



Universidad
Politécnica
de Cartagena

Tesis Doctoral

**Producción de bioetanol mediante fermentación
de subproductos cítricos pretratados con *steam
explosion***

Presentada por

MARÍA BOLUDA AGUILAR

Ingeniera Agrónoma y Ms en Técnicas Avanzadas de I+D Agrario y Alimentario
Para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Cartagena

Dirigida por

Dr. ANTONIO LÓPEZ GÓMEZ

Departamento de Ingeniería de Alimentos
y del Equipamiento Agrícola

Cartagena, Abril de 2013



**CONFORMIDAD DE SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN DE DEPÓSITO DE
TESIS DOCTORAL POR EL/LA DIRECTOR/A DE LA TESIS**

D. Antonio López Gómez Director de la Tesis doctoral “Producción de bioetanol mediante fermentación de subproductos cítricos pretratados con *steam explosion*”

INFORMA:

Que la referida Tesis Doctoral, ha sido realizada por D^a María Boluda Aguilar, dando mi conformidad para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado, para ser autorizado su depósito.

La rama de conocimiento por la que esta tesis ha sido desarrollada es:

- Ciencias
- Ciencias Sociales y Jurídicas
- X Ingeniería y Arquitectura

En Cartagena, a 15 de Marzo de 2013

EL DIRECTOR DE LA TESIS

Fdo.:  Antonio López Gómez

COMISIÓN DE DOCTORADO



**CONFORMIDAD DE DEPÓSITO DE TESIS DOCTORAL
POR LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA**

D. Francisco Artés Hernández Presidente de la Comisión Académica del Programa
Técnicas Avanzadas en Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada, “Producción de bioetanol mediante fermentación de subproductos cítricos pretratados con steam explosion” ha sido realizada por D^a María Boluda Aguilar bajo la dirección y supervisión del Dr Antonio López Gómez

En reunión de la Comisión Académica de fecha 22/02/2013, visto que la mencionada tesis doctoral tiene acreditados los indicios de calidad, requeridos para el depósito de tesis doctorales, regulados en el artículo 32 del Reglamento de Estudios Oficiales de Máster y Doctorado de la UPCT, y la autorización del Director de la misma, se acordó dar la conformidad para que a dicha tesis le sea autorizado, por la Comisión de Doctorado, su depósito.

La Rama de conocimiento por la que esta tesis ha sido desarrollada es:

- Ciencias
- Ciencias Sociales y Jurídicas
- Ingeniería y Arquitectura

En Cartagena, a 21 de Marzo de 2013

EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA

[Redacted signature area]

Fdo: Francisco Artés Hernández

COMISIÓN DE DOCTORADO

À mis hermanos, Marta y Antonio

AGRADECIMIENTOS

De entre todas las páginas escritas con mimo de esta tesis, quiero dedicar un pequeño hueco para nombrar a las personas que me han ayudado, enseñado y cuidado durante la realización de este trabajo y mi vida en general.

En primer lugar agradecer a mi director de tesis, Dr. Antonio López Gómez por los años que me ha permitido trabajar con él, porque gracias a él los días son un continuo aprendizaje y porque me ha enseñado algo muy importante, el amor por lo que se hace y se tiene.

A la Fundación Séneca Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia, por la concesión de la “Beca pre-doctoral asociada al desarrollo de proyectos de I+D, innovación y transferencia tecnológica”. Destacar su labor y la ilusión con la que realizan su trabajo, con el fin único de potenciar la investigación, el desarrollo y la innovación de muchos sectores de nuestra Región.

A la empresa Agrumexport, S.A., por permitirme trabajar con ellos y poner en todo momento a mi disposición materias primas e instalaciones para la realización de esta tesis.

Al Departamento de Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola por prestarme los recursos e instalaciones para la realización del trabajo.

A mis compañeros y excompañeros de laboratorio, por vuestro cariño y apoyo incondicional; Fermín, Mariano Otón, Yuly, Juan Pablo Huertas, Ginés Benito, Elisa, Noelia, Natalia Falagán, Natalia López, May, M^a Dolores Esteban, Vera, Sema García Puerta, Fran Caballero, Vicente y Marta Patricia. Me habéis cuidado tanto que no lo merezco. Y en especial, a dos grandes compañeros, amigos y sobretodo grandes personas, Sonia y Sema!! Sin vosotros sí que esto no habría sido posible, os quiero!!

A la Dra. Encarni Aguayo por su amistad, su apoyo y sus siempre sinceras palabras.

A los exdoctorandos y ahora doctores, que hicieron historia en el Departamento de Ingeniería de Alimentos y Equipamiento Agrícola; Alejandro Tomás, Javier Obando, Stephanie Rodríguez, Pedro Antonio Robles y Ana Cecilia Silveira, porque han sido mi referente y porque les debo muchos momentos geniales.

A mis amigos, María José Bernal, Antonio Moreno, Jesús Guirado, Jesús Martínez, Sabrina Sanmartín y Javier Navarro, porque hay pocas personas que me conozcan de verdad y me quieran aún más por lo que soy. Os quiero mucho!

Y por supuesto, a mi FAMILIA (en grande porque así sois), por ser siempre mi apoyo y lo que más quiero en el mundo. En especial, a mi Lola porque es preciosa por dentro y por fuera y porque, con sólo cinco años, nos está enseñando a todos lo bello que es vivir!!

RESUMEN

La producción mundial de zumo de naranja durante la campaña de 2007/2008 en los países productores más importantes fue de unos 2,3 millones de toneladas (65 °Brix), por lo que los residuos industriales de pieles de cítricos en todo el mundo podían estimarse en más de $15 \cdot 10^6$ t. Parte de los subproductos cítricos se han utilizado tradicionalmente en alimentación del ganado, ya sea en estado fresco o como ensilado, o como producto deshidratado, pero normalmente una considerable cantidad de estos subproductos cítricos frescos se pierden como consecuencia de la dificultad de consumir o tratar rápidamente una gran cantidad de estos residuos en un período relativamente corto de tiempo, durante la campaña. De esta manera, una gran cantidad de estos subproductos todavía son vertidos incontroladamente a la naturaleza, causando verdaderos problemas medioambientales. Es así como la eliminación de estos residuos cítricos representa un serio problema para la industria de cítricos de todo el mundo. De hecho, y debido a la concentración territorial de la producción de estos subproductos, es especialmente importante en EEUU (que generó unos 3,2 millones de toneladas de residuos del procesado de cítricos, en la campaña 2005-2006, y principalmente en el Estado de Florida), Brasil (principalmente en la región de Sao Paulo, que genera más del doble de la cantidad de Florida), y los países mediterráneos (con una producción de más de 1,5 millones de toneladas entre España, Italia, Grecia, Egipto, Turquía y Marruecos). En España, la producción media de subproductos cítricos por año es de cerca de 600.000 t, y se tiene una gran concentración en la Región de Murcia, siendo aproximadamente el 30% debido a la producción de zumos de mandarina. El zumo de mandarina se produce principalmente en España y China (con una estimación de producción de zumo de mandarina a nivel mundial de 1,5 millones de toneladas). El limón (*Citrus limón* L.) es la tercera especie cítrica cultivada más importante después de los cítricos naranja y mandarina, con una producción mundial de 4.200.000 toneladas. Los países con la producción de limón más importante dedicada al procesado son Argentina (1.000.000 t), Italia (304.000 t), España (300.000 t), EEUU (230.000 t) y Méjico (296.000 t). El total es de más de 2.130.000 t de limón procesado en todo el mundo (en 2007), de los cuales el 57% (aproximadamente 1.200.000 toneladas) fueron subproductos. La producción de pomelo en todo el mundo supera los 3,8 millones de t, con una producción en EEUU de más de 2,3 millones de t (con un 55% para

industrialización). Los siguientes países más importantes son Argentina, Cuba, Chipre, Israel, Méjico, Mozambique y Sudáfrica. En España, la producción de pomelo es de 50.000 t, de las que el 30% se dedica a la industria para la producción de zumo.

Los subproductos cítricos (CPW, del inglés *Citrus Pulp Waste*) son ricos en pectina y pueden ser utilizados para la fabricación de ácido galacturónico. Pero también son una materia prima potencial para la producción de bioetanol, debido a su alto contenido en carbohidratos, que es similar al de otras materias primas estudiadas para ese fin. Sin embargo, y a pesar de la importancia del volumen de producción de los CPW, no se han llevado a cabo suficientes trabajos de investigación (y que hayan sido publicados) que estudien la posibilidad de su uso en producción de etanol y ácido galacturónico. Sin embargo, hay estudios sobre otros usos: como sustrato de fermentación para la producción de preparados multienzimáticos; para la extracción de pectina, o como fuente de muchos compuestos naturales tales como proteínas celulares, ácido cítrico, vitaminas, flavonoides, carotenoides, minerales, fibra dietética, y aceites esenciales cítricos (CEOs, Citrus Essential Oils).

Por todo lo anterior, en esta tesis se ha estudiado la hidrólisis enzimática de los CPW pretratados con *steam explosion* para la producción de bioetanol, dedicando especial atención a la recuperación de los CEOs, y a la influencia de este tratamiento previo sobre los cambios de composición en los CPW, y sobre el rendimiento en etanol en la fermentación posterior de los hidrolizados.

Se han estudiado los subproductos cítricos de mandarina (*Citrus reticulata* L.) (MCPW), limón (*Citrus limon* L.) (LCPW), pomelo (*Citrus paradisi* L.) (GCPW) y naranja (*Citrus sinensis* L.) (OCPW) para la producción de bioetanol, obteniendo también como co-productos: D-limoneno, ácido galacturónico, y pellets de pulpa de cítricos (CPP). El pretratamiento de *steam explosion* se analizó a nivel de planta piloto para tratar de disminuir las necesidades de enzimas hidrolíticas y para separar y recuperar los aceites esenciales de cítricos (CEOs), principalmente D-limoneno. Se ha estudiado el efecto del pretratamiento de *steam explosion* sobre los subproductos cítricos MCPW, LCPW, GCPW, y OCPW, en su composición lignocelulósica que se analizó mediante análisis termogravimétrico. Se ha estudiado la influencia de los contenidos residuales de CEOs sobre la producción de etanol, al mismo tiempo se ha

determinado la concentración de azúcares (glucosa, fructosa, galactosa, arabinosa, sacarosa, ramnosa y xilosa) y de ácido galacturónico (GA) por cromatografía iónica para medir la eficiencia de la sacarificación y la fermentación (en los procesos de sacarificación y fermentación simultáneas, o proceso SSF, y proceso de sacarificación y fermentación secuencial, o proceso SF), que se obtiene mediante el pretratamiento de *steam explosion*.

Se pueden obtener rendimientos de etanol superiores a 60 L/1000 kg de CPW fresco, sin procesar, mientras que el rendimiento en CPP puede ser regulado por medio del control de la dosis de enzimas y el pretratamiento de *steam explosion*, que puede reducir significativamente las necesidades de enzimas.

Se ha estudiado también la actividad antimicrobiana de los CEOs sobre *S. cerevisiae* y su influencia en la producción de etanol durante la fermentación. Se ha observado una actividad antimicrobiana significativa de los CEOs sobre las levaduras *S. cerevisiae* cuando se presentan concentraciones superiores a 0,025%. El pretratamiento de *steam explosion* ha demostrado tener un efecto interesante sobre el procesado de los subproductos cítricos para la obtención de etanol y ácido galacturónico. Este pretratamiento reduce el contenido residual de los CEOs por debajo de 0,025% y disminuye significativamente las necesidades de enzimas hidrolíticas. También, se ha puesto de manifiesto que en las cortezas de cítricos sometidas a *steam explosion* se pueden encontrar flavonoides, como la hesperidina y la naringina, y que estos flavonoides tienen un gran poder inhibitor de *Saccharomyces cerevisiae* en concentraciones inferiores al 5% (w:v).

SUMMARY

World orange juice production during marketing year 2007/2008 in selected major-producing countries is estimated at 2.3 million metric tons (65 degrees Brix), so the worldwide industrial citrus peel wastes may be estimated in more than $15 \cdot 10^6$ t. Citrus peel wastes are partly used for cattle feed either fresh or after ensilage or dehydration, but considerable quantity of citrus pulp in the fresh state is lost as a result of the difficulty of rapidly disposing a large quantity of the wastes in a fairly short period of time, then a huge amount of it is still discarded to nature, causing several environmental problems. So, the disposal of these citrus wastes poses a serious problem for citrus industries around the world, but due to territorial production concentration, it is especially important in USA (generating 3.2 million metric tons of citrus processing waste in the 2005–2006 growing season, mainly in the State of Florida), Brazil (mainly in the Region of Sao Paulo, generating more than twice the amount of Florida), and Mediterranean countries (with more than 1.5 million metric tons between Spain, Italy, Greece, Egypt, Turkey and Morocco). In Spain, the average production of citrus peel wastes per year is near 600,000 t, being approximately the 30% from mandarin citrus juice squeezing. The citrus juice from mandarin is produced mainly in Spain and China (with an estimate worldwide mandarin citrus juice production of 1.5 million tonnes). Lemon (*Citrus limon* L.) is the third most important cultivated citrus species after orange and mandarin, with a world production of 4,200,000 metric tonnes. The countries with the more important lemon production for processing are Argentine (1,000,000 tonnes), Italy (304,000 tonnes), Spain (300,000 tonnes), USA (230,000 tonnes), and Mexico (296,000 tonnes). The total is over 2.130.000 tonnes of processed lemon around the world in 2007, from which 57% (approximately 1,200,000 tonnes) are peel wastes. Grapefruit worldwide production exceeds 3.8 million tonnes, with the United States leading production with more than 2.3 million tons (45% for fresh consumption). The next most important countries are Argentina, Cuba, Cyprus, Israel, Mexico, Mozambique and South Africa. In Spain, the production of grapefruit is 50.000 metric tonnes, from which the 30% is dedicated to industry for juice production.

CPW is a pectin-rich agro waste and can be utilized for manufacture of galacturonic acid. But also is a potential feedstock for production of bioethanol due to their high carbohydrate content, which is similar to other studied feedstocks. However, and

despite the importance of CPW volume, not enough published research work has studied the possibility of its use in ethanol and galacturonic acid production. Nevertheless, there are studies about other uses: as fermentation substrate for production of multienzyme preparation; for pectin extraction, or as a source of many natural compounds such as single-cell protein, citric acid, vitamins, flavonoids, carotenoids, minerals, dietary fibre, and citrus essential oils (CEOs).

From all above, in this Thesis the enzymatic hydrolysis of CPW pretreated with *steam explosion* for bioethanol production is studied, paying special attention to CEOs recovery by means this pretreatment and its influence on composition changes in the CPW, and ethanol yield by posterior fermentation of hydrolysates.

The mandarin (*Citrus reticulata* L.) citrus peel wastes (MCPW), lemon (*Citrus limon* L.) citrus peel wastes (LCPW), grapefruit (*Citrus paradise* L.) citrus peel wastes (GCPW), and orange (*Citrus sinensis* L) citrus peel wastes (OCPW) were studied for bioethanol production, obtaining also as co-products: D-limonene, galacturonic acid, and citrus pulp pellets (CPP). The *steam explosion* pretreatment was analyzed at pilot plant level to decrease the hydrolytic enzymes requirements and to separate and recover the citrus essential oils, mainly D-limonene. The effect of *steam explosion* on MCPW, LCPW, GCPW, and OCPW, lignocellulosic composition was analyzed by means thermogravimetric analysis. The citrus essential oils contents and their influence on ethanol production have been also studied, while concentration of sugars (glucose, fructose, galactose, arabinose, sucrose, rhamnose and xylose), and galacturonic acid (GA) were analyzed by ionic chromatography to measure the saccharification and fermentation (SF and SSF) processes efficiency, obtained by *steam explosion* pretreatment.

Ethanol yields greater than 60 L/1000 kg raw CPW can be obtained and CPP yields can be regulated by means the control of enzymes dose and the *steam explosion* pretreatment which can significantly reduce the enzymes requirements.

