%)</b>	<b>Extracción Trat. 128°C (%)</b>	<b>Extracción Trat. 135°C (%)</b>
Cáscara plátano	49,1	70,3	44,6	21,8
Pulpa plátano	75,0	76,5	75,6	90,0
Cáscara naranja	41,0	39,9	38,3	36,7

El mayor porcentaje de extracción se obtuvo en la pulpa de plátano en el tratamiento a 135°C, llegando a alcanzarse una eficiencia del 90%. En la Fig. 24, se observa como los tratamientos en la cáscara de naranja no producen prácticamente variaciones en la eficacia de extracción que permaneció en torno a un 40%. Por último, en la cáscara de plátano, el mayor porcentaje se obtuvo en el tratamiento a 120°C, a 128°C no se logran extraer más azúcares reductores que en las muestras sin tratar, y a 135°C se produce una pérdida de estos azúcares.

El tratamiento óptimo sería a 120°C para la cáscara de plátano y a 135°C para la pulpa de plátano, mientras que para la cáscara de naranja no resulta adecuado este tratamiento.

Para realizar el ensayo de fermentación se escogió el tratamiento a 135°C de la pulpa de plátano, ya que era el que permitía obtener mayores concentraciones de azúcares reductores en el caldo final.



**Figura 37. Variación del porcentaje de extracción de azúcares reductores en función de la temperatura en las diferentes muestras analizadas.**

#### **4.4. Determinación de la concentración de inhibidores tras el tratamiento de hidrólisis**

El tratamiento de hidrólisis puede provocar el desarrollo de reacciones que dan lugar a la formación de compuestos inhibidores del proceso fermentativo. Como se ha mencionado anteriormente, los principales inhibidores que se forman en procesos hidrotérmicos son el ácido acético, el furfural y el hidroximetilfurfural (HMF). Estos compuestos son capaces de inhibir la fermentación llevada a cabo por bacterias y levaduras. Por otra razón, se analizaron los caldos finales obtenidos tras los tratamientos con el fin de determinar si son adecuados para llevar a cabo un posterior proceso fermentativo. Se midieron las muestras que habían sufrido el tratamiento hidrotérmico, y la de pulpa de plátano sometida al tratamiento de los azúcares potenciales para comprobar si la baja concentración de los mismo puede deberse a la formación de compuestos inhibidores a partir de los azúcares, ya que estos se generan debido a una descomposición adicional de la glucosa (Andersen et al., 2012).

Como ya se ha mencionado en el apartado 3.9, estos inhibidores se analizaron mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Los tiempos de detección de los compuestos analizados, fueron los siguientes: el furfural a los 3.9 min, el HMF a los 4.9 y el ácido acético a los 32.8 minutos. Con estos tiempos de retención, se detecta la



Universidad de Oviedo

presencia o ausencia de estos compuestos y, en base a las áreas medidas, las concentraciones correspondientes.

En la Fig. 38 se muestra un ejemplo de los cromatogramas obtenidos con la columna para furfural e HMF en la muestra de pulpa de plátano sometida al tratamiento de 135°C.

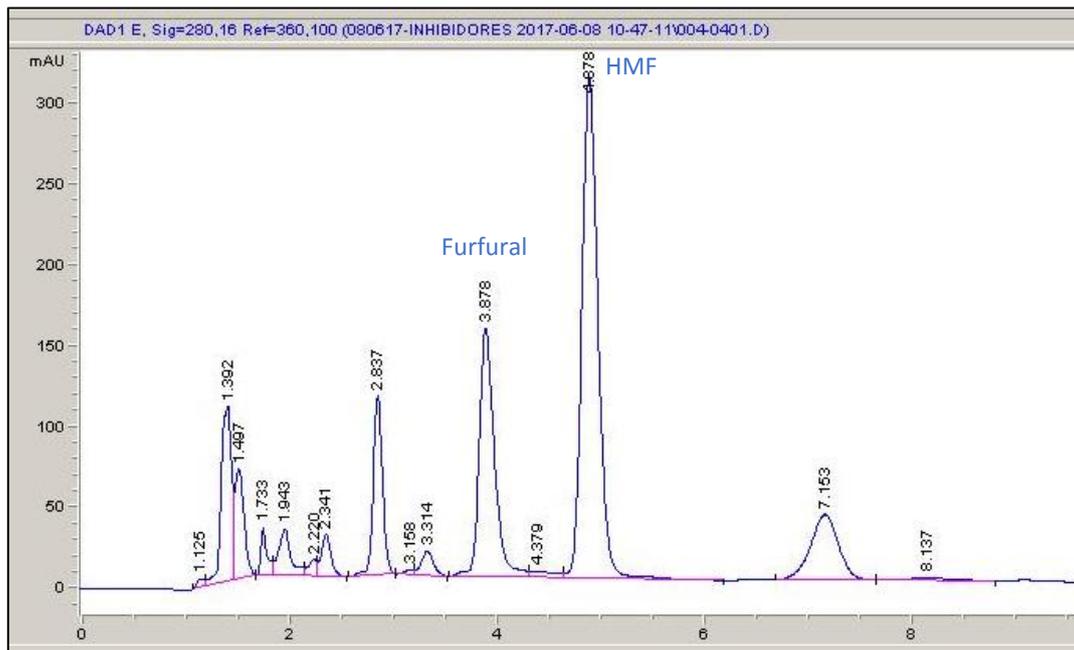


Figura 38. Presencia y concentración de furfural e HMF detectado mediante HPLC. El furfural es el pico detectado a 3.88 y el HMF a 4.88

#### 4.4.1. Furfural

El furfural es el compuesto que presenta mayor efecto inhibitorio, dentro de los compuestos furánicos, sobre la actividad de fermentativa de *S. cerevisiae*, ya que a una misma concentración el furfural presenta mayor efecto inhibitorio que el HMF (Taherzadeh et al., 2000)

En cuanto a la concentración mínima a partir de la cual pueden observarse efectos adversos, hay diversos estudios que difieren entre sí. En algunos trabajos analizados se afirma que este compuesto provoca disminución en la tasa de crecimiento de *S. cerevisiae* y de la producción de etanol a concentraciones de 2 g/l (Boyer et al., 1992). Asimismo, Banerjee estableció que concentraciones por encima de 1 g/l disminuyen significativamente el crecimiento y la producción de alcohol por *S. cerevisiae* y determinó que a partir de 4 g/l la inhibición del crecimiento es del 80% y de



Universidad de Oviedo

la producción de etanol del 97% (Banerjee et al., 1981). En artículos más recientes se estima la concentración mínima inhibitoria en 4 g/l (Taherzadeh et al., 2000).

También se han publicado estudios que demuestran que el furfural puede ser convertido por organismos fermentativos a un compuesto menos inhibitorio (ácido furfúrico y ácido furoico (Andersen et al, 2012), activando la fermentación y conduciéndola a altos rendimientos de etanol (Fernández et al., 2009).

En la Tabla 9 se recogen los resultados de las concentraciones de furfural en las muestras analizadas y el área determinada por análisis mediante HPLC, utilizada para calcular la concentración mediante la ecuación de la recta de calibrado.