The antimicrobial activity of CEOs on *S. cerevisiae* and its influence on ethanol production during fermentation were also studied. Significant antimicrobial activity of CEOs has been observed on *S. cerevisiae* at concentrations above 0.025%. The *steam*

explosion pretreatment has shown an interesting effect on citrus peel wastes processing for obtaining ethanol and galacturonic acid. This pretreatment reduces the residual content of CEOs below 0.025% and significantly decreases the hydrolytic enzymes requirements. Also, it has been possible to show that the CPW pretreated with *steam explosion* may have flavonoids as hesperidin and naringin, and that these flavonoids are powerful inhibitor of *Saccharomyces cerevisiae* in concentrations lower than 5% (w:v).

| | PÁGINA |
|---|---------------|
| INDICE GENERAL | I |
| INDICE DE FIGURAS | VII |
| INDICE DE TABLAS | XIII |
| INDICE DE FOTOGRAFÍAS | XVII |
| NOMENCLATURA | XIX |
| | |
| PARTE I. ANTECEDENTES | |
| | |
| CAPITULO 1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS | |
| 1.1. JUSTIFICACIÓN | 1 |
| 1.2. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS | 3 |
| | |
| CAPITULO 2. INTRODUCCIÓN | |
| 2.1. INTERÉS DE LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES | 9 |
| 2.1.1. Interés estratégico de la producción de biocarburantes y biocombustibles | 9 |
| 2.1.2. Interés del bioetanol como biocombustible | 11 |
| 2.2. POSIBILIDADES DE APROVECHAMIENTO DE LOS SUBPRODUCTOS CÍTRICOS COMO BIOMASA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOETANOL Y OTROS COPRODUCTOS | 16 |
| 2.2.1. Biomasa lignocelulósica y su interés para la producción de bioetanol | 16 |
| 2.2.2. Aprovechamiento de los subproductos cítricos | 19 |
| 2.3. TÉCNICAS EMERGENTES DE PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE BIOMASA | 23 |
| 2.3.1. Pretratamiento de la biomasa | 23 |
| 2.3.1.1. Tratamientos físicos | 24 |
| 2.3.1.2. Tratamientos físico-químicos | 24 |
| 2.3.1.3. Tratamientos químicos | 26 |

| | |
|--|----|
| 2.3.1.4. Tratamientos biológicos | 27 |
| 2.3.2. Hidrólisis | 28 |
| 2.3.3. La fermentación alcohólica | 29 |
| 2.3.3.1. Hidrólisis y fermentación por separado (proceso SF) | 30 |
| 2.3.3.2. Hidrólisis y fermentación simultanea (proceso SSF) | 30 |

PARTE II. MATERIAL Y MÉTODOS

CAPITULO 3. MATERIAL Y MÉTODOS

| | |
|--|----|
| 3.1. SUBPRODUCTOS UTILIZADOS | 37 |
| 3.2. ANÁLISIS Y DETERMINACIONES | 37 |
| 3.2.1. Análisis de ácido galacturónico (GA) y azúcares | 37 |
| 3.2.2. Análisis del contenido de aceites esenciales | 38 |
| 3.2.3. Determinación del contenido en etanol | 38 |
| 3.2.4. Determinación del contenido en materia seca | 38 |
| 3.2.5. Análisis termogravimétrico | 39 |
| 3.2.6. Determinación de flavonoides | 39 |
| 3.3. PLAN EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO DE LA EFICIENCIA DE LOS PRETRATAMIENTOS Y LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA DE PIELES DE CÍTRICOS. | 41 |
| 3.3.1. Pretratamiento de <i>steam explosion</i> de las pieles de cítricos (CPW) | 41 |
| 3.3.2. Hidrólisis enzimática y fermentación | 43 |
| 3.3.3. Efecto del pretratamiento de <i>steam explosion</i> sobre las pieles de cítricos. Análisis de imágenes de microscopia electrónica de barrido | 49 |
| 3.4. DETERMINACIÓN DE LA CMI DE COMPUESTOS INHIBIDORES DE LA FERMENTACIÓN | 49 |
| 3.5. CARACTERIZACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE NARANJA, LIMÓN, POMELO Y MANDARINA | 50 |
| 3.6. ANÁLISIS DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LAS LEVADURAS DURANTE LA FERMENTACIÓN | 53 |
| 3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 53 |

PARTE III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**CAPITULO 4. OBTENCIÓN DE BIOETANOL Y COPRODUCTOS DE LAS CORTEZAS Y PULPAS DE MANDARINA**

| | |
|--|----|
| 4.1. INTRODUCCIÓN | 59 |
| 4.2. INFLUENCIA DEL PRETRATAMIENTO DE <i>STEAM EXPLOSION</i> SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LAS CORTEZAS DE MANDARINA | 59 |
| 4.3. INFLUENCIA DEL PRETRATAMIENTO DE <i>STEAM EXPLOSION</i> SOBRE LA PRODUCCIÓN DE AZÚCARES EN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE CORTEZAS DE MANDARINA | 66 |
| 4.4. INFLUENCIA DEL PRETRATAMIENTO DE <i>STEAM EXPLOSION</i> SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL Y OTROS CO-PRODUCTOS DE CORTEZAS DE MANDARINA | 70 |
| 4.5. PRODUCCIÓN DE BIOETANOL CON CORTEZAS Y PULPAS DE MANDARINA A ESCALA PILOTO EN BIOREACTOR | 74 |
| 4.6. INFLUENCIA DEL CONTENIDO EN ACEITES ESENCIALES DE LAS CORTEZA DE MANDARINA EN LA PRODUCCIÓN DE AZÚCARES Y ETANOL | 75 |
| 4.7. CONCLUSIONES | 77 |

CAPITULO 5. OBTENCIÓN DE BIOETANOL Y COPRODUCTOS DE LAS CORTEZAS Y PULPAS DE LIMÓN

| | |
|--|----|
| 5.1. INTRODUCCIÓN | 81 |
| 5.2. INFLUENCIA DEL PRETRATAMIENTO DE <i>STEAM EXPLOSION</i> SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LAS CORTEZAS DE LIMÓN | 81 |
| 5.3. INFLUENCIA DEL PRETRATAMIENTO DE <i>STEAM EXPLOSION</i> SOBRE LA PRODUCCIÓN DE AZÚCARES EN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE CORTEZAS DE LIMÓN | 86 |
| 5.4. INFLUENCIA DEL PRETRATAMIENTO DE <i>STEAM EXPLOSION</i> SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL Y OTROS CO-PRODUCTOS DE CORTEZAS DE LIMÓN | 90 |

| | |
|--|-----|
| 5.5. PRODUCCIÓN DE BIOETANOL CON CORTEZAS Y PULPAS DE LIMÓN A ESCALA PILOTO EN BIOREACTOR | 94 |
| 5.6. INFLUENCIA DEL CONTENIDO EN ACEITES ESENCIALES DE LAS CORTEZAS DE LIMÓN EN LA PRODUCCIÓN DE AZÚCARES Y ETANOL | 95 |
| 5.7. CONCLUSIONES | 96 |
| CAPITULO 6. OBTENCIÓN DE BIOETANOL Y COPRODUCTOS DE LAS CORTEZAS Y PULPAS DE POMELO | |
| 6.1. INTRODUCCIÓN | 101 |
| 6.2. INFLUENCIA DEL PRETRATAMIENTO DE <i>STEAM EXPLOSION</i> SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LAS CORTEZAS DE POMELO | 101 |
| 6.3. INFLUENCIA DEL PRETRATAMIENTO DE <i>STEAM EXPLOSION</i> SOBRE LA PRODUCCIÓN DE AZÚCARES EN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE CORTEZAS DE POMELO | 106 |
| 6.4. INFLUENCIA DEL PRETRATAMIENTO DE <i>STEAM EXPLOSION</i> SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL Y OTROS CO-PRODUCTOS DE CORTEZAS DE POMELO | 110 |
| 6.5. PRODUCCIÓN DE BIOETANOL CON CORTEZAS Y PULPAS DE POMELO A ESCALA PILOTO EN BIOREACTOR | 114 |
| 6.6. INFLUENCIA DEL CONTENIDO EN ACEITES ESENCIALES DE LAS CORTEZAS DE POMELO EN LA PRODUCCIÓN DE AZÚCARES Y ETANOL | 116 |
| 6.7. CONCLUSIONES | 117 |
| CAPITULO 7. OBTENCIÓN DE BIOETANOL Y COPRODUCTOS DE LAS CORTEZAS Y PULPAS DE NARANJA | |
| 7.1. INTRODUCCIÓN | 121 |
| 7.2. INFLUENCIA DEL PRETRATAMIENTO DE <i>STEAM EXPLOSION</i> SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LAS CORTEZAS DE NARANJA | 122 |
| 7.3. INFLUENCIA DEL PRETRATAMIENTO DE <i>STEAM EXPLOSION</i> SOBRE LA PRODUCCIÓN DE AZÚCARES EN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE CORTEZAS DE NARANJA | 127 |

| | |
|---|-----|
| 7.4. INFLUENCIA DEL PRETRATAMIENTO DE <i>STEAM EXPLOSION</i> SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL Y OTROS CO-PRODUCTOS DE CORTEZAS DE NARANJA | 132 |
| 7.5. PRODUCCIÓN DE BIOETANOL CON CORTEZAS Y PULPAS DE NARANJA A ESCALA PILOTO EN BIOREACTOR | 137 |
| 7.6. INFLUENCIA DEL CONTENIDO EN ACEITES ESENCIALES DE LAS CORTEZAS DE NARANJA EN LA PRODUCCIÓN DE AZÚCARES Y ETANOL | 139 |
| 7.7. CONCLUSIONES | 140 |
| CAPITULO 8. CARÁCTER ANTIMICROBIANO DE LOS ACEITES ESENCIALES Y FLAVONOIDES DE SUBPRODUCTOS CÍTRICOS. INHIBICIÓN DE LA FERMENTACIÓN | |
| 8.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES DE CÍTRICOS Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA | 143 |
| 8.2. PRESENCIA DE FLAVONOIDES EN LAS CORTEZAS DE CÍTRICOS | 152 |
| 8.3. CONCLUSIONES | 157 |
| CAPITULO 9. ANÁLISIS COMPARATIVO DEL RENDIMIENTO EN BIOETANOL Y COPRODUCTOS PARA LOS DISTINTOS SUBPRODUCTOS CÍTRICOS | |
| 9.1. COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA DE LAS CORTEZAS DE CÍTRICOS FRESCAS Y PRETRATADAS CON <i>STEAM EXPLOSION</i> Y SU INFLUENCIA SOBRE EL RENDIMIENTO EN AZÚCARES TRAS LA HIDRÓLISIS | 161 |
| 9.2. EFICIENCIA EN LA PRODUCCIÓN DE ETANOL A PARTIR DE CORTEZAS DE CÍTRICOS SEGÚN DISTINTAS CONDICIONES DE PROCESO | 166 |
| 9.3. RECUPERACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES DE CÍTRICOS MEDIANTE EL PRETRATAMIENTO DE <i>STEAM EXPLOSION</i> Y SU CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA FRENTE AL CRECIMIENTO DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>. | 170 |
| 9.4. CONCLUSIONES | 173 |

PARTE IV. CONCLUSIONES GENERALES Y BIBLIOGRAFIA

CAPITULO 10. CONCLUSIONES 179

CAPITULO 11. BIBLIOGRAFÍA 185

Índice de Figuras

- Figura 4.1.** Curvas TG-DTG de muestras de cortezas frescas de mandarina, de cortezas pretratadas mediante *steam explosion* y del CPP obtenido tras la fermentación..... 64
- Figura 4.2.** Etanol y co-productos obtenidos tras el procesado SF de mandarina pretratada (con diluciones de CPW:agua de 1:4 v/v) usando diferentes concentraciones enzimáticas de Pectinex, Celluclast y Novozyme.....73
- Figura 4.3.** Producción de ácido galacturónico (kg/ 1000 kg CPW mandarina) obtenida después de la hidrólisis enzimática, con distintas concentraciones enzimáticas, y usando pieles de mandarina pretratada mediante *steam explosion* (con diluciones CPW:agua de 1:4 v/v)..... 73
- Figura 4.4.** Curvas de producción de etanol (en L/1000 kg CPW mandarina) obtenidas tras el procesado SF de pieles de mandarina pretratada (con diluciones CPW: agua de 2:1 v/v), usando distintas dosis enzimáticas, en botellas de vidrio de 250 mL.....74
- Figura 4.5.** Curvas de producción de etanol (en L/1000 kg CPW mandarina) obtenidas tras el procesado SSF de pieles de mandarina pretratada (con diluciones CPW: agua de 2:1 v/v), en bioreactores de 5L y botellas de 250 mL..... 75
- Figura 4.6.** Influencia del contenido en aceites esenciales en la fermentación de pieles de mandarina no pretratada con *steam explosion* sobre la producción de etanol (L/1000 kg CPW mandarina), y usando un proceso SF.....77
- Figura 5.1.** Curvas TG-DTG de muestras de cortezas frescas de limón, de cortezas pretratadas mediante *steam explosion*, y del CPP obtenido tras la fermentación.....83

| | |
|--|-----|
| Figura 5.2. Producción de azúcares después de 24 horas de hidrólisis enzimática, en cortezas frescas de limón (con dosis REC) y cortezas pretratadas con <i>steam explosion</i> (con dilución de CPW: agua de 1:4 v/v, y usando proceso SF y las dosis enzimáticas de la Tabla 3.2)..... | 87 |
| Figura 5.3. Etanol y co-productos obtenidos tras el procesado SF de cortezas de limón pretratadas con <i>steam explosion</i> (con diluciones de CPW:agua de 1:4 v/v, y usando diferentes dosis enzimáticas de Pectinex, Celluclast y Novozyme, en botellas de vidrio de 250 mL)..... | 92 |
| Figuras 5.4. Producción de ácido galacturónico (kg/ 1000 kg CPW limón) después de la hidrólisis enzimática con distintas dosis enzimáticas de las pieles de limón pretratadas con <i>steam explosion</i> (con diluciones CPW:agua de 1:4 v/v, con dosis enzimáticas, y botellas de vidrio de 250 mL)..... | 93 |
| Figura 5.5. Curvas de producción de etanol (en L/1000 kg CPW limón) obtenidas tras el procesado SF de pieles de limón pretratadas (con diluciones CPW: agua de 2:1 v/v), usando distintas dosis enzimáticas, en botellas de vidrio de 250 mL..... | 94 |
| Figura 5.6. Curvas de producción de etanol (en L/1000 kg CPW limón) obtenidas tras el procesado SSF de pieles de limón pretratadas con <i>steam explosion</i> (con diluciones CPW: agua de 2:1 v/v), usando distintas dosis enzimáticas, en bioreactores de 5L..... | 95 |
| Figura 5.7. Influencia del contenido en aceites esenciales de pieles de limón no pretratadas con <i>steam explosion</i> sobre la producción de etanol (L/1000 kg CPW limón) con procesado SF..... | 96 |
| Figura 6.1. Curvas TG-DTG de cortezas frescas de pomelo y pretratadas con <i>steam explosion</i> y CPP obtenido tras la hidrólisis enzimática y fermentación..... | 103 |

Figura 6.2. Producción de azúcares después de 24 horas de hidrólisis enzimática de cortezas frescas de pomelo (dosis REC) y de cortezas pretratadas con *steam explosion* (con dilución CPW: agua de 1:4 v/v), y usando proceso SF y las dosis enzimáticas de la Tabla 3.2.....110

Figura 6.3. Etanol y co-productos obtenidos tras el procesado SF de pieles de pomelo pretratadas con *steam explosion* (con diluciones de CPW:agua de 1:4 v/v, y usando diferentes concentraciones enzimáticas de Pectinex, Celluclast y Novozyme).....112

Figura 6.4. Producción de ácido galacturónico (kg/ 1000 kg CPW pomelo) tras la hidrólisis enzimática, con distintas concentraciones enzimáticas, de las pieles de pomelo pretratadas con *steam explosion* (con diluciones CPW:agua de 1:4 v/v)..... 113

Figura 6.5. Curvas de producción de etanol (en L/1000 kg CPW pomelo) obtenidas con el procesado SF de pieles de pomelo pretratadas con *steam explosion* (con diluciones CPW: agua de 2:1 v/v), usando distintas dosis enzimáticas, en botellas de vidrio de 250 mL.....113

Figura 6.6. Curvas de producción de etanol (en L/1000 kg CPW limón) obtenidas tras el procesado SSF de pieles de pomelo pretratadas con *steam explosion* (con diluciones CPW: agua de 2:1 v/v), usando distintas dosis enzimáticas, en bioreactores de 5L.....115

Figura 6.7. Influencia del contenido en aceites esenciales de pieles de pomelo no pretratado con *steam explosion* sobre la producción de etanol (L/1000 kg CPW pomelo) tras un proceso SF..... 117

Figura 7.1. Curvas TG-DTG de cortezas frescas de naranja y pretratadas mediante *steam explosion* y CPP obtenido tras la hidrólisis enzimática y fermentación..... 125

| | |
|---|-----|
| Figura 7.2. Producción de azúcares después de 24 horas de hidrólisis enzimática de cortezas frescas de naranja (con dosis REC), y de cortezas pretratadas con <i>steam explosion</i> (con dilución CPW: agua de 1:4 v/v), y usando proceso SF y las dosis enzimáticas de la Tabla 3.2..... | 129 |
| Figura 7.3. Etanol y co-productos obtenidos tras el procesado SF de pieles de naranja pretratadas con <i>steam explosion</i> (con diluciones de CPW: agua de 1:4 v/v) usando diferentes dosis enzimáticas de Pectinex, Celluclast y Novozyme..... | 136 |
| Figura 7.4. Producción de ácido galacturónico (kg/ 1000 kg CPW naranja) después de la hidrólisis enzimática, con distintas dosis enzimáticas, de las pieles de naranja pretratadas con <i>steam explosion</i> (con diluciones CPW: agua de 1:4 v/v)..... | 136 |
| Figura 7.5. Curvas de producción de etanol (en L/1000 kg CPW naranja) obtenidas tras el procesado SF de pieles de naranja pretratadas con <i>steam explosion</i> (con diluciones CPW: agua de 2:1 v/v), usando distintas concentraciones enzimáticas, en botellas de vidrio de 250 mL..... | 137 |
| Figura 7.6. Curvas de producción de etanol (en L/1000 kg CPW naranja) obtenidas tras el procesado SSF de pieles de naranja pretratada (con diluciones CPW: agua de 2:1 v/v), usando distintas concentraciones enzimáticas, en bioreactores de 5L..... | 138 |
| Figura 7.7. Influencia del contenido en aceites esenciales de pieles de naranja no pretratadas con <i>steam explosion</i> sobre la producción de etanol (L/1000 kg CPW naranja), con proceso SF..... | 140 |
| Figura 8.1. Evolución de la absorbancia con el tiempo del caldo de cultivo Sabouraud inoculado con <i>S. cerevisiae</i> en presencia de aceite esencial de limón en distintas concentraciones..... | 144 |
| Figura 8.2. Composición de los aceites esenciales de cítricos extraídos mediante <i>steam explosion</i> | 151 |

| | |
|---|-----|
| Figura 8.3. Curvas de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> en caldo Sabouraud en presencia de rutina en distintas concentraciones, modelizadas según Baranyi..... | 155 |
| Figura 8.4. Curvas de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> en caldo Sabouraud en presencia de neohesperidina en distintas concentraciones, modelizadas según Baranyi..... | 155 |
| Figura 8.5. Curvas de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> en caldo Sabouraud en presencia de hesperidina en distintas concentraciones modelizadas según Baranyi..... | 156 |
| Figura 8.6. Curvas de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> en caldo Sabouraud en presencia de naringina en distintas concentraciones modelizadas según Baranyi..... | 157 |
| Figura 9.1. Influencia del contenido en lignina de las cortezas de cítricos sobre el rendimiento en azúcares tras 24 horas de hidrólisis enzimática con dosis REC..... | 164 |
| Figura 9.2. Producción de azúcares fermentables (g / 100 g piel seca) tras 24 horas de hidrólisis enzimática de cortezas de cítricos sometidas o no al pretratamiento de <i>steam explosion</i> | 165 |
| Figura 9.3. Producción de azúcares totales (g / 100 g piel seca) tras 24 horas de hidrólisis enzimática de cortezas de cítricos sometidas o no al pretratamiento de <i>steam explosion</i> | 166 |
| Figura 9.4. Producción de etanol (L/ 1000 kg CPW) tras el procesado SF y SSF de cítricos pretratados con <i>steam explosion</i> (con diluciones 1:4 v/v) y con reducciones enzimáticas de más del 70% de la dosis REC..... | 167 |
| Figura 9.5. Producción de etanol (L/ 1000 kg CPW) tras el procesado SF y SSF de cítricos pretratados con <i>steam explosion</i> (con diluciones 2:1 v/v) y con dosis enzimática inferiores a la dosis de referencia..... | 169 |
| Figura 9.6. Rendimiento en aceites esenciales de cítricos (L/ 1000 kg corteza) tras el tratamiento de <i>steam explosion</i> | 171 |

Índice de Tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 2.1. Rendimientos (L/t) en la obtención de bioetanol a partir de distintos cultivos (Balat et al., 2008)..... | 13 |
| Tabla 2.2. Programas para el uso de etanol en combustibles (Sánchez y Cardona, 2008)..... | 16 |
| Tabla 2.3. Composición química de diferentes materiales lignocelulósicos..... | 22 |
| Tabla 3.1. Gradiente de solventes de análisis en HPLC para la determinación de flavonoides..... | 40 |
| Tabla 3.2. Dosis enzimáticas (mg proteína/ g piel seca) utilizadas en la hidrólisis, en botellas de 250 mL, de pieles de cítricos pretratadas..... | 45 |
| Tabla 3.3. Dosis enzimáticas (mg proteína/ g piel seca) utilizadas en la hidrólisis, en botellas de 250 mL, de pieles de cítricos pretratadas..... | 46 |
| Tabla 4.1. Composición química de las cortezas frescas de mandarina, tras el pretratamiento de <i>steam explosion</i> y tras la hidrólisis y fermentación simultáneas (CPP)..... | 65 |
| Tabla 4.2. Producción de azúcares después de 24 horas de hidrólisis enzimática (dosis enzimática REC) de cortezas frescas de mandarina sin pretratamiento de <i>steam explosion</i> , usando proceso SF y distintas diluciones CPW: agua, en botellas de vidrio de 250 mL..... | 68 |
| Tabla 4.3. Producción de azúcares tras 24 horas de hidrólisis enzimática de cortezas de mandarina pre-tratadas por <i>steam explosion</i> (CPW: agua, 1:4 v/v)..... | 69 |
| Tabla 4.4. Producción de etanol (L etanol /1000 kg CPW de mandarina) utilizando los procesos SF y SSF con mandarina pretratada (con diluciones de 1:4 v/v) usando diferentes dosis enzimáticas, en botellas de vidrio de 250 mL..... | 72 |

| | |
|---|-----|
| Tabla 5.1. Composición de las cortezas de limones frescos, de cortezas de limón pretratadas con <i>steam explosion</i> , del residuo CPP obtenido tras la fermentación..... | 85 |
| Tabla 5.2. Producción de azúcares después de 24 horas de hidrólisis enzimática (con dosis enzimática REC) de cortezas frescas de limón sin pretratamiento de <i>steam explosion</i> , y usando el proceso SF y distintas diluciones CPW:agua, en botellas de vidrio de 250 mL..... | 88 |
| Tabla 5.3. Producción de azúcares tras 24 horas de hidrólisis enzimática de cortezas de limón pre-tratadas por <i>steam explosion</i> (CPW: agua, 1:4 v/v)..... | 89 |
| Tabla 5.4. Producción de etanol (L etanol /1000 kg CPW de limón) tras el procesado SF y SSF de cortezas de limón pretratadas con <i>steam explosion</i> (con diluciones de CPW:agua de 1:4 v/v; y usando diferentes dosis enzimáticas, en botellas de vidrio de 250 mL)..... | 92 |
| Tabla 6.1. Composición química de las cortezas de pomelos frescos, tras el pretratamiento de <i>steam explosion</i> y tras la fermentación (CPP)..... | 105 |
| Tabla 6.2. Producción de azúcares después de 24 horas de hidrólisis enzimática (dosis enzimática REC) de cortezas de pomelo sin pretratamiento de <i>steam explosion</i> , usando SF y distintas diluciones CPW:agua, en botellas de vidrio de 250 mL..... | 108 |
| Tabla 6.3. Producción de azúcares tras 24 horas de hidrólisis enzimática de cortezas de pomelo pre-tratadas por <i>steam explosion</i> (CPW: agua, 1:4 v/v)..... | 109 |
| Tabla 6.4. Producción de etanol (L etanol /1000 kg CPW de pomelo) tras el procesado SF y SSF de pomelo pretratado con <i>steam explosion</i> (con diluciones de CPW:agua de 1:4 v/v) usando diferentes dosis enzimáticas, en botellas de vidrio de 250 mL..... | 111 |
| Tabla 7.1. Composición química de las cortezas frescas de naranja, tras el pretratamiento de <i>steam explosion</i> y tras la fermentación (CPP)..... | 126 |

| | |
|---|-----|
| Tabla 7.2. Producción de azúcares después de 24 horas de hidrólisis enzimática (dosis enzimática REC) de cortezas de naranja sin pretratamiento de <i>steam explosion</i> , usando SF y distintas diluciones CPW:agua, en botellas de vidrio de 250 mL..... | 130 |
| Tabla 7.3. Producción de azúcares tras 24 horas de hidrólisis enzimática de cortezas de naranja pre-tratadas con <i>steam explosion</i> (CPW: agua, 1:4 v/v)..... | 131 |
| Tabla 7.4. Producción de etanol (L etanol /1000 kg CPW de naranja) tras el procesado SF y SSF de pieles de naranja pretratadas con <i>steam explosion</i> (con diluciones de CPW: agua de 1:4 v/v) usando diferentes dosis enzimáticas, en botellas de vidrio de 250 mL..... | 133 |
| Tabla 8.1. Composición de los aceites esenciales de limón extraídos mediante <i>steam explosion</i> | 147 |
| Tabla 8.2. Composición de los aceites esenciales de pomelo extraídos mediante <i>steam explosion</i> | 148 |
| Tabla 8.3. Composición de los aceites esenciales de naranja extraídos mediante <i>steam explosion</i> | 149 |
| Tabla 8.4. Composición de los aceites esenciales de mandarina extraídos mediante el <i>steam explosion</i> | 150 |
| Tabla 8.5. Parámetros de la cinética de evaporación de aceites esenciales comerciales (Sigma-Aldrich) y de los aceites extraídos mediante <i>steam explosion</i> | 152 |
| Tabla 8.6. Principales flavonoides presentes en cortezas de cítricos pretratadas mediante <i>steam explosion</i> | 154 |
| Tabla 9.1. Composición química de las cortezas de cítricos, frescas y tras el pretratamiento de <i>steam explosion</i> | 163 |
| Tabla 9.2. Producción de ácido galaturónico y citrus pulp pellets (CPP) (kg/ 1000 kg CPW) tras el procesado SF y SSF, con diluciones de 1:4 (v:v)..... | 170 |

Tabla 9.3. Producción de ácido galaturónico y citrus pulp pellets (CPP) (kg/ 1000 kg CPW) tras el procesado SF y SSF, con diluciones de 2:1 (v:v)..... 170

Tabla 9.4. Concentración mínima inhibitoria de los distintos aceites esenciales de cítricos en fermentación alcohólica de pieles de cítricos sometidas a proceso SF.....172

Índice de Fotos

| | |
|---|-----|
| Foto 3.1. Pielas y pulpas de naranja recogidas de la industria de zumos..... | 37 |
| Foto 3.2. Trituradora de pieles de cítricos..... | 41 |
| Foto 3.3. Reactor de cuerpo cilíndrico horizontal de superficie rascada de 12 L de capacidad..... | 42 |
| Foto 3.4. Equipo completo para la realización de <i>steam explosion</i> compuesto por reactor, bomba de aceite, sistema de refrigeración y sistema de control de presión y temperatura..... | 42 |
| Foto 3.5. Bioreactor de 5L provisto de sistema de control Bio Controller ADI 1030..... | 44 |
| Foto 3.6. Mosto de mandarina tras el proceso de hidrólisis y fermentación (SF)..... | 47 |
| Foto 4.1. Imágenes SEM de cortezas frescas de mandarina sin pretratamiento de <i>steam explosion</i> . Paredes celulares y glándulas oleíferas intactas..... | 61 |
| Foto 4.2. Imágenes SEM de cortezas de mandarina pretratadas con <i>steam explosion</i> . Ruptura de las paredes celulares y glándulas oleíferas (imágenes A y B) y aparición de fibras de celulosa (imagen C)..... | 62 |
| Foto 5.1. Imágenes SEM de cortezas de limón pretratadas con <i>steam explosion</i> . Se aprecia la ruptura de las paredes celulares y de las glándulas oleíferas (imagen A), y la separación de las fibras de celulosa (imagen B)..... | 82 |
| Foto 6.1. Imágenes SEM de cortezas de pomelo fresco sin pretratamiento de <i>steam explosion</i> . Se aprecian las paredes celulares y la glándula oleífera intactas..... | 102 |
| Foto 6.2. Imágenes SEM de cortezas de pomelo pretratadas con <i>steam explosion</i> . Se ve la ruptura de las paredes celulares y la aparición de fibras separadas de celulosa..... | 102 |

Foto 7.1. Imagen SEM de la corteza fresca de naranja sin pretratamiento de *steam explosion*. Se aprecian las paredes celulares y la glándula oleífera intactas.....123

Foto 7.2. Imágenes SEM de cortezas de naranja pretratadas con *steam explosion*. Se aprecian tanto la ruptura de las paredes celulares (A y B), como la separación de las fibras de celulosa..... 124

Abreviaturas:

ARA: Arabinosa

CBH: Celobiohidrolasa

CEOs: Citrus essential oils (Aceites esenciales de cítricos)

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CPP: Citrus Pulp Pellets

DDGS: Dried distiller grains with solubles

DFO: Dimethylformamide

DMSO: Dimethylsulphoxide

DSC: Differential Scanning Calorimetry (Calorimetría diferencial de barrido)

DTG: Derivative Thermogravimetry Analysis (Curva derivada del análisis termogravimétrico)

Ea: Energía de activación

EG: endo- β -1,4- glucanasa

EOs: Essential oils (Aceites esenciales)

ETBE: Ethyl tert-butyl ether

FPU: Filter paper units

FRUC: Fructosa

FS: Fermentable sugars (Azúcares fermentables)

GA: Galacturonic acid (ácido galacturónico)

GAL: Galactosa

GC-MS: Gases Chromatography- MassSpectrometry (Cromatografía de gases y Espectrofotometría de masas)

- GCPW:** Grapefruit citrus peel wastes (Residuos de cortezas de pomelo)
- GLU:** Glucosa
- HMF:** Hydroxymethylfurfural
- HPLC:** High performance liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta resolución)
- LCPW:** Lemon citrus peel wastes (Residuos de cortezas de limón)
- MCPW:** Mandarin citrus peel wastes (Residuos de cortezas de mandarina)
- MTBE:** Metil tert-butil éter
- NIST:** National Institut of Standars and Technology (Instituto nacional de Standars y Tecnología).
- OCPW:** Orange citrus peel wastes (Residuos de cortezas de naranja)
- Pf:** Peso fresco
- RAM:** Ramnosa
- RC:** Dosis de referencia de celulasa (Celluclast)
- REC:** Recommended enzymatic concentration (Dosis enzimática recomendada)
- RN:** Dosis de referencia de β -glucosidasa (Novozym 188)
- RSU:** Residuos sólidos urbanos
- SEM:** Scanning Electron Microspe (Microscopía electrónica de barrido)
- SSF:** Simultaneous Saccharification and Fermentation
- SUCR:** Sacarosa
- TGA:** Termogravimetric analysis (Análisis termogravimétrico)
- TS:** Total sugars (Azúcares totales)
- UFC:** Unidades formadoras de colonias
- UI:** Unidades internacionales
- XYL:** Xilosa

PARTE I

ANTECEDENTES

CAPÍTULO 1

Justificación y Objetivos

1.1. JUSTIFICACIÓN.

En la actualidad, se tiene un gran interés medioambiental y estratégico en aumentar la producción de biocarburantes en general, y de bioetanol en particular, para ser añadido a los combustibles convencionales y reducir tanto el impacto ambiental de éstos como la dependencia de la importación de petróleo de otros países.