**Tabla 9. Concentración de furfural en ppm, y área determinada por análisis mediante HPLC.**

Temperatura	Residuo	Área (mAUs)	Concentración furfural (ppm)
120°C	Cáscara de plátano	-	<1
	Pulpa de plátano	-	<1
	Cáscara de naranja	-	<1
128°C	Cáscara de plátano	15	<1
	Pulpa de plátano	63	<1
	Cáscara de naranja	-	<1
135°C	Cáscara de plátano	197	3,05
	Pulpa de plátano	266	4,12
	Cáscara de naranja	329	5,10
<b>Tratamiento potenciales</b>	Pulpa de plátano	498	7,72

Como se puede observar en la Tabla 9, la concentración de furfural obtenida en los tratamientos hidrotérmicos a 120°C y 128°C, en todos los substratos, 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 tratamiento realizado a 135°C y el método empleado para la extracción de azúcares potenciales (detallado en el apartado 3.6), aplicado a la pulpa de plátano, si se pudo determinar la concentración de furfural. En las



Universidad de Oviedo

muestras tratadas a 135°C la concentración es entre 3 y 5 ppm y la sometida al método de extracción de potenciales es de casi 8 ppm.

Si comparamos las concentraciones obtenidas en las muestras, con las concentraciones inhibitorias mínimas de la bibliografía, se observa que la concentración de furfural de las muestras está muy por debajo de la concentración inhibitoria del compuesto, que requeriría una concentración de 1000 ppm (1 g/l). Por lo tanto, el furfural no supondría ningún problema en el proceso fermentativo de las muestras.

#### **4.4.2. Hidroximetilfurfural (HMF)**

La concentración a partir de la cual se empiezan a observar efectos adversos también varía según los autores. En uno de los estudios analizados, se concluía que a una concentración de 2,5 g/l de HMF se observaban efectos adversos en la fermentación (Liu et al., 2009). En otra investigación, la adición de 4 g/l de HMF provocó una disminución de aproximadamente el 32% en la velocidad de evolución del dióxido de carbono (Taherzadeh et al., 2000). Según Lee, a partir de 5 g/l empezaban a tener efecto nocivo sobre *S. cerevisiae* (Lee y Jeffries, 2011).

Los resultados de las concentraciones de HMF, calculadas mediante el calibrado realizado, a partir del área, se muestran en la Tabla 10.

**Tabla 10. Concentración de hidroximetilfurfural (HMF) en ppm, y área determinada por análisis mediante HPLC.**

<b>Temperatura</b>	<b>Residuo</b>	<b>Área (mAU)</b>	<b>Concentración HMF(ppm)</b>
<b>120°C</b>	Cáscara de plátano	-	<1
	Pulpa de plátano	204	1,08
	Cáscara de naranja	79	<1
<b>128°C</b>	Cáscara de plátano	130	<1
	Pulpa de plátano	1011	5,51
	Cáscara de naranja	474	2,56
<b>135°C</b>	Cáscara de plátano	237	1,26
	Pulpa de plátano	3365	18,46
	Cáscara de naranja	1643	8,99
<b>T. potenciales</b>	Pulpa de plátano	1103	6,02



Según los datos recogidos en la Tabla 10, se observa como la concentración de HMF aumentaba a medida que incrementaba la temperatura del tratamiento. Las mayores concentraciones de HMF se obtuvieron en la pulpa de plátano para todos los tratamientos, mientras que en la cáscara de plátano se obtuvieron las concentraciones más bajas.

Para el tratamiento realizado a 120°C, las concentraciones de HMF son menores de 1 ppm, excepto en la pulpa de plátano que es de 1 ppm, igualmente concentración muy lejana de la mínima inhibitoria. Lo mismo ocurrió para el caso de furfural, por lo que se puede deducir que las condiciones de dicho tratamiento no eran las favorables para el desarrollo de las reacciones que daban lugar a la síntesis de HMF y furfural. Algo parecido ocurre en el tratamiento a 128°C, ya que las concentraciones de HMF son muy bajas, alcanzándose las mayores concentraciones en la pulpa de plátano (5,5 ppm). A 135°C, se consiguen concentraciones mayores, siendo notables la de cáscara de naranja (9 ppm) y la pulpa de plátano (18,5 ppm), siendo ésta la mayor concentración de todas las muestras analizadas. Por último, la muestra PP-POT presenta una cantidad relativamente baja de HMF (6 ppm).

Al igual que en el caso del furfural, si comparamos las concentraciones descritas como inhibitorias (2500 ppm) con las concentraciones obtenidas, éstas últimas son mucho menores, por lo que en las muestras tratadas en las condiciones descritas anteriormente no habría inhibición de la fermentación por el HMF, no siendo necesaria la etapa de detoxificación.

#### **4.4.3. Ácido acético**

La concentración mínima inhibitoria para el ácido acético se establece a partir de los 4 g/l, aunque depende de muchos factores como las condiciones de fermentación o la concentración de azúcares (Oviedo B. et al., 2012).

**Tabla 11. Concentración de ácido acético en ppm, y área determinada por análisis mediante HPLC.**

Temperatura	Residuo	Área (mAU)	Concentración ác. acético (ppm)
120°C	Cáscara de plátano	12874	50,98
	Pulpa de plátano	4672	19,82
	Cáscara de naranja	2691	12,29
128°C	Cáscara de plátano	39908	153,71
	Pulpa de plátano	11163	44,49
	Cáscara de naranja	1489	7,72
135°C	Cáscara de plátano	13462	53,22
	Pulpa de plátano	8314	33,66
	Cáscara de naranja	7115	29,10
<b>Tratamiento potenciales</b>	Pulpa de plátano	1441	7,54

Como se observa en la Tabla 11, el ácido acético es el inhibidor que se presentó en mayor concentración en las muestras. En este caso, el residuo que presentó una mayor concentración de ácido acético es la cáscara de plátano en todos los tratamientos, llegando a alcanzar los 154 ppm a 128°C. La cáscara de naranja es el substrato con menores concentraciones, también, en los tres tratamientos.

Al igual que en los compuestos analizados anteriormente, las muestras sometidas al tratamiento a 120°C, son las que presentan una menor concentración de ácido acético, excepto en el caso de la cáscara de naranja, residuo cuya menor concentración se obtiene con el tratamiento a 128°C. Aun así, estas muestras tienen concentraciones superiores a las obtenidas con el furfural y el HMF.

Las muestras correspondientes al tratamiento a 128°C son las que presentan mayor concentración de ácido acético, exceptuando la muestra de cáscara de naranja. Cabe destacar, la alta concentración presente en la cáscara de plátano, 154 ppm, siendo éste el mayor valor obtenido de ácido acético.