Actualmente, se obtiene bioetanol sobretudo de caña de azúcar y cereales (principalmente trigo, cebada y maíz). Pero, según diversas investigaciones, también se puede obtener bioetanol de los subproductos de la extracción de zumos cítricos (cortezas, pulpa, semillas) (Stewart et al., 2006; Grohmann et al., 1994a,b, 1995a,b; Wilkins et al., 2005, 2007a,b; López-Gómez, 2007, 2008; González et al., 2008; Kleijn et al., 2009) que, todavía en nuestros días, constituyen un verdadero problema medioambiental. El principal destino de estos subproductos es la alimentación animal, pero en muchas ocasiones, los ganaderos no lo utilizan al ritmo que aquellos se producen en las fábricas de zumos y conservas, por lo que resulta difícil su eliminación. Hasta hace pocos años, se ha hecho cierto aprovechamiento de estas pieles de cítricos para la obtención de pectinas y otros compuestos (Braddock, 1999), pero los costes excesivos y la competitividad de los mercados internacionales han provocado el cierre de gran parte de las instalaciones industriales españolas, y más concretamente, las ubicadas en la Región de Murcia. En algunos casos, como ocurre en España y en otros países, estos subproductos cítricos se secan en instalaciones industriales específicas y se venden en forma de pellets o gránulos a las industrias de fabricación de piensos para el ganado (es un producto conocido como CPP, *Citrus Pulp Pellets*). En este caso, la realización del secado de estos subproductos implica un gran consumo de energía, y, a veces, los precios de estos CPP no son lo suficientemente altos como para cubrir estos cuantiosos gastos energéticos (Braddock, 1999; Zhou et al., 2007, 2008).

De todo lo anterior, se deduce el interés de seguir investigando en la optimización de la valorización, como fuente renovable de energía, de la biomasa que constituyen los subproductos de la producción de zumos cítricos (Grohman et al., 2013; Choi et al., 2013).

En esta Tesis Doctoral se estudian las posibilidades de optimización, a nivel de laboratorio y planta piloto, del proceso de obtención de bioetanol a partir de los carbohidratos simples y complejos contenidos en los subproductos cítricos (cortezas, pulpas y semillas), para su uso como biocarburante. Así, se resolvería el problema medioambiental que supone el vertido incontrolado (Laufenberg et al., 2003; Tripodo et al., 2004) de los subproductos de la extracción de zumos cítricos. Mediante este proceso se obtendría bioetanol y, al mismo tiempo, otros co-productos (Bergeron et al., 2012) como el ácido galacturónico, el limoneno (aceite esencial que constituye más del 90% de los aceites esenciales presentes en las pieles de los frutos cítricos), otros aceites esenciales y el residuo seco final (equivalente al residuo denominado DDGS, del inglés *dried distiller grains with solubles*, que se obtiene del proceso de fermentación y destilación de granos de cereales para obtener bioetanol) que puede tener un gran valor nutritivo, y podría utilizarse también (como el DDGS) como ingrediente para la formulación de piensos para ganado (Tripodo et al., 2004; Burnes et al., 2005; Bampidis y Robinson, 2006).

Según datos de la Asociación AILIMPO (<http://www.ailimpo.com>), en las campañas de 2003/04 a 2005/06, en España se dedicaron a zumo un promedio de 496.908 t de naranjas (con el 80% industrializado en la Región de Murcia), 264.348 t de mandarinas (con el 70% industrializado en la Región de Murcia), y 178.601 t de limones (el 85% en la Región de Murcia). También, según AILIMPO, en las tres últimas campañas la producción de cítricos a nivel nacional ha pasado a ser del orden de 2 millones de toneladas de mandarinas, 3 millones de toneladas de naranjas, unas 900.000 toneladas de limones y unas 50.000 toneladas de pomelos. Esto quiere decir que, en 2011, las cifras de cítricos dedicados a zumos casi se han duplicado respecto de las que antes se daban (para 2005/2006), destinándose a zumos del orden de 1,2 millones de toneladas entre naranjas y mandarinas, y del orden de 300.000 t de limones. Si se tiene que, del total del peso del fruto cítrico, un 55% se corresponde con la corteza y la pulpa, se estima una producción media anual de subproductos cítricos en la Región de Murcia de más de 600.000 t. Si se consigue un rendimiento en la obtención de etanol de 0,05 L de etanol por kg de subproducto cítrico, se podrían obtener más de 30.000.000 L de etanol al año de esta biomasa procedente de la Región de Murcia. Estos rendimientos se han deducido de la Patente US 2006 / 0177916 A1 (Stewart et al.,

2006), que presenta un proceso de obtención de etanol a partir de estos subproductos cítricos, y que se basan en experimentos realizados con naranjas Navel americanas.

En España se tiene una proporción relativamente elevada de naranjas y mandarinas de mesa que se dedican también a la producción de zumos cítricos, y presentan un contenido en azúcares elevado, por lo que el citado rendimiento en etanol podría ser mejorado, pudiendo llegar quizá a obtener hasta los 7 L de etanol por cada 100 kg de cortezas y pulpas.

Así pues, en esta Tesis se ha intentado mejorar el proceso de obtención de bioetanol a partir de los subproductos cítricos, mediante el estudio de los factores que determinan la inhibición de la fermentación alcohólica de sus hidrolizados, sobre todo el contenido residual de aceites esenciales de cítricos, y de flavonoides, ambos muy presentes en estos subproductos y con conocida actividad antimicrobiana; y estudiando en planta piloto el interés de la aplicación de la *steam explosion* como pretratamiento de los subproductos cítricos, para mejora de la hidrólisis de los mismos, y la separación de los aceites esenciales (Grohmann et al., 1995a,b; Wilkins et al., 2007a,b,c), aplicando la tecnología desarrollada a los subproductos cítricos de nuestro país (incluyendo naranjas, mandarinas, limones y pomelos),

1.2. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

El objetivo principal de las investigaciones llevadas a cabo en esta Tesis es resolver el problema de aprovechamiento eficiente de los subproductos de la extracción de zumos cítricos, como son las pulpas, las cortezas y las semillas correspondientes de los frutos cítricos naranja, mandarina, limón y pomelo, obteniendo bioetanol en el proceso, y al mismo tiempo, otros co-productos como los aceites esenciales, el ácido galacturónico y los CPP, como alimento para el ganado, no teniendo finalmente ningún residuo que suponga un problema medioambiental.

El objetivo técnico general de estas investigaciones es el estudio de los factores que determinan el rendimiento y la cinética del proceso de obtención de bioetanol a partir de los hidrolizados de estos subproductos cítricos: cortezas, pulpas y semillas. De

esta forma se pretende mejorar el proceso con el fin de que resulte más productivo y rentable económicamente.

Así, se plantean los siguientes objetivos técnicos específicos:

- ✓ Optimizar la hidrólisis de esta biomasa mediante la aplicación del pretratamiento *steam explosion*, analizando su influencia sobre la accesibilidad de las enzimas a los carbohidratos complejos presentes en la corteza de cítricos, para tratar de reducir la cantidad necesaria de enzimas hidrolíticos, y obtener finalmente el máximo rendimiento en azúcares fermentables y etanol.
- ✓ Estudiar la influencia de los procesos de sacarificación (hidrólisis enzimática) y fermentación alcohólica, realizados simultáneamente (proceso SSF, del inglés *simultaneous saccharification and fermentation*) o según etapas sucesivas (proceso SF, del inglés *saccharification and fermentation*), sobre la cinética de fermentación y el rendimiento en etanol y co-productos. Este análisis se hace sobre los subproductos cítricos pretratados con *steam explosion*, tanto a escala de laboratorio como a escala piloto, para tratar de obtener el máximo de producción de bioetanol y otros co-productos (aceites esenciales, ácido galacturónico y CPP), y la máxima rentabilidad del proceso.
- ✓ Optimizar la separación y recuperación de los aceites esenciales de cítricos, analizando el efecto del pretratamiento de *steam explosion* sobre esta separación.
- ✓ Estudiar la composición en aceites esenciales y flavonoides de los subproductos cítricos de naranja, mandarina, limón y pomelo, así como su efecto inhibitorio de la fermentación alcohólica, para tratar de determinar el residuo aceptable de estas sustancias que permita realizar la fermentación alcohólica de esta biomasa hidrolizada con el máximo rendimiento en etanol, y en el menor tiempo posible.
- ✓ Estudiar la utilidad de los aceites esenciales extraídos de las cortezas de cítricos durante el pre-tratamiento de *steam explosion* como co-producto del proceso. Se

estudia especialmente su uso como agentes antimicrobianos aplicados en forma de vapor, para la descontaminación superficial de frutas y verduras frescas.

CAPÍTULO 2

Introducción

Parte del texto de este Capítulo ha sido publicado en los trabajos:

- Boluda-Aguilar M, López-Gómez A (2013). Production of bioethanol by fermentation of lemon (Citrus limon L.) peel wastes pretreated with steam explosion. *Industrial Crops and Products*, 41, 188-197.
- Boluda-Aguilar M, García-Vidal L, González-Castañeda FP, López-Gómez A (2010). Mandarin peel wastes pretreatment with steam explosion for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 101: 3506–3513.
- Boluda-Aguilar, M., Belisario-Sánchez, Y.Y., López-Gómez, A (2010). Modified steam explosion process for pre-treatment of citrus peel wastes. En: FITO, P., TOLDRA, F. (Eds.), *Food Innova 2010*. ISBN 978-84-693-5010-2, Valencia, España.

2.1. INTERÉS DE LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES.

2.1.1. Interés estratégico de la producción de biocarburantes y biocombustibles.

El aumento en la demanda energética que se está teniendo en las últimas décadas ha producido una creciente preocupación por la seguridad de suministro de petróleo. Es por ello que el Consejo de la Unión Europea aprobó en Abril de 2009 un paquete de medidas legislativas sobre energía y cambio climático. Además de proponer para el año 2020 la reducción del consumo de energía en un 20% y la obtención de un 20% del total del consumo energético de fuentes renovables, la Unión Europea se fijó como objetivo reducir las emisiones de gases de efecto invernadero, en el conjunto de países de la Unión Europea, para ese año 2020, en un 20% con respecto a los de 1990 (Dodíc et al., 2009; MITC, 2010)

Precisamente, el aumento en la producción de biocarburantes debe de enmarcarse dentro del esfuerzo por reducir también las emisiones de CO₂, reducir la dependencia del petróleo, y, al mismo tiempo, valorizar los residuos y subproductos agrícolas y forestales nacionales (Hahn-Hagerdal et al., 2006).

La Especificación Técnica Europea CEN/TS 14588 define biomasa como "... todo material de origen biológico, pero excluyendo aquel que ha sido englobado en formaciones geológicas y que ha sufrido un proceso de mineralización...". Entre los productos obtenidos a partir de materia orgánica para producir energía tenemos un gran grupo de materiales de diversos orígenes y con características muy diferentes. Los residuos de aprovechamientos forestales y cultivos agrícolas, residuos de podas de jardines, residuos de industrias agroforestales, cultivos con fines energéticos, combustibles líquidos derivados de productos agrícolas, residuos de origen animal o humano, etc. (IDAE, 2007).

El nombre genérico de biomasa hace referencia a la sustancia constitutiva de los seres vivos, la cual almacena energía que podría ser utilizada de diferentes formas y mediante distintos procesos: principalmente, combustión, para calentamiento directo o

para sistemas de calefacción por aire o agua, y destilación, para la producción de biocombustibles, como etanol.

En un primer momento, se planteaba que los biocarburantes se pudieran mezclar directamente con los combustibles habitualmente utilizados (gasolina y gasóleo) en proporciones que no afectaran a los reglajes de los motores de los vehículos. De esta forma, no era necesario invertir en nuevas infraestructuras de distribución de biocombustibles. Este primer planteamiento se unió también a la idea de utilizar las producciones agrícolas tradicionales de remolacha, trigo, colza y girasol como fuentes de biomasa para fabricar biocarburantes que se identificaban con productos clásicos de la industria agroalimentaria (etanol y aceites).

La segunda generación de biocarburantes se plantea como mezclas que incluyen mayores proporciones de biocarburantes obtenidos a partir de biomasa lignocelulósica, como (Orts et al., 2008; Edwards y Doran-Peterson, 2012):

- ✓ los árboles y plantas no tradicionales, como las hierbas que se pueden cultivar en tierras marginales con más o menos consumo de agua, fertilizantes y maquinaria,
- ✓ los residuos agrícolas y forestales,
- ✓ los residuos de la industria alimentaria y
- ✓ los residuos sólidos urbanos.

En la tercera generación de biocarburantes, las fuentes de biomasa son vegetales no alimenticios de crecimiento rápido y con una alta densidad energética almacenada en sus componentes químicos, por lo que se les denomina “cultivos energéticos”. Entre estos vegetales están los pastos perennes, árboles y plantas de crecimiento rápido, y las algas (Ahmad et al., 2011).

En definitiva, la heterogeneidad de los recursos aprovechables es una característica intrínseca de los sistemas de producción de energía asociados a la biomasa. Ello aumenta la complejidad ya que cada proyecto necesita análisis específicos de disponibilidad, extracción, transporte y distribución (Duff y Murray, 1996).

La producción mundial de biocombustibles en 2007 alcanzó 62 billones de litros, lo que equivale a un 1,8% del total de consumo mundial de combustible para el transporte. El mayor porcentaje de biocombustible destinado al transporte con respecto a la demanda total de combustible se tiene en Brasil y EEUU, con el 20% y 3%, respectivamente (Ajanovic, 2011).

La Directiva 2003/30/CE imponía un consumo mínimo de biocarburantes para los Estados miembros, expresado en contenido energético en relación con la cantidad de carburante fósil consumido, del 5,75% en 2010. En 2005, Europa dedicó 2,4 millones de hectáreas a la producción de biodiesel (95% de colza, 5% de girasol) y 0,2 millones de hectáreas a la producción de etanol (49% de trigo, y 51% de remolacha azucarera). De hecho, las energías renovables han tenido un gran desarrollo en los últimos años. Ha sido un crecimiento global, habiéndose desarrollado un gran protagonismo tanto en Europa, como en España, con importantes acciones de concienciación social y de apoyo público. Sin embargo, este crecimiento se ha visto significativamente ralentizado por la crisis económica que, desde 2008, sufren los países industrializados.

2.1.2. Interés del bioetanol como biocombustible.

La producción de bioetanol de biomasa rica en celulosa está considerada como una tecnología muy prometedora que pretende sustituir el uso de combustibles fósiles, especialmente en el sector transporte, por biocarburantes de fuentes renovables y que no contribuyan a la emisión de CO₂ a la atmósfera.

El bioetanol es, por tanto, un combustible alternativo interesante que puede reemplazar a la gasolina y al mismo tiempo reducir las emisiones de gases de efecto invernadero. Hay que tener en cuenta que los rendimientos en la obtención de bioetanol están directamente influenciados por el tipo de material utilizado. Por ello, es importante el estudio de cada materia prima con el fin de determinar las condiciones de producción adecuadas (Linde et al., 2007).

Las materias primas usadas para la producción de bioetanol vía fermentación se clasifican en tres grupos: (i) azúcares (de caña de azúcar, remolacha azucarera, sorgo

dulce, melaza y frutas) que pueden ser convertidos a etanol directamente; (ii) almidones (de maíz, patata, etc.) y (iii) celulosa (de madera, residuos agrícolas o de la industria alimentaria, etc.) (Dodíc et al., 2009). Tanto los almidones como la celulosa necesitan un tratamiento de hidrólisis que libere los azúcares fermentables.

En la UE-25, el trigo es la materia prima más empleada para la producción de bioetanol. En 2008, el 70% de la producción total de bioetanol en Europa fue a base de trigo. En segundo lugar se encuentran la cebada, el maíz y el centeno. En cuanto a la producción de biodiesel, en la UE se basa sobre todo en el uso de aceite de colza, ya que sólo un 3% de biodiesel se produce a partir de aceite de girasol y el 18% a partir de aceite de soja.

En EEUU, la producción de bioetanol se basa principalmente en el maíz y la producción de biodiesel en aceite de soja (82%). El otro principal productor de etanol es Brasil donde se obtiene fundamentalmente de caña de azúcar.

El incremento del precio del petróleo está haciendo que la producción mundial de etanol aumente rápidamente y, junto con los incentivos y ayudas procedentes de los distintos gobiernos, lo están haciendo más competitivo.

La producción global de bioetanol se triplicó en 2007 con respecto al año 2000 y alcanzó 52.000 millones de litros. La producción mundial de biodiesel estaba alrededor de 10.200 millones de litros en ese mismo año, que es muy poco en comparación con la producción de etanol (Ajanovic, 2011).

En 2006, los dos principales productores fueron EEUU con 18,5 millones de m³ y Brasil, con 17,4 millones de m³, es decir el 70% de la producción mundial (Balat y Balat, 2009). Los demás productores fueron China con 3,8, UE con 3,4, India con 2,0, Rusia con 0,8, Tailandia con 0,4, Sudáfrica con 0,4, Colombia con 0,3 y Argentina con 0,2 millones de m³. Se prevé que en unos años, casi la mitad de la producción de maíz procedente de Estados Unidos se dedique a la fabricación de bioetanol carburante.

Concretamente, en Europa, en el año 2006, de los 3.440 millones de litros de etanol puro producidos, 2.800 millones de litros tenían un origen agrícola y solo 640 millones no lo tenían. La distribución del consumo fue principalmente para carburantes (1.680 millones de litros). La producción se concentra principalmente en España, Suecia, Alemania y en Francia (Damien, 2010).

En 2006, las productividades medias en la obtención de bioetanol fueron (Damien, 2010):

- 6000 L/ha de caña de azúcar, con un coste medio de producción de 0,22 US \$/L de etanol.
- 3500 L/ha de maíz, con un coste medio de producción de 0,3 US \$/L de etanol.

Las productividades medias de etanol a partir de otras plantas son (Damien, 2010):

- 4500 L/ha de remolacha azucarera
- 3000 L/ha de sorgo dulce
- 2000 L/ha de cebada.

Balat et al. (2008) establecen los rendimientos de bioetanol (L) por cada 1000 kg de biomasa que se indican en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Rendimientos (L/t) en la obtención de bioetanol a partir de distintos cultivos (Balat et al., 2008).

| Producción de etanol por tonelada | |
|-----------------------------------|-----|
| Caña de azúcar | 70 |
| Remolacha azucarera | 110 |
| Batata | 125 |
| Patata | 110 |
| Mandioca | 180 |
| Maíz | 360 |
| Arroz | 430 |
| Cebada | 250 |
| Trigo | 340 |
| Sorgo | 60 |
| Otra biomasa celulósica | 80 |

El coste medio de producción de etanol se encuentra entre 0,4 y 0,6 €/L. En la actualidad, muchos de los grupos y centros de investigación de los diferentes países están estudiando cómo reducir los costes del proceso de producción de etanol y hacerlo más rentable. Las tendencias de la investigación en este campo están basadas en el estudio de las diferentes etapas del proceso, la naturaleza de las materias primas utilizadas y las herramientas de la ingeniería de procesos (síntesis de procesos, integración y optimización) (Balat et al., 2008).

Una parte importante de estas líneas de investigación sobre la producción de etanol están orientadas a la reducción de los costes de la materia prima, especialmente a través de la utilización de la biomasa lignocelulósica menos cara como pueden ser los subproductos de la industria agroalimentaria. Además, la Comisión Europea ha dado recientemente la razón a quienes hace unos años señalaban a los biocarburantes como una de las causas del hambre en el mundo y de la subida del precio de los alimentos. En este sentido, Bruselas ha anunciado un cambio legal para limitar el uso de biocombustibles procedentes de tierras de cultivo, y pretende que a partir de 2020 solo los procedentes de desechos que no sean sospechosos de encarecer la comida, serán subvencionados. Por todo ello, las distintas líneas de investigación están realizando grandes esfuerzos en la búsqueda de materias primas que no supongan un gasto elevado y que no compitan con la producción de alimentos (Diario El País, 18 Oct 2012).

En cuanto a la síntesis de procesos, y la integración de procesos (físicos, químicos y biológicos), es un objetivo común en la mejora de la rentabilidad de la producción de etanol. Se debe apostar por las bio-refinerías que permitan la producción de grandes cantidades de etanol y otros valiosos co-productos en volúmenes más pequeños para mejorar la eficacia económica del proceso (Cardona y Sánchez, 2007).

Sin embargo, en algunas ocasiones el proceso de producción de etanol no resulta rentable medioambientalmente, sobre todo si la conversión de biomasa en bioenergía requiere unos insumos energéticos adicionales, generalmente en forma de combustibles fósiles. Dependiendo de las condiciones de producción y la energía fósil demandada, el balance energético puede ser positivo o negativo. Además, cuando el etanol se mezcla

con la gasolina puede provocar problemas ambientales de contaminación del aire atentando contra los recursos hídricos y la biodiversidad.

No obstante, los estudios realizados hasta ahora han puesto de manifiesto que el uso del bioetanol en lugar de combustibles fósiles o como aditivo de estos combustibles, tiene en todos los casos un balance energético positivo. Es decir, los datos obtenidos hasta ahora indican que se necesita menos energía para obtener y distribuir etanol que la que éste aporta (Blottnitz y Curran, 2007). La cantidad de energía producida en forma de etanol con respecto a la cantidad de energía necesaria para producirlo es de 8,3 para la caña de azúcar, frente a 1,4 para el maíz. Se estima que el consumo de energía primaria necesaria es de un 30-40% del contenido energético del alcohol (Damien, 2010).

Por otro lado, se han llevado a cabo estudios que evalúan el impacto ambiental de la producción de etanol, más allá del consumo energético, y la producción de gases invernadero, y sobre la toxicidad humana y ecológica. Los resultados han puesto de manifiesto que la producción de bioetanol resulta beneficiosa para la protección del clima. No obstante, en la actualidad se siguen buscando nuevas alternativas en cuanto a la materia lignocelulósica utilizada para la producción de bioetanol, de forma que se obtengan mejores resultados todavía en términos de eficiencia energética, medioambientales y de rentabilidad económica (Blottnitz y Curran, 2007).

Muchos países están implementando programas para la incorporación de etanol en la gasolina. Por ello, la producción de etanol se ha incrementado notablemente, ya que muchos países buscan la reducción de las importaciones de petróleo, el impulso de las economías rurales y la mejora de la calidad del aire (Sánchez y Cardona, 2008) (ver la Tabla 2.2).

Tabla 2.2. Programas para el uso de etanol en combustibles (Sánchez y Cardona, 2008).

| País | Cultivo | % de etanol en mezclas de gasolina | Observaciones |
|-------------|-----------------------------------|---|--|
| Brasil | Azúcar de caña | 24 | Programa ProAlcool; etanol se utiliza como combustible en lugar de gasolina |
| USA | Maíz | 10 | La oxigenación de la gasolina es obligatoria en muchas ciudades. Existen incentivos fiscales para el uso de mezclas. En algunos estados está prohibido el uso de MTBE. |
| Canadá | Maíz, trigo, cebada | 7,5-10 | Existen incentivos legales para el uso de mezclas y programas provinciales con el objetivo de cumplir con el Protocolo de Kyoto. |
| Colombia | Azúcar de caña | 10 | Se empezó en Noviembre de 2005, exención total de impuestos. |
| España | Cebada y trigo | - | El etanol se usa en la producción de ETBE |
| Francia | Remolacha azucarera, trigo y maíz | - | El etanol se usa en la producción de ETBE |
| Suecia | Trigo | 5 | Se disponen de mezclas al 85%, no se produce ETBE |
| China | Maíz y trigo | - | Uso de etanol como combustible en las regiones central y nororientales |
| India | Azúcar de caña | 5 | Las mezclas con etanol son obligatorias en 9 estados |
| Tailandia | Mandioca | 10 | Todas las estaciones de gasolina en Bangkok deben vender mezclas con etanol. Las mezclas de etanol son obligatorias desde 2007. |

2.2. POSIBILIDADES DE APROVECHAMIENTO DE LOS SUBPRODUCTOS CÍTRICOS COMO BIOMASA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOETANOL Y OTROS CO-PRODUCTOS.

2.2.1. Biomasa lignocelulósica y su interés para la producción de bioetanol.

El complejo lignocelulósico es el biopolímero más abundante en la Tierra. Se considera que la biomasa lignocelulósica comprende alrededor del 50% de la biomasa mundial. Muchos de estos materiales se han probado para la producción de bioetanol, los cuales se pueden clasificar en seis grupos principales; residuos de las cosechas (cáscara de arroz, paja de cebada, trigo y arroz, bagazo de sorgo dulce y de caña, huesos

de aceitunas, etc.), madera (álamo, chopo), madera blanda (pino, abeto), celulosa (papel de periódico, papel desechado de oficina, papel reciclado), biomasa herbácea (heno de alfalfa, caña de alpiste, etc.) y residuos sólidos urbanos (RSU) (Sánchez y Cardona, 2008).

Se han llevado a cabo numerosos estudios sobre la producción de etanol a gran escala a partir de lignocelulosa y se ha visto que el principal factor limitante es el grado de complejidad en el tratamiento de esta materia prima. Los polímeros que la conforman tienen que ser descompuestos en azúcares fermentables que puedan ser convertidos en etanol y otros co-productos. Este proceso resulta complejo y tiene un alto consumo de energía, por lo que futuras investigaciones deben ir enfocadas a mejorar la eficiencia energética y el rendimiento en etanol y otros productos que hagan que el proceso tenga la máxima rentabilidad (Mosier et al., 2005; Margeot et al., 2009).

La materia lignocelulósica está compuesta por celulosa (20-50%), hemicelulosa (20-35%), lignina (10-35%) y otros componentes. El proceso de conversión de la materia lignocelulósica en etanol comprende las operaciones: deslignificación para liberar celulosa y hemicelulosa; depolimerización de los carbohidratos para producir azúcares libres y, por último, fermentación de las pentosas y hexosas para producir etanol (Hendriks y Zeeman, 2009).

La hidrólisis de estos polisacáridos (celulosa y hemicelulosa) es llevada a cabo mediante enzimas o ácidos. La eficiencia de la hidrólisis en liberación de azúcares fermentables es fundamental para la rentabilidad del proceso (Kumar et al., 2009).

La celulosa es un polímero compuesto por subunidades de D-glucosa unidas por enlaces β -1,4 glicosídicos. Las cadenas de celulosa se encuentran empaquetadas por enlaces de hidrógeno formando microfibrillas. Estas fibras están a su vez unidas entre sí por hemicelulosa y pectina y cubiertas por lignina. Además, en muchas ocasiones estas microfibrillas se asocian en forma de haces o macrofibras.

Esta estructura compleja de la celulosa la hace resistente a los tratamientos biológicos y químicos usados para la liberación de azúcares fermentables (Hendriks y Zeeman, 2009).

Los azúcares simples predominantes en la hemicelulosa son la manosa, para maderas blandas, y la xilosa para maderas duras y residuos de la agricultura. Además, este heteropolímero contiene galactosa, glucosa, arabinosa y pequeñas cantidades de ramnosa, ácido glucurónico, ácido metil-glucurónico y ácido galacturónico (Delmer y Amor, 1995). La solubilidad de los azúcares de la celulosa es distinta para cada uno de ellos. En orden decreciente, se tendría a la manosa, glucosa, xilosa, arabinosa y galactosa. La solubilidad es mayor con el aumento de la temperatura. La solubilización de los compuestos de la hemicelulosa en agua comienza alrededor de los 180°C. La hemicelulosa es el compuesto más sensible al tratamiento térmico dentro del complejo celulosa-hemicelulosa-lignina (Bobleter, 1994).

La hemicelulosa tiene un peso molecular inferior a la celulosa por lo que se dispone lateralmente como ramas de cadenas cortas compuestas por distintos azúcares. Así, estas ramas son más fácilmente hidrolizables (Hendriks y Zeeman, 2009).

La lignina es una molécula muy compleja, no soluble en agua, formada por unidades de fenilpropano. El objetivo principal de la lignina es dar a la planta soporte estructural, impermeabilidad y resistencia contra el ataque microbiano y el estrés oxidativo. Es un componente recalcitrante de la pared celular vegetal, y cuanto mayor sea la proporción de lignina mayor será la resistencia a la degradación química o enzimática (Kumar et al., 2012). La presencia de lignina resulta un inconveniente de la utilización de materiales lignocelulósicos en la fermentación alcohólica. La lignina limita la velocidad de la hidrólisis enzimática actuando como una barrera física sobre el sustrato. Además, la lignina parece inhibir la hidrólisis impidiendo que se produzca la unión de los enzimas con la molécula de celulosa (Alvira et al., 2010). También, la solubilización de la lignina comienza a partir de los 180°C (Bobleter, 1994).

Además, en algunos materiales lignocelulósicos (como cortezas de cítricos) podemos encontrar otros polisacáridos como la pectina. Las pectinas son moléculas

complejas que se encuentran en la pared celular primaria. Las pectinasas son un grupo heterogéneo de enzimas encargados de hidrolizar estas sustancias pécticas (Mamma et al., 2008).

2.2.2. Aprovechamiento de los subproductos cítricos.

El cultivo de los cítricos es uno de los más importantes del mundo con producciones en el año 2008 de hasta 102 millones de toneladas, de las cuales el 30% se destina a la industria de zumos (González-Molina et al., 2010). Los cítricos más abundantes en el mundo son naranja (69 millones de toneladas), mandarina (30 millones de toneladas), limón (14 millones de toneladas) y pomelo (7 millones de toneladas) (FAO, 2010).

En los años 2007/2008 se tuvo una producción mundial de cortezas de cítricos procedentes de la industria de unos 15 millones de toneladas (USDA, 2008). Estos subproductos son destinados habitualmente a la alimentación animal ya sea para consumo en fresco, o previa realización de tratamientos de ensilaje o deshidratación (Talebnia et al., 2008). En España, parte de estos subproductos se suelen secar y se venden en forma de pellets o gránulo a las industrias de fabricación de piensos (producto conocido como CPP, *citrus pulp pellets*). Pero, la realización del secado de estos productos implica un gran consumo de energía y los precios de estos CPP muchas veces no son lo suficientemente altos como para cubrir estos cuantiosos gastos energéticos (Braddock, 1999).

Además, en muchas ocasiones se realizan vertidos incontrolados de estas cortezas como resultado de la dificultad de disponer una gran cantidad de desechos en un período de tiempo relativamente corto. En estos casos, se pone de manifiesto que estos subproductos cítricos constituyen un problema medioambiental importante (Caparra et al., 2007).

La eliminación de estos residuos plantea un grave problema para las industrias de cítricos en todo el mundo, y más especialmente en EEUU por encabezar la lista de los países con mayor producción. Concretamente en Florida, se han producido en los

últimos 15 años una media anual de 5 millones de toneladas de subproductos exclusivamente de naranja y pomelo (Wilkins, 2009).

Le siguen en producción, Brasil (concretamente la región de Sao Paulo) y los países mediterráneos (con más de 1,5 millones de toneladas entre España, Italia, Grecia, Egipto, Turquía y Marruecos) (López-Gómez et al., 2009; Caparra et al., 2007; Ververis et al., 2007; Mamma et al., 2008). En el caso de España, y concretamente en la Región de Murcia, la producción media de residuos de cáscara de cítricos es alrededor de 600.000 t por año (Beltrán et al., 2008).