En el tratamiento a 135°C, las muestras de cáscara de plátano y pulpa de plátano tienen valores intermedios con respecto a los otros dos tratamientos, pero cabe



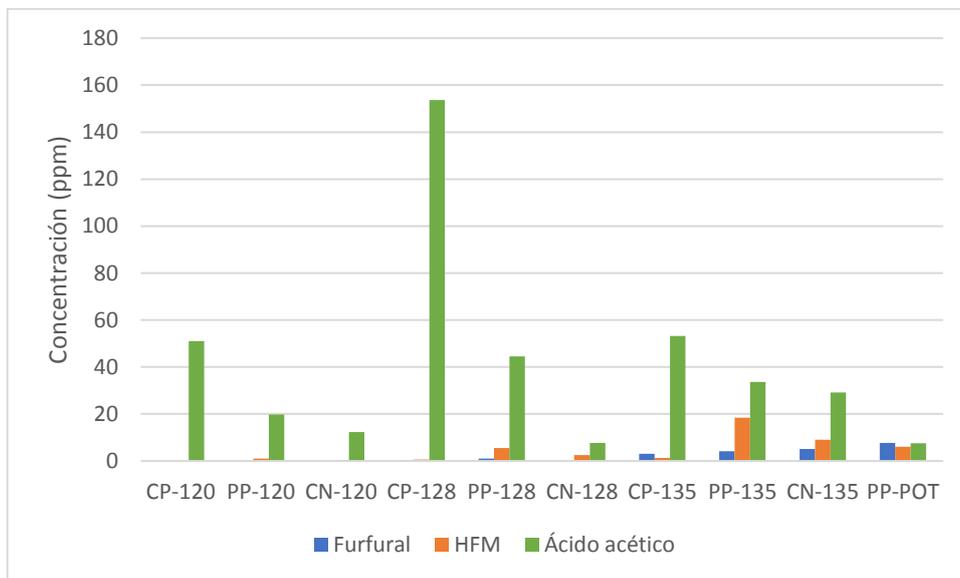
Universidad de Oviedo

mencionar, que es el tratamiento donde se consigue una mayor concentración de ácido acético.

Para terminar, la muestra de pulpa de plátano sometida al tratamiento para medir azúcares potenciales, es la que presenta la menor concentración de acético, de entre el resto de muestras, siendo esta de 7,5 ppm.

Al comparar las concentraciones obtenidas con la concentración mínima inhibitoria, referenciada anteriormente, se observa que la concentración de ácido acético obtenida en las muestras está muy por debajo de la concentración inhibitoria, ya que la máxima concentración analizada es de 154 ppm, lo que equivale a 0,154 g/l, en la muestra CP-120, y la concentración inhibitoria referenciada es de 4 g/l. A la vista de lo anterior, el ácido acético no supondría un problema en la fase de fermentación.

En la Fig. 39 se recoge un resumen de los resultados explicados anteriormente. Se puede ver claramente como el ácido acético es el compuesto que presenta una mayor concentración en las muestras analizadas.



**Figura 39. Concentraciones de las muestras sometidas a tratamiento hidrotérmico y la muestra de pulpa de plátano tratado con el método de análisis de azúcares potenciales, expresadas en ppm, de furfural, HMF y ácido acético obtenidas del análisis mediante HPLC. CP: cáscara de plátano, PP: pulpa de plátano, CN: cáscara de naranja, POT: tratamiento de azúcares potenciales, y 120,128 y 135 corresponden a las temperaturas utilizadas en los tratamientos hidrotérmicos.**



## 4.5. Proceso fermentativo

Como se ha ido repitiendo durante el trabajo, los tratamientos hidrotérmicos realizados en los sustratos tenían como fin aumentar la concentración de azúcares directamente fermentables, al degradar carbohidratos complejos presentes en las muestras, para realizar una posterior fermentación y obtener una mayor cantidad de bioetanol que el que se tendría en sustratos sin hidrolizar.

### 4.5.1. Caracterización del sustrato de partida

Para la realización de la fermentación alcohólica se utilizó como sustrato la muestra de pulpa de plátano sometida al tratamiento hidrotérmico a 135°C. Se seleccionó este sustrato ya que es la muestra a partir de la que se consiguió extraer una mayor cantidad de azúcares reductores, 36,8 g/100 g residuo seco, por tanto, se consideró la muestra que permitiría obtener una mayor producción de bioetanol.

Este sustrato se preparó según está explicado en el apartado 3.5.1, quedando finalmente 200 mL del mismo, repartido en 2 botellas Pyrex de 100 mL. Se realizó un estudio de las concentraciones de azúcar de la muestra, antes y después de sufrir el tratamiento hidrotérmico y también se estimó la concentración de azúcares potenciales, siguiendo el método comentado en el apartado. Los resultados de lo aquí mencionado se exponen en la siguiente tabla.

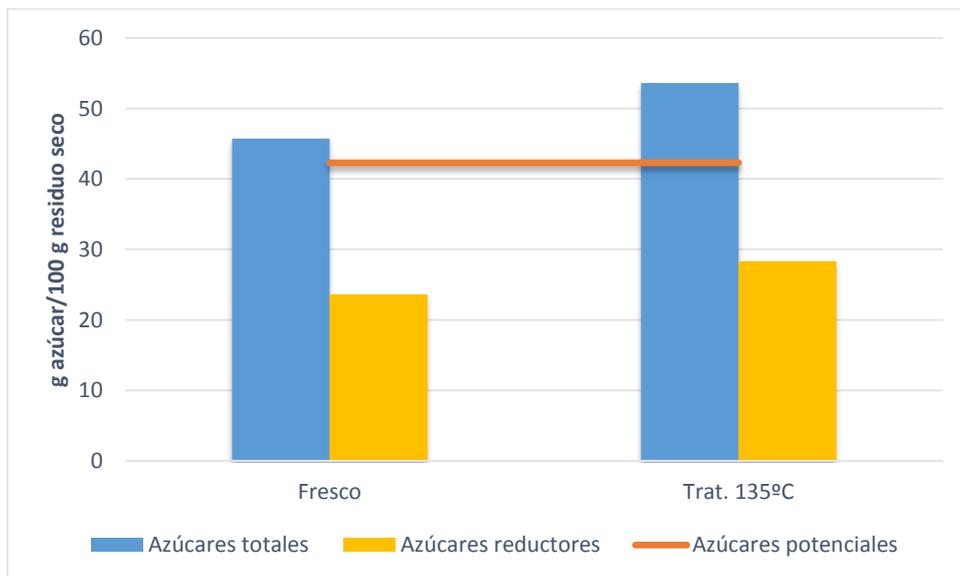
**Tabla 12. Azúcares totales, reductores y potenciales expresados en g azúcar/100 g de residuo seco, de la muestra de pulpa de plátano utilizada como sustrato en la fermentación, sin realizar tratamiento y después de someter a tratamiento hidrotérmico a 135°C. También se indica la relación de azúcares reductores y totales, y el porcentaje de extracción.**

	Azúcares totales (g/100 g r.s.)	Azúcares reductores (g/100 g r.s.)	Azúcares potenciales (g/100 g r.s.)	Relación reductores/totales (%)	Eficacia de extracción (%)
<b>Fresco</b>	45,72	23,62	42,3	51,7%	55,8%
<b>Trat. 135°C</b>	53,61	28,33		52,8%	67,0%



Tanto en la Tabla 12, como en la Fig. 40, se observa como la concentración de azúcares, totales y reductores, sufre un aumento gracias al tratamiento. Concretamente, el porcentaje de extracción de azúcares reductores aumenta, en la muestra tratada, un 11%, con respecto a la muestra sin tratar (en fresco). La relación de azúcares reductores y totales se mantuvieron igual después del tratamiento, lo que significa que se hidrolizan carbohidratos complejos a azúcares (medidos como azúcares totales), y una parte de ellos corresponden a glucosa y fructosa (azúcares reductores).