Los residuos procedentes de industrias de cítricos son una excelente materia prima para la producción de etanol por su alto contenido en carbohidratos (similar a otras materias primas en estudio como las cáscaras de soja, el maíz o la paja de trigo) (Tabla 2.3), por resultar una materia prima no destinada al consumo humano, por su bajo coste de adquisición (subproductos de la industria), y porque su uso pone solución al problema medioambiental generado por este tipo de residuos (Marín et al., 2007; Mielenz et al., 2009).

Como inconveniente de la utilización de este tipo de biomasa para la producción de etanol, se debe mencionar la existencia de compuestos inhibidores de la fermentación alcohólica, que es llevada a cabo por las levaduras, como son los aceites esenciales (principalmente el aceite esencial de limoneno, por su alta concentración) y los flavonoides (que aparecen muy concentrados en la corteza de cítricos). Estos pueden incidir negativamente sobre la cinética del proceso de fermentación y el rendimiento en etanol del mismo (Benelli et al., 2010; Espina et al., 2011).

De entre los aceites esenciales presentes en los cítricos, el 85%-90% son compuestos volátiles. Los componentes volátiles son una mezcla de monoterpenos, sesquiterpenos hidrocarbonados y derivados de estos oxigenados incluyendo aldehídos (como citral), cetonas, ácidos, alcoholes (como linalool) y ésteres. El aceite esencial predominante de las cortezas de cítricos es el D-limoneno (dependiendo del tipo de cítrico se encuentra en un rango de entre 32 y 98%) (Espina et al., 2011; Uysal et al., 2011; Benelli et al., 2010).

Por otro lado, se han identificado más de sesenta tipos de flavonoides en los cítricos. La mayoría se pueden clasificar en tres grupos, flavononas, flavonas y flavonoles. Dentro de esta clasificación, los que se encuentran habitualmente son naringina, neohesperidina, poncirina, neoeriocitrina, hesperidina, narirutina, didimina, naringenina, y quercitina (Igual et al., 2011). Existen diversas investigaciones que ponen de manifiesto la actividad antimicrobiana de estos flavonoides (Cushnie y Lamb, 2005; Mandalari et al., 2007).

Tabla 2.3. Composición química de diferentes materiales lignocelulósicos.

| | Cenizas (% pf) | Azúcares (% pf) | Grasas (% pf) | Proteínas (% pf) | Pectina (% pf) | Lignina (% pf) | Celulosa (% pf) | Hemicelulosa (% pf) |
|------------------------------------|----------------|-----------------|---------------|------------------|----------------|----------------|-----------------|---------------------|
| Cortezas de mandarina ^a | 5,0 | 10,1 | 1,6 | 7,5 | 16,0 | 8,6 | 22,5 | 60,0 |
| Cortezas de limón ^a | 2,5 | 7,0 | 1,50 | 7,0 | 13,0 | 7,6 | 23,1 | 8,1 |
| Cortezas de naranja ^a | 2,6 | 9,6 | 4,0 | 9,1 | 23,0 | 7,5 | 37,1 | 11,0 |
| Cortezas de pomelo ^a | 8,10 | 8,10 | 0,52 | 12,51 | 8,53 | 11,56 | 26,57 | 5,60 |
| Cascaras de soja ^b | 1,0-2,8 | nd | nd | 9,0-14,0 | 6,0-15,0 | 1,0-4,0 | 29,0-51,0 | 10,0-20,0 |
| Rastrojo de maiz ^b | 4,0-8,0 | nd | nd | 4,0-9,0 | 0 | 16,0-23,0 | 31,0-41,0 | 20,0-34,0 |
| Paja de trigo ^b | 1,0-10,0 | nd | nd | 2,0-6,0 | 0 | 5,0-19,0 | 32,0-49,0 | 23,0-39,0 |

^a de Marin et al. (2007) para pieles de cítricos de industrias de zumos españolas ^b de Mielenz et al. (2009) nd = no datos existentes

2.3. TÉCNICAS EMERGENTES DE PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE BIOMASA.

La complejidad del proceso de producción de etanol depende fundamentalmente de la materia prima que se utilice. De esta manera, el espectro de tecnologías diseñadas e implementadas para tal fin va desde la simple conversión de los azúcares por la fermentación, a la multietapa de conversión de la biomasa lignocelulósica en etanol. La gran diversidad de tecnologías requiere el análisis global junto con el diseño y desarrollo de cada una de las operaciones del proceso (Sánchez y Cardona, 2008).

La producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica comprende cinco fases principalmente: pretratamiento del material lignocelulósico, hidrólisis ácida o enzimática, fermentación, separación de los productos y tratamiento posterior de la fracción líquida (Sukumaran et al., 2010).

2.3.1. Pretratamientos de la biomasa.

La biomasa lignocelulósica es una materia prima resistente a la hidrólisis debido a la cristalinidad de la celulosa y la disposición compacta del conjunto celulosa, hemicelulosa y lignina. Se ha estudiado una amplia gama de pretratamientos térmicos, mecánicos y químicos, así como combinaciones de ellos, para mejorar el proceso (Sukumaran et al., 2010).

El pretratamiento debe cumplir los siguientes requisitos; a) reducir el tamaño de partícula de la biomasa, b) hacer la celulosa más accesible para que pueda ser atacada por los enzimas, c) evitar la formación de posibles inhibidores de enzimas hidrolíticas y de los microorganismos que llevan a cabo la fermentación, d) reducir la energía consumida en el pretratamiento, e) producir la menor cantidad de residuos y f) reducir la cantidad de productos químicos con el fin de hacer el proceso más rentable (Taherzadeh y Karimi, 2008). Los pretratamientos para el material lignocelulósico se clasifican en “pretratamientos físicos”, “pretratamientos físico-químicos”, “pretratamientos químicos” y “pretratamientos biológicos” (Sánchez, 2008).

2.3.1.1. Tratamientos físicos.

La biomasa puede ser triturada o molida de forma que se reduzca la cristalinidad de la celulosa. Esta reducción facilita el acceso de los enzimas a la superficie del material y aumenta la conversión de la celulosa.

Los requerimientos energéticos para la trituración mecánica dependen del tamaño final de las partículas y las características de la biomasa. Aunque este tipo de tratamientos mecánicos incrementan la reactividad de la celulosa en la hidrólisis enzimática, los procesos tienen un alto costo económico y energético (Ghosh y Ghose, 2003).

Otra alternativa dentro de los métodos físicos es la pirólisis ya que la celulosa se descompone rápidamente cuando se trata a temperaturas elevadas.

2.3.1.2. Tratamientos físico-químicos

Son métodos más eficaces que los pretratamientos físicos. Entre los distintos tipos de pretratamiento existentes, la *steam explosion* (o explosión de vapor) es uno de los más utilizados.

El pretratamiento de *steam explosion* es un proceso mediante el cual se aplica vapor a presión dentro de un reactor donde se tiene la biomasa. Tras someter el material a alta presión y temperatura, el vapor se descarga repentinamente reduciendo rápidamente la presión en el reactor, y provocando la vaporización violenta del agua interna (celular) de la biomasa y la ruptura de las paredes celulares. Durante el proceso, el uso de vapor saturado a alta presión causa reacciones de autohidrólisis en las que la hemicelulosa y la lignina se convierten en compuestos solubles (Shahbazi et al., 2005). En comparación con otros pretratamientos alternativos, las ventajas de éste incluyen un impacto ambiental significativamente inferior, menor inversión de capital, y se trata de un proceso relativamente poco peligroso.

El tratamiento de *steam explosion* se ha empleado en cierta variedad de materias primas lignocelulósicas, previo al tratamiento enzimático y la fermentación de los azúcares. Este pretratamiento es conocido como uno de los más eficaces y rentables para la madera y residuos agrícolas (Ruiz et al., 2008).

Las condiciones del tratamiento más importantes de este proceso son el tiempo de residencia, la temperatura, el tamaño de partícula y el contenido en humedad (Yu et al., 2012). El pretratamiento no sólo modifica las características químicas de la lignocelulosa, sino que también produce cambios físicos de la biomasa que pueden afectar a la cinética de la hidrólisis y fermentación posteriores (Wang et al., 2009).

Por otro lado, cuando el material lignocelulósico es pretratado con *steam explosion*, se ha comprobado que, en función de las condiciones de realización, en el hidrolizado pueden aparecer sustancias inhibitorias de levaduras y enzimas que se derivan de los tres componentes que forman la biomasa lignocelulósica y, por tanto, es necesario tenerlos en cuenta puesto que pueden reducir la productividad del proceso (Linde et al., 2007).

Otro de los métodos físico-químicos es el pre-tratamiento con agua caliente o termohidrólisis. Se ha visto que esta tecnología es muy efectiva en la liberación de pentosas que serán fermentadas por las levaduras. Algunos estudios han puesto de manifiesto que la termohidrólisis muestra mejores resultados en comparación con otros pre-tratamiento físico-químicos (Negro et al., 2003; Sánchez et al., 2008).

En general, los tratamientos térmicos a temperaturas por encima de 160°C causan, además de la solubilización de la hemicelulosa, también la de la lignina. Como consecuencia, tiene lugar la formación de compuestos fenólicos que, en muchos casos, tienen un efecto tóxico o inhibitorio sobre bacterias y levaduras.

Por otro lado, los tratamientos fuertes pueden causar la precipitación tanto de los compuestos procedentes de la lignina como de la hemicelulosa (furfural e hidroximetil furfural) (Hendriks y Zeeman, 2009).

La formación de las citadas sustancias inhibidoras, además, se ve favorecida por ambientes ácidos (Ramos et al., 2003). Estudios como los de Laser et al. (2002), han mostrado que cuando la concentración de sólidos era del 3% o superior y la temperatura superaba los 220°C, durante 2 minutos de pretratamiento, la producción de etanol se inhibió por completo como consecuencia de la formación de furfural y otros compuestos (procedentes de la lignina).

Oliva et al. (2003 y 2004) llevaron a cabo ensayos para evaluar el efecto de los compuestos liberados durante el pre-tratamiento de *steam explosion* de la biomasa procedente de chopo sobre el crecimiento y productividad de etanol de *Kluyveromyces marxianus*. Los resultados mostraron actividad de estos compuestos, lo que se tradujo en una reducción en el crecimiento microbiano y en la producción de etanol.

2.3.1.3. Tratamientos químicos

Se emplean diferentes agentes químicos como ácidos, álcalis, peróxidos y disolventes orgánicos. Los ácidos inorgánicos como el H₂SO₄ y HCl son usados habitualmente en el pre-tratamiento de la biomasa.

La hidrólisis con ácido sulfúrico se ha utilizado con éxito en la mejora de la posterior hidrólisis de la celulosa. El inconveniente de este tratamiento es el costo del proceso, superior a los de *steam explosion* (Sánchez y Cardona, 2008).

El pre-tratamiento con ácidos y la *steam explosion* son los métodos más estudiados. El laboratorio de Energía de EEUU apuesta por el uso de uno u otro en función del tipo de biomasa. Otro pretratamiento químico es el alcalino. En este caso, se añaden bases diluidas en la biomasa. La eficacia de este tratamiento depende del contenido en lignina que se tenga. En general, la utilización de bases como el hidróxido sódico o de solventes, como el etanol o metanol, permite la disolución de la lignina. Sin embargo, los costes de este tipo de pre-tratamiento son tan altos que hacen al tratamiento no rentable a gran escala (Lynd et al., 1999).

2.3.1.4. Tratamientos biológicos

Los pretratamientos biológicos no requieren ni la adición de sustancias químicas, ni gran consumo de energía, ni la disposición de condiciones ambientales especiales. Sin embargo, la mayoría de los procesos son muy lentos lo que limita su aplicación industrial. Algunos microorganismos pueden ser usados para tratar el material lignocelulósico y favorecer la posterior hidrólisis enzimática. Por ejemplo, muchos hongos producen enzimas encargadas de degradar la lignina. Tengerdy y Szakacs (2003) y Kang et al., (2004) comprobaron la viabilidad de producir celulasas y hemicelulasas a través de la fermentación de materia lignocelulósica en estado sólido. Esta tecnología mejora la viabilidad del proceso de producción de bioetanol, teniendo en cuenta que las celulasas suponen el 20% de los costes del proceso (Sánchez et al., 2008).

También se han hecho estudios con bacterias para el pretratamiento de la biomasa. Kurakake et al. (2007) utilizaron *Sphingomonas paucimobilis* y *Bacillus circulans* para el pretratamiento de papel. La utilización conjunta de estas cepas favoreció la posterior hidrólisis enzimática del papel y se obtuvo una recuperación de azúcares del 94%.

En definitiva, uno de los principales problemas durante el pre-tratamiento y la hidrólisis de la biomasa, es la variabilidad en el contenido en lignina y hemicelulosa. Esta variabilidad depende de factores como el tipo de planta usada como biomasa, el tipo de cultivo, el método de recolección, etc. Esto hace que ninguno de los métodos de pre-tratamiento pueda aplicarse de forma genérica para todas las materias primas. Las futuras investigaciones sobre tratamientos previos de materias lignocelulósicas van encaminadas al uso de plantas genéticamente modificadas con alto contenido en carbohidratos o con su estructura modificada que facilite los efectos de pre-tratamiento en condiciones suaves. Se estima que el uso de nuevos materiales junto con la mejora de las tecnologías de tratamiento, podría reducir considerablemente el coste de producción de etanol (Wooley et al., 2008).

2.3.2. Hidrólisis.

Para poder fermentar la biomasa lignocelulósica pretratada, la celulosa tiene que ser degradada a glucosa (proceso conocido como *sacarificación*) mediante la adición de ácidos o enzimas.

La hidrólisis enzimática resulta un proceso lento pero que ha demostrado tener buenos resultados en el tratamiento de la materia lignocelulósica. Además, evita la formación de compuestos que degradan la glucosa (Sánchez y Cardona, 2008).

La hidrólisis de la celulosa presente en la biomasa pre-tratada es la clave para la producción de etanol. El rendimiento en azúcares a partir de la materia prima pretratada es en gran parte dependiente del tipo de enzima (*celulasa*) utilizada y de cómo ésta reacciona en distintos tratamientos. Estas características determinarán en gran medida la carga enzimática a adicionar en la hidrólisis, la duración de ésta y por tanto, la economía del proceso (Sukumaran y Pandey, 2009).

Las celulasas son enzimas que hidrolizan los enlaces β -1,4-D-glucano presentes en las cadenas de celulosa para producir azúcares como glucosa, celobiosa y oligosacáridos. Los tres tipos principales de celulasas son la celobiohidrolasa (CBH), endo- β -1,4-glucanasa (EG) y β -glucosidasa. Las endoglucanasas se encargan de romper el polímero de celulosa, dejando libres los extremos reductores y no reductores. Posteriormente, la CBH actúa sobre estos extremos liberando oligosacáridos y unidades de celobiosa y, por último, las β -glucosidasas actúan sobre la celobiosa para liberar la glucosa y así completar la hidrólisis (Sukumaran et al., 2010). Las enzimas actúan de forma sinérgica para convertir la celulosa en glucosa. La última reacción catalizada por la β -glucosidasa es muy importante ya que el sustrato de esta enzima (celobiosa) es un inhibidor de la CBH y EG cuando ésta se encuentra en concentraciones elevadas. La celobiosa puede disminuir la tasa de hidrólisis de la celulosa hasta un 50% (White y Hindle, 2000).

La hidrólisis enzimática es un tratamiento efectivo para la liberación de azúcares y que no genera sustancias inhibitoras que puedan actuar negativamente sobre la etapa

de fermentación. Sin embargo, es un tratamiento muy costoso debido al elevado precio de los enzimas (Kumar et al., 2009). Las evaluaciones económicas realizadas han puesto de manifiesto que el coste de la enzima celulosa contribuye en un 40-49% a los costes totales de producción. Existen estudios en los que se asegura que es preciso reducir la cantidad de enzimas celulósicas necesarias para la hidrólisis por lo menos diez veces para que el proceso resulte rentable económicamente (Sukumaran et al., 2010).

Además, la hidrólisis enzimática se ve limitada por varios factores como la cristalinidad de la celulosa, grado de polimerización, contenido de humedad, superficie disponible y contenido en lignina (Hendriks and Zeeman, 2009).

Chang y Holtzaple (2000) señalaron que la cristalinidad de la celulosa sólo afecta en la primera hora de hidrólisis. En cuanto al tamaño de partícula, se ha visto que una reducción del tamaño de partícula y, en consecuencia, un aumento en la superficie disponible, afecta favorablemente a la hidrólisis (Hendriks y Zeeman, 2009). Otros autores como Thompson et al. (1992) concluyeron que el tamaño de poro del sustrato, en relación al tamaño de los enzimas, es el principal limitante de la hidrólisis enzimática de material lignocelulósico. La eliminación de la hemicelulosa aumenta el tamaño medio de poro del sustrato y, por tanto, puede aumentar la probabilidad de hidrólisis de la celulosa (Palonen et al., 2004).

Otro factor limitante es el contenido en lignina, puesto que ésta actúa como un escudo evitando que partes del sustrato sean hidrolizadas (Chang y Holtzaple, 2000).

2.3.3. La fermentación alcohólica.

La configuración clásica empleada para la fermentación del material lignocelulósico pretratado es un proceso de dos fases llevadas a cabo secuencialmente. Por un lado, la hidrólisis de la celulosa y, por otro, la fermentación (Sánchez et al., 2008).

Los microorganismos que llevan a cabo la fermentación deben ser resistentes a los compuestos inhibidores que se generan durante la hidrólisis y fermentación de la

materia lignocelulósica, tolerar altas concentraciones de azúcares y alcohol, altas temperaturas y pH bajos y deben ser capaces de utilizar diferentes sustratos (Zhang et al., 2009). La levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la bacteria *Zymomonas mobilis* son los microorganismos habitualmente utilizados para llevar a cabo la fermentación alcohólica (Sukumaran et al., 2010).

Las levaduras del tipo *Saccharomyces* son las más eficientes para la producción de etanol. Además, presentan una buena tolerancia a las elevadas concentraciones de etanol (< 12% vol.) o de azúcares, ya que adaptan su membrana externa para facilitar la transferencia de etanol desde el interior al exterior de la célula hasta concentraciones del 10% vol. (Damien, 2010). La fermentación alcohólica, se puede desarrollar a pH ácido (entre 3,5 y 6) sin que se produzcan cambios en la velocidad de la reacción. Por tanto, el pH de las cortezas de cítricos no resulta un inconveniente para el desarrollo de fermentación, además de que, con estos pH, se previenen las proliferaciones bacterianas parásitas que pueden resultar una competencia para el crecimiento de levaduras (Damien, 2010).

2.3.3.1. Hidrólisis y fermentación por separado (proceso SF)

El material lignocelulósico que contiene la celulosa a disposición de los enzimas se hidroliza (proceso de sacarificación). Una vez que se completa la hidrólisis, el sustrato se fermenta produciendo etanol. Una de las características de este proceso, en dos fases separadas, es que cada una de ellas se puede realizar en sus condiciones óptimas. Los factores más importantes a tener en cuenta en la etapa de sacarificación son el tiempo de reacción de los enzimas, temperatura, pH, cantidad de materia hidrolizada y carga enzimática añadida.

2.3.3.2. Hidrólisis y fermentación simultáneas (proceso SSF)

Sin embargo, son muchos los estudios que muestran un menor consumo energético y rendimientos en etanol superiores cuando hidrólisis (o sacarificación) y fermentación tienen lugar simultáneamente. En este caso, enzimas y microorganismos son añadidos en un mismo proceso, de forma que los azúcares que se van liberando de

la hidrólisis pueden ser inmediatamente utilizados por las levaduras. De esta forma, también se evita el efecto inhibitorio de los azúcares (glucosa, xilosa, celobiosa y otros oligosacáridos) sobre la enzima celulasa (Olofsson et al., 2008, Kumar et al., 2009; Widmer et al., 2009, 2010; Huisjes et al., 2012).

Además, la combinación de los procesos de hidrólisis y fermentación disminuye el número de depósitos necesarios para llevarlas a cabo y, por tanto, los costes de inversión. Los estudios realizados hasta el momento han estimado una disminución de la inversión de más de un 20% (Wingren et al., 2003).

Inevitablemente, también hay desventajas del proceso simultáneo SSF en comparación con la hidrólisis y fermentación separadas (SF). La temperatura óptima para la hidrólisis enzimática es generalmente superior a la de la fermentación, al menos cuando se utilizan levaduras en el proceso. Así, el llevar a cabo las operaciones por separado permite optimizar las condiciones para cada una de ellas de forma independiente. Además, en el proceso SSF no es posible reutilizar la levadura debido a los problemas que se tienen de separación de ésta con la lignina tras la fermentación, lo que supone un gasto adicional y una pérdida en el rendimiento (Olofsson et al., 2008)

Otros autores han expuesto otros inconvenientes en la utilización del proceso simultáneo, como mayores requerimientos de dosis enzimática, lo que repercute negativamente sobre los costes del proceso y la necesidad de realizar diluciones del material lignocelulósico para que se den las condiciones reológicas óptimas para llevar a cabo el proceso lo que supone un gasto adicional de agua (Sánchez y Cardona, 2008; Kaur Sandhu et al., 2012).

PARTE II

MATERIAL Y MÉTODOS

CAPÍTULO 3

Material y Métodos

3.1. Subproductos utilizados

Para llevar a cabo los distintos ensayos, se tomaron muestras de subproductos de la extracción de zumos de mandarina, limón, pomelo y naranja (compuestos principalmente de pieles, tal como se ve en la Foto 3.1). A estos subproductos se le denomina MCPW, LCPW, GCPW y OCPW, respectivamente. La toma de muestras se hizo directamente de las fábricas de zumos cítricos de la Región de Murcia (sureste de España), durante las cosechas de 2008, 2009, 2010, 2011, y se almacenaron en congelación (-20 °C) hasta su uso.



Foto 3.1. Pieles y pulpas de naranja recogidas de la industria de zumos

3.2. Análisis y determinaciones

3.2.1. Análisis de ácido galacturónico (GA) y azúcares

Durante y después de la fermentación, se tomaron muestras de 10 mL de mosto fermentado los cuales se centrifugaron a 4000 rpm a 4 °C durante 8 minutos. A continuación, el sobrenadante fue filtrado con filtro de Nylon de 45 micras y se analizó para la determinación de azúcares, GA y etanol.

Los azúcares (glucosa, fructosa, galactosa, arabinosa, ramnosa y xilosa) fueron analizados por cromatografía iónica, en un Cromatógrafo iónico 871 Advanced Bioscan con detector amperométrico y columna Metrosep Carb 1-150 (6, 1013. 010) 4,6 x 250 mm y 5,0 micras de tamaño de partícula, el flujo fue de 0,9 mL / min, temperatura de 32 °C y 10 µL el volumen de inyección. Se utiliza NaOH 80 mM como fase móvil.

El ácido galacturónico se analizó por cromatografía iónica, en un Cromatógrafo 861 Advanced Compact provisto de detector de conductividad termostático y columna Metrosep Organic Acids 250/7.8 7,8 × 250 mm and 5,0 µm de tamaño de partícula. El flujo fue de 0,4 mL / min y la temperatura de 20 °C. Se utilizó H₂SO₄ de 0,33 mmol con acetona en proporción 90:10 v / v como fase móvil.

3.2.2. Análisis del contenido de aceites esenciales

La concentración de aceites esenciales se determinó en las pieles de cítricos antes y después del pretratamiento con *steam explosion* mediante el método de Scott, expresándose como contenido de D-limoneno (Scott y Veldhuis, 1966).

3.2.3. Determinación del contenido en etanol

Se parte de 10 mL de muestra, previamente centrifugada y filtrada, para determinar la concentración de etanol por cromatografía de gases, en Cromatógrafo Agilent 6890 con detector FID y columna DB Wax ETR de 30 m x 0,25 mm, con un caudal de 1,1 mL / min. La inyección fue de 0,8 µL de muestra (Belisario Sánchez et al., 2009).

3.2.4. Determinación del contenido en materia seca

El contenido total de materia seca de las pieles de cítricos, antes y después de pretratamiento de *steam explosion*, y de los CPP obtenidos tras la fermentación, se determinó mediante secado a 70 °C durante 20 h seguido de secado en estufa de vacío a 70 °C durante 1 h (Wilkins et al., 2007c).

3.2.5. Análisis termogravimétrico.

El contenido en pectina, hemicelulosa, celulosa, lignina y ceniza de las pieles de cítricos, antes y después del pretratamiento, y el contenido del residuo obtenido tras la fermentación (CPP) se han determinado mediante el análisis termogravimétrico (TGA). Este se llevó a cabo en un analizador termogravimétrico TGA DSC HT (Mettler-Toledo GmbH, Schwerzenbach, Suiza) bajo una atmósfera de N₂ u O₂ con flujo de 50 mL / min. Se utilizaron pocillos de aluminio de 70 µL de capacidad y sin tapa.

Estos estudios se llevaron a cabo con la temperatura programada y el proceso constaba de dos fases; primeramente una fase dinámica donde la temperatura ascendió desde 30°C hasta 900 °C, con una velocidad de calentamiento de 10 °C / min, en una atmósfera de nitrógeno y en segundo lugar, una fase isotérmica con atmósfera de oxígeno que duró 10 minutos a 900°C. Este último paso se realizó con el fin de evaluar los contenidos en cenizas. Aproximadamente 10 mg de muestra se utilizaron para cada medida. La derivada termogravimétrica (DTG) fue analizada por pérdida de peso (Chen y Chen, 2009). Cuando se tiene pérdida de peso a una Tmax de 53,6°C se atribuye a la pérdida de agua libre. A continuación se tienen los picos de descomposición a las temperaturas máximas de 206°C, 250°C y 326°C que corresponden con la pectina, hemicelulosa y celulosa, respectivamente (Einhorn-Stoll et al., 2007). El porcentaje en peso de cada componente en las muestras analizadas se obtuvo como pérdida de masa producida durante su volatilización (García-Barneto et al., 2009).

3.2.6. Determinación de flavonoides.

La preparación de las muestras (3 repeticiones por muestra) se hizo mediante la modificación del método de Vanamala et al., 2006. Se pesaron en tubos falcon 60 gramos de pieles de mandarina, limón, pomelo y naranja sometidas a pretratamiento de steam explosion y se les añadió 20 mL de dimetilformamida (DMF). Las muestras se agitaron en Vortex durante 2 minutos y se centrifugaron durante 10 minutos a 4000 rpm y 4°C. Tras la centrifugación, se recogió el sobrenadante y se volvió a centrifugar durante 20 minutos a 8000 rpm y 4°C.

Finalmente, las muestras se filtraron con filtro de Nylon de 0,45 μm y se analizaron en Cromatógrafo líquido de alta resolución Water Alliance 2695, acoplado a un sistema de espectrometría de masas con detector ZQ Micromass de Water, y con columna Phenomenex modelo Luna 5u C18, 250 x 4.6 mm, 5 μm . Para la cuantificación e identificación de flavonoides se siguió el método de Cantos et al. (2000).

El volumen inyectado fue de 20 μL , la fase móvil utilizada fue agua al 5% de ácido fórmico como solvente A, y metanol como solvente B, con un flujo de 1 mL/min. El gradiente utilizado se muestra en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Gradiente de solventes

| Tiempo (min) | A % | B % |
|--------------|-----|-----|
| 0 | 98 | 2 |
| 30 | 68 | 32 |
| 40 | 60 | 40 |
| 50 | 5 | 95 |
| 65 | 98 | 2 |

Fuente: Elaboración propia

La detección de los compuestos en HPLC se hizo a las longitudes de onda de 355 y 285 nm con un UV-VIS diodo array (DAD).

La identificación de los compuestos se llevó a cabo con un detector de masas compuesto por sonda de ionización (ionización por electrospray ESI); fuente de ionización Interfase Z-SPRAY y analizador cuadrupolo. La temperatura de desolvatación fue de 300°C y el caudal de gas de desolvatación de 600L/h. El voltaje de cono fue de 45 eV, el voltaje del capilar de 3,5 kV y su temperatura de 100 °C (modificación del método de Anagnostopoulou et al., 2005).

Un fotomultiplicador detecta los iones separados según sus masas por lo que la identificación se realizó según los pesos moleculares de los distintos flavonoides (Shi et al., 2007; Justesen et al., 1998; Anagnostopoulou et al., 2005).

Para la cuantificación de los distintos compuestos se analizaron patrones puros de los principales flavonoides presentes en las pieles de cítricos (Sigma-Aldrich). Se analizaron distintas concentraciones de estos patrones diluidos en metanol y se obtuvieron las respectivas curvas de calibrado.

3.3. Plan experimental del estudio de la eficiencia de los pre-tratamientos y la fermentación alcohólica de pieles de cítricos.

3.3.1. Pretratamiento de steam explosion de las pieles de cítricos (CPW).

Las pieles de mandarina, limón, pomelo y naranja procedentes de la industria de zumos se trituraron, tras la descongelación, de forma que el tamaño de partícula fuera inferior a 7 mm y se introdujeron en un reactor a presión (HRS Spiratube, modelo T-Sensación), con capacidad de 12 L (situado en la planta piloto de la Universidad Politécnica de Cartagena, España).



Foto 3.2. Trituradora de pieles de cítricos

Este reactor dispone de un cuerpo cilíndrico horizontal de superficie rascada provisto de placas de calefacción (que se calientan bien con vapor indirecto o usando aceite como fluido térmico). Para el calentamiento, el reactor permite la inyección de vapor externo directo a la biomasa aumentando la presión (hasta 6 bar abs en 5 min). Igualmente se puede realizar indirectamente mediante placas de calentamiento. Los rascadores van girando durante el tratamiento y removiendo suavemente la biomasa.

Tras la termohidrólisis, todo el vapor acumulado (a 6 bar abs) se puede derivar a una cámara de vacío (100 mbar) de 5 L de capacidad o a otra con presión atmosférica y 20 L de capacidad, para reducir bruscamente la presión en el reactor y provocar así una rápida descompresión y en consecuencia, la ruptura de la pared celular.

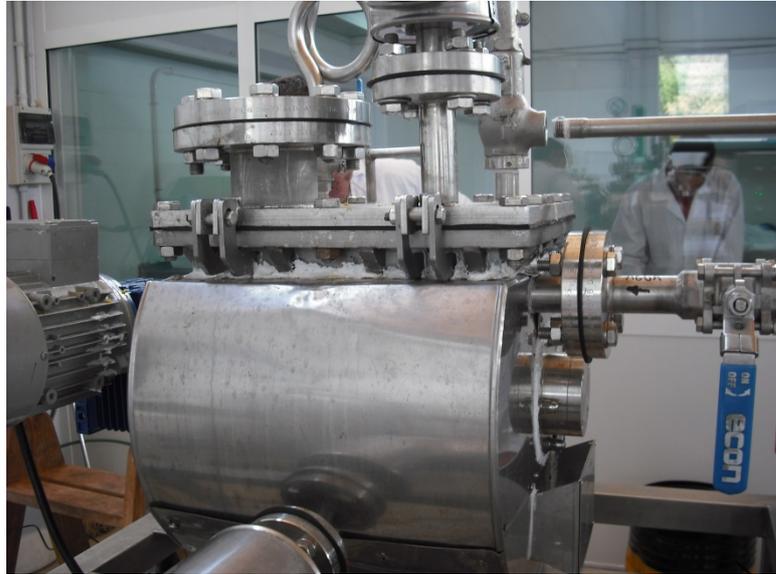


Foto 3.3. Reactor de cuerpo cilíndrico horizontal de superficie rasgada de 12 L de capacidad.



Foto 3.4. Equipo completo para la realización de *steam explosion* compuesto por reactor, bomba de aceite, sistema de refrigeración y sistema de control de presión y temperatura.

Las pruebas de *steam explosion* se hicieron en seco (sin ninguna adición de agua a la biomasa fresca, siendo la concentración de materia seca de aproximadamente el

20%) y en condiciones húmedas (dónde la relación de agua: biomasa fue de 1:2 w/w, normalmente 1250 g de agua y 2500 g de biomasa fresca (equivalente a una concentración de materia seca de aproximadamente 14%).