En la Fig. 40, se puede visualizar claramente este aumento de cantidad de azúcar comentado anteriormente. También cabe destacar, la concentración de azúcares potenciales obtenida, ya que, al igual que ocurría al realizar tratamientos similares, esta concentración es menor que la de los azúcares totales, cuando lo lógico sería que la cantidad de azúcares potenciales fuera mayor que la de totales. A pesar de ello, ya se ha mencionado que el tratamiento utilizado para analizar los azúcares potenciales, puede que tenga las condiciones para formar, a partir de azúcares simples, compuestos inhibidores y otro tipo de compuestos.



**Figura 40. Azúcares totales, reductores y potenciales expresados en g azúcar/100 g de residuo seco, de la muestra de pulpa de plátano utilizada como sustrato en la fermentación, sin realizar tratamiento y después de someter a tratamiento hidrotérmico a 135°C**

El pH óptimo para el desarrollo de *S. cerevisiae* es de entre 4 y 5, sin embargo, tiene una amplia tolerancia lo que le permite desarrollarse en medios inicialmente neutros. En este caso, se midió el pH antes de iniciar la fermentación y se obtuvo un valor de 4,7, por lo que, respecto al pH, la levadura se encuentra en condiciones



Universidad de Oviedo

óptimas. Respecto a la concentración de azúcares fermentables (azúcares reductores) que tiene el medio de fermentación, el valor es de 28 g/100 g residuo seco, lo que equivale a una concentración de 37 g/L en el caldo obtenido después de la hidrólisis (Tabla 12). El porcentaje de azúcar fermentable en base húmeda es del 3,7%, lo que permitiría llegar a una concentración teórica de alcohol del 2,4% (v/v).

#### **4.5.2. Azúcares**

Los azúcares constituyen la principal fuente de carbono empleada por los microorganismos. Estos azúcares son utilizados por las levaduras dando lugar a etanol, CO<sub>2</sub> y biomasa como principales productos, lo que provoca que su concentración disminuya a medida que la fermentación avanza.

La concentración de azúcares iniciales y finales se muestra en la Tabla 13 junto con la relación de azúcares reductores y totales.

**Tabla 13. Concentraciones azúcares totales y reductores antes de iniciar la fermentación y del tiempo final de la misma, expresadas en g de azúcar en 100 g de residuo seco. También se indica el porcentaje de relación de azúcares reductores y totales.**

	<b>Az. Totales (mg/L)</b>	<b>Az. Reductores (mg/L)</b>	<b>Relación reductores/totales (%)</b>
<b>Concentración inicial</b>	70257	37137	52,84
<b>Concentración final</b>	29918	26055	87,09

El consumo de azúcares totales es de aproximadamente 40 g/L, y el de azúcares reductores de 11 g/L. La velocidad de consumo de azúcares, calculada con los datos de azúcares totales y teniendo en cuenta que la fermentación duró 68,7 horas, fue de 0,59 g/L\*h. El rendimiento en cuanto al consumo de azúcares, entendido como azúcares consumidos/ azúcares totales iniciales, alcanzado en esta fermentación fue del 42,6%.

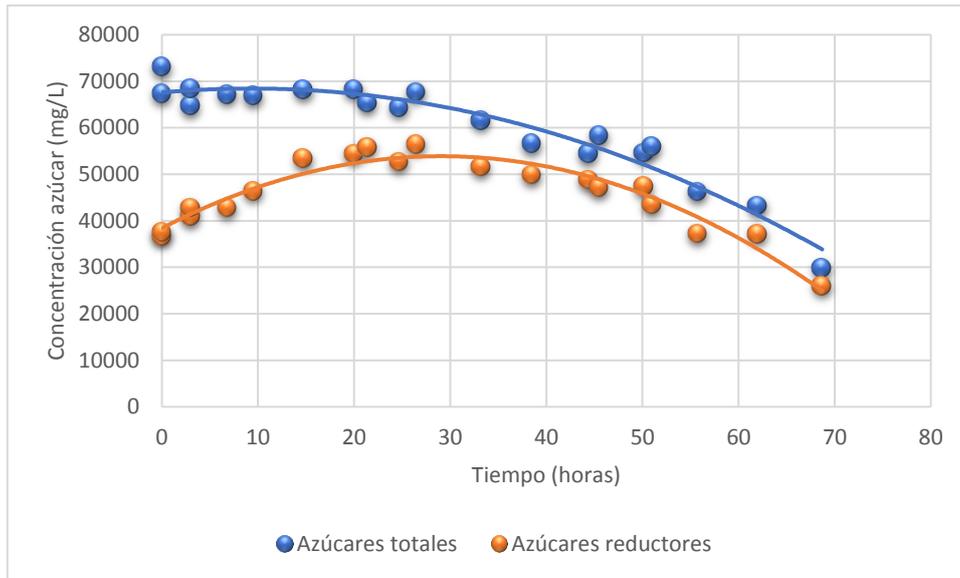


Figura 41. Evolución de la concentración de azúcares totales y reductores a lo largo del proceso fermentativo, expresado en mg/L de caldo

En la Fig. 41 se puede ver la evolución de la concentración de azúcar, tanto totales como reductores, durante la fermentación. Al añadir la levadura en estado liofilizado, necesita un tiempo de aclimatación al sustrato, y por ello, al principio los azúcares totales permanecen estables. Es a partir de las 22 horas de fermentación cuando la concentración de estos empieza a disminuir.

En el caso de los azúcares reductores, en las primeras 30 horas su concentración aumenta, esto significa que las levaduras hidrolizan azúcares que antes no eran fermentables (y no se medían como reductores) a moléculas fermentables. Cabe pensar que *S. cerevisiae* hidroliza la sacarosa, que se mide como azúcar total y no es fermentable, a glucosa y fructosa, ambos azúcares directamente fermentables, razón por la cual la concentración de estos aumenta. Después de las primeras 30 horas, la cantidad de azúcares reductores empieza a disminuir, pero las levaduras empiezan a consumir ese azúcar para producir bioetanol a partir de las 22 horas que es cuando empieza a disminuir la concentración de azúcares totales, como se mencionó anteriormente.

A pesar de que la concentración de azúcar disminuye, al final de la fermentación, queda azúcar residual, es decir, que no se consumió todo el azúcar presente en el biorreactor. Dicho esto, cabe pensar que la fermentación tenía que haber permanecido durante más tiempo.



Como se observa en la Tabla 13, la relación de azúcares reductores y totales al final de la fermentación aumenta un 34% con respecto al valor inicial. Esto ocurre por el proceso, ya explicado, de la hidrólisis de la sacarosa en glucosa y fructosa, haciendo que aumente el número de azúcares reductores y aumentando, por tanto, el porcentaje de relación.

Los cálculos de la producción de etanol se realizaron con el dato de los azúcares totales ya que, como hemos visto, son los que reflejan el verdadero consumo de azúcar por parte de las levaduras.

### **4.5.3. Etanol**

Como ya se ha comentado, en la fermentación alcohólica se utilizan como sustrato los hidratos de carbono presentes en el medio para transformarlos en etanol, dióxido de carbono y energía en forma de ATP. Por tanto, la disminución de la concentración de azúcares analizada en el apartado anterior, hace suponer una producción de etanol paralelo a ella. La producción de etanol se lleva a cabo a través de la vía glucolítica, que, en su forma más simple, se puede expresar de la siguiente forma:



A partir de esta fórmula, se deduce que por cada mol de glucosa consumido se producen dos moles de etanol. Sin embargo, este rendimiento es solamente teórico, ya que no toda la glucosa consumida es convertida en etanol, sino que un porcentaje será utilizado para la síntesis de las estructuras celulares y mantenimiento de la célula. Bajo condiciones ideales se ha estimado una eficacia del proceso de fermentación alcohólica por *S. cerevisiae* del 85% (Vázquez et al., 2007).

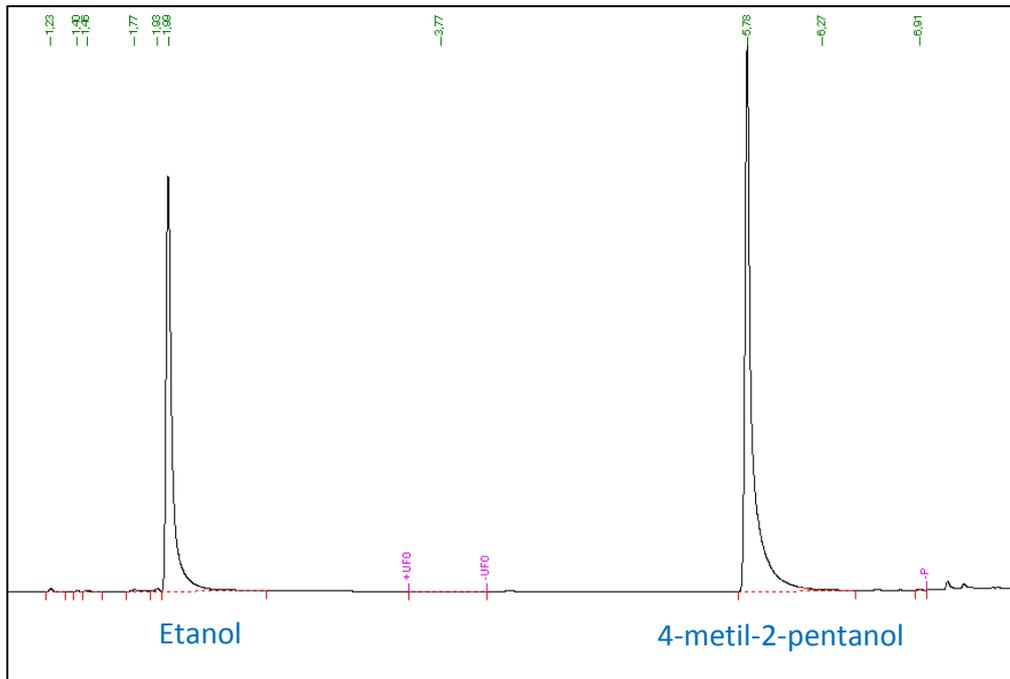
Como se explica en el apartado 3.10, el etanol se detecta mediante cromatografía de gases. El tiempo de retención del etanol es a los 2 minutos, y con este tiempo se detecta la presencia o ausencia de etanol y la concentración correspondiente, a lo largo de la fermentación.

En la Fig. 42 se muestran los diferentes elementos compuestos por el cromatógrafo de gases. Corresponde a la muestra de tiempo final de la fermentación, donde la concentración de etanol es mayor, por tanto, en la imagen se observan dos



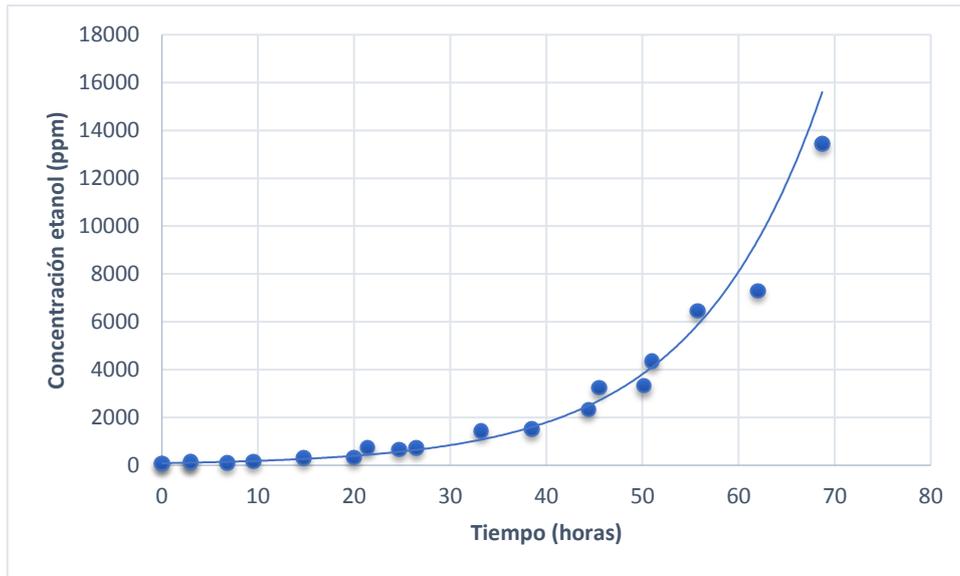
Universidad de Oviedo

picos principales que corresponden al etanol detectado a los 2 minutos y el patrón interno (4-metil-2-pentanol) a los 5.8 minutos.



**Figura 42. Concentración de etanol correspondiente al tiempo final de la fermentación, detectado en el minuto 1.99 y el patrón interno, en el minuto 5.8, mediante cromatografía de gases.**

La evolución de la concentración de etanol puede verse en la Fig. 43. Cabe destacar que en el tiempo cero de la fermentación, la cantidad de etanol presente en la muestra es de 0,01% (v/v), por lo que puede que las condiciones del tratamiento favorezcan la generación de una pequeña cantidad de etanol, o que el etanol ya estuviera presente en la muestra antes de realizar el tratamiento por un proceso fermentativo del substrato, que cabe recordar, es un residuo.



**Figura 43. Evolución de la concentración de etanol durante el proceso fermentativo, expresada en ppm.**

La concentración de etanol, como ocurría con la concentración de azúcar, se mantiene a niveles muy bajos, y a partir de las 20 horas, momento a partir del cual se apreció el aumento en la producción de etanol. La concentración de etanol alcanzada a las 69 horas es de 13,5 g/L. Teniendo en cuenta la densidad del etanol (789 g/L) se puede calcular la graduación alcohólica del producto final, siendo esta del 1,7% (v/v).

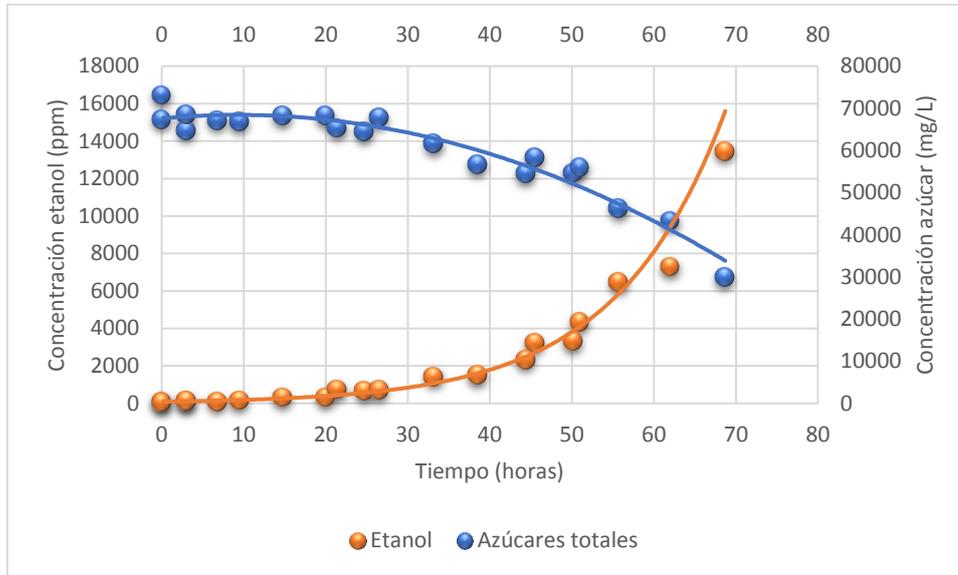
Por cada mol de glucosa se producen dos moles de etanol, con lo que la producción teórica de etanol sería de 0,5 gramos de etanol producido por gramo de glucosa consumido. Teniendo en cuenta el azúcar consumido, que como se mencionó anteriormente se calcula con los datos de los azúcares totales, y la densidad de etanol se puede calcular la concentración teórica en 2,4% (v/v) de etanol. Teniendo en cuenta el valor real y el teórico, la fermentación tiene un rendimiento del 70,3% respecto al azúcar consumido, porcentaje algo menor que el referenciado (85%).

Cabe destacar que el volumen de bioetanol obtenido (1,7% (v/v)), no es el máximo que se podría haber producido, ya que como hemos visto, en el tiempo de parada de la fermentación, todavía quedaba una alta concentración de azúcares fermentables, que, si se hubiesen consumido, las levaduras habrían producido más bioetanol. Por ello, lo ideal habría sido continuar la recogida de datos durante un día más con el fin de permitir que todos los azúcares fermentables fueran consumidos.



Universidad de Oviedo

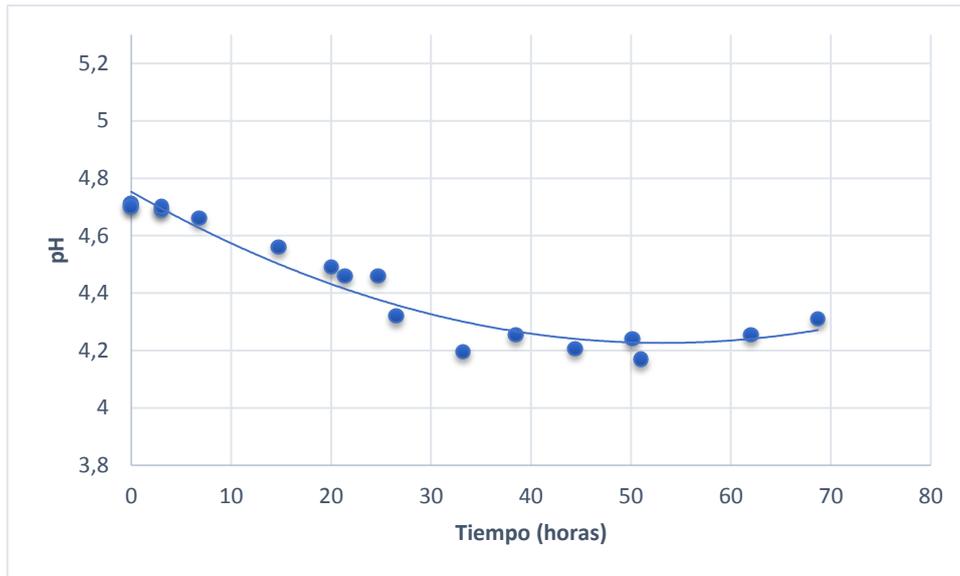
En la Fig. 44, se observa claramente como la concentración de azúcares totales disminuye a medida que aumenta la producción de etanol por parte de la levadura. Como se ha comentado anteriormente, los azúcares de referencia son los totales, a pesar de que no todos son fermentables, ya que el dato de los reductores no es válido, al aumentar su concentración al inicio de la fermentación por hidrólisis de la sacarosa.



**Figura 44. Evolución de la concentración de azúcares totales, expresada en mg/L, y de etanol, expresada en ppm, durante la fermentación**

#### 4.5.4. pH

Al inicio de las fermentaciones alcohólicas se produce un descenso del pH que deriva del propio metabolismo de las levaduras, ya que, como productos de la fermentación alcohólica, además de etanol y CO<sub>2</sub>, se obtienen ácidos orgánicos (láctico, succínico, málico...) que, aunque son producidos en pequeña cantidad afectan a los valores de pH. También presenta gran influencia sobre la acidificación del medio la formación de CO<sub>2</sub> durante el proceso, ya que, al tratarse de medios acuosos, parte del CO<sub>2</sub>, generado durante la fermentación, se disuelve en el agua formando ácido carbónico. (Redondo, E. et al., 2014)



**Figura 45. Evolución del pH a lo largo de la fermentación.**

El descenso típico de las fermentaciones alcohólicas comentado anteriormente, se produce en la fermentación realizada en este trabajo, como muestra la Fig. 45. El valor inicial del pH es de 4.71, y disminuye hasta estabilizarse en valores entre 4.2 y 4.3.

El valor de pH de la mayor parte de las bebidas fermentadas está entre 3 y 4. En esta fermentación no se llegó a valores tan bajos debido a la baja concentración de azúcares del medio y al hecho de que no se esperó a que se alcanzaran las máximas concentraciones de etanol, lo que hizo que el proceso fermentativo tuviera lugar en poca extensión. Con respecto a fermentaciones, por ejemplo, de vino o sidra.

#### **4.5.5. Microbiología**

Tras la inoculación con *S. cerevisiae* se hicieron recuentos en placas de microorganismos para observar el crecimiento de la levadura durante la fermentación, observándose que, durante el proceso fermentativo, las levaduras sufrieron un incremento desde  $10^5$  ufc/mL hasta  $10^7$  ufc/mL. En la Fig. 46 se pueden ver las colonias que crecieron en la placa correspondiente a las 62 horas de fermentación y sembradas con una dilución de  $10^{-6}$ .



**Figura 46. Observación en placa de colonias de *S. cerevisiae*, correspondiente a las 62 horas de fermentación.**



## **5. CONCLUSIONES**

A continuación, se exponen las principales conclusiones obtenidas en este trabajo:

- Para la cáscara de naranja, el tratamiento hidrotérmico a temperaturas entre 120 y 135°C no resulta adecuado.
- De las tres temperaturas ensayadas (120°C, 128°C y 135°C), la mayor extracción de azúcar para la cáscara de plátano fue obtenida a la mínima temperatura, mientras que, en el caso de la pulpa de plátano, la mayor extracción de azúcar se obtuvo a 135°C.
- La mayor eficacia de extracción se obtuvo a partir de pulpa de plátano a 135°C, consiguiéndose valores del 90%, lo que coincidió con la obtención de las mayores concentraciones de azúcar en los caldos finales (45120 mg/L).
- Se detectó presencia de compuestos inhibidores (furfural, HMF y ácido acético) en la mayor parte de las muestras hidrolizadas. Si bien, en todos los casos estaba muy por debajo de las concentraciones mínimas inhibitorias, por lo que no fueron un problema para el posterior proceso fermentativo.
- El proceso fermentativo del caldo obtenido a partir de pulpa de plátano tratada hidrotérmicamente a 135°C, se llevó a cabo de manera satisfactoria obteniéndose un producto final con una concentración de bioetanol de 1,7% (v/v).
- En base a los resultados obtenidos, se recomienda seguir el proceso fermentativo durante un día más (4 días) con el fin de aumentar el rendimiento global del proceso.



## **6. BIBLIOGRAFÍA**

- Abril, A., y Navarro, E. A. (2012). “*Etanol a partir de biomasa lignocelulósica*”. Aleta.
- Alarcón, A. (2010). “*Producción de Bioetanol con Zymomonas mobilis*”. Tesis de grado del Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología.
- Andersen, F., Moreno, S., y Díaz, S. (2012). “*Determinación de parámetros cinéticos en modelos de producción de bioetanol a partir de glucosa y xilosa en presencia de furfural*”. Conference Paper: 2do Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos, At La Plata, Buenos Aires
- APPA (2015). “*Estudio del Impacto Macroeconómico de las Energías Renovables en España*”. Fecha de consulta: 9 de julio de 2017. Disponible en: <http://www.appa.es/descargas/Estudio-espanol-2015.pdf>
- ASPROCAN (2016). “*Estudio de las diferencias entre el plátano de Canarias y la banana*”. Fecha de consulta 9 de julio de 2017. Disponible en: [http://platanodecanarias.net/wp-content/uploads/2016/10/DIF\\_P\\_BANANA\\_DESCARGABLE.pdf](http://platanodecanarias.net/wp-content/uploads/2016/10/DIF_P_BANANA_DESCARGABLE.pdf)
- Banerjee, N., Bhatnagar, R., y Viswanathan, L. (1981). “*Inhibition of glycolysis by furfural in Saccharomyces cerevisiae*”. Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 11(4), pp. 226-228.
- Barroso M, (2010). “*Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de una biorrefinería*” Tesis en la Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Forestal de la Universidad Politécnica de Madrid.
- Boyer, L. J., Vega, J. L., Klasson, K. T., Clausen, E. C., y Gaddy, J. L. (1992). “*The effects of furfural on ethanol production by saccharomyces cerevisiae in batch culture*”. Biomass and Bioenergy, vol 3(1), pp. 41-48.
- Centro Nacional de Educación Ambiental (CNEA), (2016). “*Tanto hambre, tanta comida en la basura*”.
- Cerón–Salazar, I. y Cardona–Alzate, C. (2011). “*Evaluación del proceso integral para la obtención de aceite esencial y pectina a partir de cáscara de naranja*”. Ingeniería y Ciencia, vol. 7 (13)



Universidad de Oviedo

- Correa, J.F., Ruiz, A.A y Garrote, G. (2012). “*Estudio del tratamiento hidrotérmico de fruta de banana*”. *Afinidad* LXIX, vol. 559, Julio – Septiembre
- Cunningham, R.E and López, G.D. (1994). “*Etanol de lignocelulósicos*”. Universidad de Santiago de Compostela. Servicio de publicaciones e intercambio científico (Campus).
- De Juana, J. et al. (2003). “*Energías renovables para el desarrollo*”. Thomson Editores, Paraninfo S.A., España, pp. 311.
- Dermirbas, A. (2009). “*Biofuels securing the planet’s future energy needs*”. *Energy Conversion and Management*. Vol. 50, pp. 2239–2249.
- Díaz. A.I. (2015). “Hidrólisis de residuos de la venta de verduras y hortalizas para la producción de bioetanol”. Trabajo Fin de Máster de Facultad de Química de la Universidad de Oviedo.
- Díaz, A.I., Laca, A., Laca, A., y Díaz, M., (2017). “*Treatment of supermarket vegetable wastes to be used alternative substrates in bioprocesses*”. *Waste Management*
- FAO, (2008). “*El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Biocombustibles: perspectivas, riesgos y oportunidades*”. Roma
- FAO, (2012).a. “*La función de las organizaciones de productores en la reducción de las pérdidas y el desperdicio de alimentos*”. Roma
- FAO, (2012).b. “*Pérdidas y desperdicio de alimentos en el mundo. Alcance, causas y prevención*”. Roma.
- FAO, (2013). “*La bioenergía y los biocombustibles*”. Roma
- FAO, (2015). “*Iniciativa mundial sobre la reducción de la pérdida y el despilfarro de alimentos*”. Roma.
- García, C., Dussán, S., y Gutiérrez, N. (2012). “*Uso de horno microondas en la determinación de contenido de humedad: Yuca, ñame y plátano*”. *Rev.Bio.Agro*. Vol.10 (1), pp.60-66. ISSN 1692-3561 Disponible en:  
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1692-35612012000100008&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612012000100008&lng=en&nrm=iso)



Universidad de Oviedo

- Gerena, F. M. (2013). “*Obtención de jarabes azucarados a partir de la hidrólisis química de residuos de cáscaras de naranja (citrus sinensis l var valencia) y papa (solanum tuberosum) variedad diacol capiro (r-12) para ser empleados como edulcorantes en la industria de alimentos*”. Trabajo de fin de grado de la escuela de ciencias básicas tecnológicas e ingeniería de Duitama. UNAD
- González, A. F., et al. (2008). “*Biocombustibles de segunda generación y Biodiesel: Una mirada a la contribución de la Universidad de los Andes*”. Revista de Ingeniería. ISSN 0121-499. Fecha de consulta: 9 de julio de 2017. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=121015051010>
- Granda, D., Mejía, A., y Jiménez, G. (2005) “*Utilización de residuos de plátano para la producción de metabolitos secundarios por fermentación en estado sólido con el hongo Lentinus crinitus*”. Rev. Vitae. Vol. 12 (2), pp.13-20
- Hackenberg, N. (2008) “*Biocombustibles de segunda generación*”. REDESMA. Vol. 2 (2), pp. 49-61
- Haghighi Mood, S., Hossein Golfeshan, A., Tabatabaei, M., Salehi Jouzani, G. Hassan Najafi, G., Gholami M y Adrjmand M. (2013). “*Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment*”. Renewable and Sustainable Energy Reviews. Vol. 27, pp. 77–93
- Jonsson, L., y Martín, C. (2016). “*Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects*”. Rev. Bioresource Technology. Vol. 199, pp.103-112
- Lenihan, P. et al. (2011). “*Kinetic modelling of dilute acid hidrolisis of lignocellulosic Biomass*”. Biofuel Production, Vol. 12, pp. 293-307. (Nothern Ireland). DOI: 10.5772/17129
- Lee, J. W., y Jeffries, T. W. (2011). Efficiencies of acid catalysts in the hydrolysis of lignocellulosic biomass over a range of combined severity factors. *Bioresource technology*, 102(10), pp. 5884-5890.
- Liu, L., et al. (2009). “*Evolutionarily engineered ethanologenic yeast detoxifies lignocellulosic biomass conversion inhibitors by reprogrammed pathways*”. Mol Genet Genomics, Vol. 282, pp. 233-244.



Universidad de Oviedo

- Ly, J. (2004). “*Bananas y plátanos para alimentar cerdos: Aspectos de la composición química de las frutas y de su palatabilidad*”. Rev. Computadorizada de Producción Porcina. Vol. 11 (3).
- MAPAMA, (2013). “*Gestión de biorresiduos de competencia municipal*”
- MINETAD (2015). “*La energía en España. 2015*”. Catálogo de publicaciones de la Administración General del Estado, pp. 30-34.
- Mussatto, S. I., y Roberto, I. C. (2004). “*Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review*”. Bioresource technology. Vol 93(1), pp. 1-10.
- Murillo, J.S. et al. (2016). “*Producción de etanol carburante de segunda generación a partir de residuos como cáscaras de banano, maracuyá y naranja (eficiencia en obtención de melazas) utilizando la levadura Candida utilis en fermentación*”. Rev. Sennova (Colombia). Vol. 2 (1). 15-29 file:///C:/Users/Usuario1/Downloads/535-1644-1-SM.pdf
- OCDE/FAO (2016). “*OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2016-2025*”. OCDE Publishing, París.
- Orlando A. y Chaparro-Giraldo A. (2009). “*Biocombustibles, seguridad alimentaria y cultivos transgénicos*”. Salud pública. 11 (2), pp. 290-300 <http://www.scielosp.org/pdf/rsap/v11n2/v11n2a13>
- Oviedo, B., José y Rincón, D. y Anderson, J. (2012) “*Estudio de agentes inhibitorios en el proceso de fermentación en la obtención de etanol a partir de material lignocelulósico y amiláceo*”. [ed.] Programa de Ingeniería Agroindustrial.
- Palomino, A., Estrada, C. y López, J., (2010). “*Microalgas: Potencial para la producción de biodiesel*”. Congresso brasileiro de mamona,4 & simposio internacional de oleaginosas energéticas, João Pessoa. pp. 149-157
- Parfitt, J., Barthel, M. y Macnaughton, S. (2010). “*Food waste within food supply chains: quantification and potential for change to 2050*”. Philosophical Transactions of the Royal Society, 365: 3065-3081
- Pérez J.A., (2008) “*Estudio del pretratamiento con agua caliente en fase líquida de la paja de trigo para su conversión biológica a etanol*”. Tesis doctoral de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Jaén.



Universidad de Oviedo

- Redondo, E., Laca, A., Laca, A., Rendueles, M. y Díaz, M. (2014). “*Evaluación de la obtención de bioetanol a partir de fruta no apta para el consumo*”. Rev. Alimentaria. Nº 454. Especial bebidas, pp. 56-63.
- Robledo, A., Noé, C. y Montañez, J.C., (2012). “*Uso del olote de maíz como sustrato microbiano para la obtención de xilanasas*”. Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila. Vol. 4 (7).
- Rodríguez, I. (2016). “*Pretratamiento de hidrólisis hidrotérmicas para la degradación de los carbohidratos complejos de residuos de frutas para la obtención de bioetanol*”. Trabajo fin de Máster de la Facultad de Química en la Universidad de Oviedo.
- Salinas, E. y Gasca, V., (2009). “*Los biocombustibles*”. El Cotidiano. ISSN 0186-1840. Fecha de consulta: 9 de julio de 2017. Disponible en: <http://lorenzcolombiawww.redalyc.org/articulo.oa?id=32512739009>
- Sánchez, A. M., et al., (2010). “*Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos*”. Rev. Tumbaga, vol 1 (5).
- Sela, A., (2015). “*Hidrólisis de residuos lignocelulósicos procedentes del comercio de frutas y hortalizas como paso previo a la producción de bioetanol*”. Trabajo de fin de grado en la Escuela Politécnica de Ingeniería de Gijón de la Universidad de Oviedo.
- Stratta, J. (2000). “*Biocombustibles: los aceites vegetales como constituyentes principales del biodiesel*”. Fecha de consulta: 9 de julio de 2017. Disponible en:
- Taherzadeh, M. J., Gustafsson, L., Niklasson, C., & Lidén, G. (2000). “*Inhibition effects of furfural on aerobic batch cultivation of Saccharomyces cerevisiae growing on ethanol and/or acetic acid*”. Journal of bioscience and bioengineering, vol. 90(4), 374-380.
- Teixeira, F., et al. (2015). “*Biological properties of Apple pomace, orange bagasse and passion fruit peel as alternative sources of dietary fibre*”. Bioactive carbohydrates and dietary fibre. Vol: 6 (1), pp. 1-6
- Toledo M.E., et al. (2006). “*Carbohidratos*”. Curso química II. Facultad de Ingeniería química en la Universidad Nacional de Callao.
- Tomás, M.E. (2009) “*Bioetanol de paja de trigo: estrategias de integración de las etapas de proceso*”. Tesis doctoral de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid.
- Velásquez-Arredondo H.I., Ruíz-Colorado, A.A. y De Oliveira S. (2010). “*Ethanol production process from banana fruit and its lignocellulosic residues: Energy analysis*”. Energy. 35, pp. 3081-3087



Universidad de Oviedo

Viñals-Verde, M., Bell-García, A., Michelena-Álvarez, G., Ramil-Mesa, M., (2012).

“*Obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica*”. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar.

Villanueva, Z. et al. (2013). “*Comportamiento productivo de corderos de pelo alimentados con residuo fresco de naranja (Citrus sinensis) en sustitución de granos de sorgo (Sorghum vulgare)*”. Rev. Cubana de Ciencia Agrícola, Vol. 47 (1), pp. 27-31.

Vivero, J.L. y Porras C. (2008). “*Los biocombustibles y su impacto en la crisis alimentaria*”. En Cascante, K y Sánchez, A. La Crisis mundial de alimentos: alternativas para la toma de decisiones. (29-51). Fundación Alternativas. Exlibris ediciones, Madrid

Wood, I.P. et al. (2012). “*Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay*”. Biomass and Bioenergy, Vol. 44, pp. 117-121.

Zhang, Y., Dubé, M.A., McLean, D.D., y Kates, M., (2003). “*Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment*”. Bioresource Technology, vol 89, pp. 1-16

### **REFERENCIAS WEB:**

WEB1 (Julio, 2017):

[http://www.uhu.es/08007/documentos%20de%20texto/apuntes/2005/pdf/Tema\\_02\\_carbohidratos.pdf](http://www.uhu.es/08007/documentos%20de%20texto/apuntes/2005/pdf/Tema_02_carbohidratos.pdf)

WEB2 (Julio, 2017): <http://biblio3.url.edu.gt/Publi/Libros/2013/Bioquimica/10-O.pdf>

WEB3 (Julio, 2017): <http://www.um.es/molecula/gluci04.htm>