Se realizaron pruebas de *steam explosion* a 4-6 bar (abs) frente a un vacío de 100 mbar y frente a condiciones ambientales en un tanque unido a un refrigerador (con agua fría a 2°C). Con excepción de estos ensayos previos, todos los pretratamientos realizados en pieles de cítricos se realizaron en condiciones húmedas, con inyección de vapor a 160°C y presiones de 6 bar (abs) durante 5 minutos. La descompresión en todos los casos se realizó frente a presión atmosférica. La biomasa pretratada y el condensado obtenido se recogen por separado y se llevan a laboratorio dónde se determinó la concentración de D-limoneno, contenido en materia seca y azúcares. La biomasa se almacenó en refrigeración mientras no se realizan los tratamientos de hidrólisis y la posterior fermentación.

3.3.2. *Hidrólisis enzimática y fermentación.*

✓ Enzimas

Para la hidrólisis se utilizaron los enzimas; Pectinasa (Pectinex 167 Ultra SP), Celulasa (Celluclast 1,5 L) y β -Glucosidasa (Novozym 188) proporcionadas por Novozymes A / S (Bagsvaerd, Dinamarca). La actividad enzimática de las mismas se determinó de acuerdo con Wilkins et al, 2007b. La actividad de pectinasa fue medida como 283 unidades internacionales (UI) / mg de proteína, la de celulasa como 0,124 unidades de papel de filtro (FPU) / mg de proteína y la actividad de β -glucosidasa fue estimada como 2,6 UI / mg de sólidos indicados por el proveedor.

La hidrólisis y fermentación de las pieles de cítricos, previamente tratadas con *steam explosion*, se llevó a cabo de dos formas: a escala de laboratorio, en botellas de vidrio de 250 mL, y en un bioreactor de 5 L.

✓ Bioreactores

En el laboratorio del Departamento de Ingeniería de Alimentos y Equipamiento agrícola se dispone de dos bioreactores autoclavables de 5 L provistos de un sistema de

control Bio Controller ADI 1030 (Applikon, Schiedam, The Netherlands). En estos bioreactores se realizaron ensayos de hidrólisis y fermentación simultáneas (SSF) de las pieles pretratadas, controlando la temperatura del proceso, pH e intensidad de la agitación. Cada bioreactor dispone de una pequeña apertura con un filtro GyroVent PTT de 0,2 μm que permite la eliminación del CO_2 generado durante la fermentación.



Foto 3.5. Bioreactor de 5L provisto de sistema de control Bio Controller ADI 1030.

✓ Hidrólisis y fermentación en botellas de 250 mL (proceso SF).

Con el objetivo de ver el efecto del pretratamiento de *steam explosion* sobre la hidrólisis y fermentación de las pieles de cítricos, se hicieron ensayos con muestras frescas traídas directamente de la industria y con pieles sometidas previamente a *steam explosion*.

Las pieles frescas sin pretratamiento se colocaron en botellas de vidrio de 250 mL estériles y se les adicionó agua. Para estudiar el efecto del aceite esencial de limoneno presentes en estas pieles sobre la fermentación, se realizaron diluciones CPW: agua de 1:8, 1:4, 1:2 y 1:1. Entonces, se realizó la hidrólisis enzimática y la fermentación en procesos separados (SF). El coctel enzimático constaba de 5 mg pectina/g materia seca, 2 mg celulasa/g materia seca y 2,1 mg de β -glucosidasa/g materia seca. Estas concentraciones se utilizaron en referencia a los estudios de Wilkins et al., (2007b),

dónde se obtuvo la mayor cantidad de glucosa en la hidrólisis de pieles de cítricos no sometidas a *steam explosion*. La reacción tuvo lugar en un baño de agua a 45°C, con agitación (15 U/min), durante 24 horas. Posteriormente, la muestra se mantuvo en horno a 105°C durante 15 minutos para la inactivación enzimática y finalmente, tuvo lugar la fermentación alcohólica a 37°C (Wilkins et al., 2007b).

Por otro lado, se hizo la hidrólisis y fermentación de pieles sometidas a *steam explosion* (SF). Se añadieron 25 mL de CPW pretratadas y 100 mL de agua (CPW: agua en relación 1:4 v/v) en cada botella de vidrio de 250 mL (la concentración de materia seca fue aproximadamente 3%) y se realizó la hidrólisis con una menor dosis enzimática (según se detalla en la Tabla 3.2). De esta forma, se pretendía estudiar el efecto de esa menor concentración de pectinasa, celulasa y β -glucosidasas, conjuntamente con el pretratamiento de *steam explosion*, en el rendimiento de azúcares y etanol.

Inicialmente, la concentración enzimática se redujo en pectinasas un 30% con respecto a la concentración enzimática de referencia (REC), en celulasas un 70% con respecto a REC y en β -glucosidasas un 70% con respecto a REC (dosis enzimática 5, Tabla 3.2). A partir de ahí se hicieron reducciones de hasta 90% en celulasas y β -glucosidasas (dosis enzimática 1, Tabla 3.2). La hidrólisis tuvo lugar en un baño de agua a 45°C, con agitación (15 U/min), durante 24 horas y la inactivación enzimática a 105°C durante 15 min. La fermentación se realizó a posteriori a 37°C (Wilkins et al., 2000b).

Tabla 3.2. Dosis enzimáticas (mg proteína/ g piel seca) utilizadas en la hidrólisis, en botellas de 250 mL, de pieles de cítricos pretratadas.

| Enzimas | Dosis 1 | Dosis 2 | Dosis 3 | Dosis 4 | Dosis 5 |
|--------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|------------------------|
| Pectinex | 1,60 | 1,60 | 1,60 | 1,60 | 1,70 |
| Novozym 188 | 0,15(10%R _N) | 0,45(30%R _N) | 0,75(50%R _N) | 1,05 (70%R _N) | 1,50 (R _N) |
| Celluclast | 0,15(10%R _C) | 0,40(30%R _C) | 0,70(50%R _C) | 1,00(70%R _C) | 1,40(R _C) |

R_N = Valor de referencia de Novozym 188; R_C = valor de referencia de Celluclast

Estos mismos ensayos se repitieron usando 100 mL de pieles pretratadas y 50 mL de agua (CPW: agua en relación 2:1 v/v y concentración de materia seca de

aproximadamente 10%) y las concentraciones enzimáticas detalladas en la tabla 3.3. El objetivo de estos ensayos fue el de mejorar la rentabilidad del proceso reduciendo la cantidad de agua añadida al proceso sin que haya perjuicio en el rendimiento de etanol y otros co-productos.

Tabla 3.3. Dosis enzimáticas (mg proteína/ g piel seca) utilizadas en la hidrólisis, en botellas de 250 mL, de pieles de cítricos pretratadas.

| Enzimas | Dosis 1 | Dosis 2 | Dosis 3 |
|--------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------|
| Pectinex | 0,51 | 1,19 | 1,7 |
| Novozym 188 | 0,45(30%R _N) | 1,05(70%R _N) | 1,5(R _N) |
| Celluclast | 0,42(30%R _C) | 0,98(70% R _C) | 1,4(R _C) |

R_N = Valor de referencia de Novozym 188; R_C = valor de referencia de Celluclast



Foto 3.6. Mosto de mandarina tras el proceso de hidrólisis y fermentación (SF)

✓ Hidrólisis y fermentación simultaneas en botellas de 250 mL (proceso SSF).

Se hicieron ensayos de sacarificación y fermentación simultaneas (de acuerdo con Wilkins et al., 2007c), utilizando las concentraciones enzimáticas 1, 2 y 5 de la Tabla 3.2. En este caso, los enzimas se añaden tres horas antes de la fermentación. El proceso SSF tuvo lugar a 37°C en un baño de agua y con agitación de 15 U/min.

✓ Hidrólisis y fermentación simultánea en bioreactores de 5 L

Los ensayos realizados a escala piloto en bioreactores de 5 L, se realizaron adicionando 2,5 kg de pieles de cítricos pretratadas, diluidas en agua en proporciones CPW:agua de 2:1 w/w, equivalente a un contenido en materia seca de aproximadamente 10%.

Los enzimas se añadieron 3 horas antes de la fermentación y en concentraciones cercanas a las dosis de referencia: 2,21 mg pectinasa /g piel seca (aproximadamente el 45% de REC), 1,95 mg β -glucosidasa /g piel seca (aproximadamente el 90% de REC) y 1,82 mg celulasa /g piel seca (aproximadamente 90% de REC). El proceso de sacarificación y fermentación simultánea se llevó a cabo a 37°C y con agitación suave.

✓ Levaduras

Tanto para los ensayos de SF, como los de SSF, la fermentación fue llevada a cabo por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* CECT 1329 (de la colección de la Universidad Politécnica de Valencia, España).

Previamente, se hizo una activación de la levadura en 1 mL de agua estéril y realizando sucesivas siembras en placa con agar Sabouraud (20 g/L glucosa, 5 g/L extracto de levadura y 20 g/L agar). A partir de una colonia joven se preparó un inóculo en caldo Sabouraud que fue incubado aeróbicamente, en agitación (50 rpm) durante 24 horas a 25°C (temperatura óptima) de forma que la concentración final fuera de 10^9 UFC/mL (Wilkins et al., 2007b).

En los ensayos realizados en botellas de 250 mL el inóculo fue de 10 mL, mientras que para las pruebas a escala piloto se añadieron 400 mL al bioreactor, mediante una bomba automática peristáltica acoplada al propio equipo. En ambos casos, la concentración de *S. cerevisiae* en el mosto al inicio de la fermentación fue de 10^8 UFC/mL.

Las botellas de 250 mL se colocaron en un baño agitado a 37°C, con el tapón ligeramente abierto para eliminar el CO₂ generado durante la fermentación alcohólica.

3.3.3. Efecto del pretratamiento de steam explosion sobre las pieles de cítricos. Análisis de imágenes de microscopía electrónica de barrido.

Se tomaron imágenes de microscopía electrónica de barrido de las pieles frescas y pretratadas, con el fin de obtener información acerca del efecto de la *steam explosion* sobre la estructura y alteración celular de estas pieles (Kristensen et al., 2008).

Se hicieron cortes limpios de las pieles (frescas y pretratadas) de naranja, limón, mandarina y pomelo y se deshidrataron con CO₂ en punto crítico, en secador BAL-TEC 030 CPD. Las muestras se colocaron sobre soporte metálico y se cubrieron con una fina capa de oro en un equipo Polaron SC 7640 Sputter Coater.

Las muestras se analizaron en microscopio electrónico de barrido Hitachi S-3500 N. Para la obtención de imágenes, se utilizó un detector de electrones retrodispersados, una distancia de trabajo de 15 mm y una tensión de 15 kV.

3.4. Determinación de la CMI de compuestos inhibidores de la fermentación.

Se hizo un estudio de cinética del crecimiento, en medio selectivo caldo Sabouraud Scharlau 01-275 con oxitetraciclina Sigma (100 mg/L), de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* CECT 1329 con el fin de determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los aceites extraídos de las pieles de cítricos mediante *steam explosion*. Estos mismos ensayos se realizaron con aceites esenciales comerciales (Sigma Aldrich, SA) que se encuentran habitualmente en este tipo de pieles, como son

el aceite esencial de limoneno y algunos flavonoides (rutina, hesperidina, neohesperidina, y naringina). Las curvas de crecimiento se obtuvieron mediante un lector de microplacas Bioscreen C MBR que registraba las variaciones de absorbancia a lo largo del tiempo.

Se preparó un cultivo joven de *Saccharomyces cerevisiae* cuya concentración se determinó mediante Cámara de Neubauer. Se prepararon diluciones de los aceites esenciales (extraídos tras la *steam explosion*), del aceite esencial de limoneno y de los diferentes flavonoides en DMSO (dimetil sulfóxido) 25%, ya que éste no ofrece inhibición al crecimiento microbiano (Benelli et al., 2010).

Las distintas diluciones de los antimicrobianos se distribuyen en la microplaca. Se colocaron 10 μ L de cada una de ellas y 85 μ L de caldo Sabouraud estéril. Entonces, se inocularon 5 μ L de la suspensión de *S. cerevisiae* a una concentración de 10^6 UFC/mL.

La cinética de crecimiento sin ningún agente antimicrobiano (control), se obtuvo en celdas que contenían 85 μ L de caldo Sabouraud, 10 μ L DMSO 25% y 10 μ L del inóculo a una concentración de 10^6 UFC/mL. Además se hizo un blanco que constaba de 90 μ L de caldo Sabouraud estéril y 10 μ L DMSO 25%.

Las lecturas de absorbancia se realizaron en un amplio intervalo de longitud de onda, cada 10 minutos, durante 30 horas a 37°C. Se hicieron tres repeticiones por muestra. Las curvas de absorbancia obtenidas se modelizaron según Baranyi mediante el programa DMFit (Baranyi et al., 1993).

3.5. Caracterización de los aceites esenciales de naranja, limón, pomelo y mandarina.

Los aceites esenciales de mandarina (Mandarin oil), limón (Lemon oil, Kosher), pomelo (Grapefruit oil, Florida) y naranja (Orange oil, Kosher) fueron suministrados por Sigma-Aldrich (extraídos mediante prensado en frío) y caracterizados térmicamente, junto con los aceites extraídos por *steam explosión* de las distintas pieles de cítricos,

mediante cromatografía de gases, calorimetría diferencial de barrido y termogravimetría.

La composición de los aceites esenciales de los distintos cítricos, tanto extraídos por el pretratamiento como los aceites comerciales de Sigma-Aldrich, se determinó mediante cromatografía de gases. Para ello, 100 mg de cada compuesto se disolvieron en 25 mL de cloroformo y se analizaron en cromatógrafo GC-MS Agilent 6890 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) acoplado a un detector de masas Agilent 5975. El método de análisis comenzó con una temperatura de 60°C donde se mantuvo durante 0,5 min, después se elevó hasta 120°C con un gradiente de 3°C/min y en último lugar, hasta 240°C con gradiente de 20°C/min. Se utilizó una columna Agilent HP-5MS (30m, 0,25 mm, 0,25 μ m), el gas portador fue Helio (1 mL/min) y las temperaturas del inyector y la línea de transferencia del detector de masa fueron de 250°C y 280°C, respectivamente (Espina et al., 2011).

Todos los compuestos fueron identificados mediante las galerías NIST 05 a.L (National Institute of Standards and Technology) y Wiley 7n.1 y los resultados se mostraron como porcentaje de área de pico del cromatograma obtenido (Belletti et al., 2004).

Para los análisis de calorimetría y termogravimetría, las muestras (10 mg) se pesaron en un crisol de Aluminio de 40 μ L y se cerraron herméticamente con tapa.

El análisis calorimétrico se hizo en Calorímetro DSC822 METTLER TOLEDO (Schwerzenbach, Switzerland) usando una atmósfera inerte de Nitrógeno (flujo de 40 mL/min), un intervalo de temperaturas de -150°C a 300 °C y una velocidad de calentamiento de 10°C/min. Los crisoles eran perforados inmediatamente antes del comienzo del análisis. El crisol de referencia de 40 μ L contenía aire y entre cada muestra se realizó una limpieza del equipo (500°C durante 30 minutos) (Martins et al., 2011).

Los resultados del DSC dan información sobre la entalpía de vaporización (kJ/mol) de los distintos aceites analizados. Se trata de comparar las características de

los aceites extraídos en el pre-tratamiento de *steam explosion* con los aceites comerciales de limón, mandarina, pomelo y naranja (extraídos por prensado en frío).

Los análisis termogravimétricos se llevaron a cabo en un equipo TGA/DSC HT (Mettler-Toledo GmbH, Schwerzenbach, Switzerland) (Martins et al., 2011; Hazra et al., 2004).

Para el análisis se utilizó una atmosfera de nitrógeno de 50 mL/min. Las curvas termogravimétricas obtenidas se corrigieron frente a un blanco realizado con un crisol de aluminio vacío. Se utilizaron crisoles de aluminio de 40 μ L con tapa. Las muestras se sometieron a temperaturas de entre 30°C hasta 350°C y durante el proceso se fueron registrando los datos de peso de la muestra. Se probaron distintas velocidades de calentamiento (5,10 y 20°C/min). Para el análisis se pesaron 10 mg de los distintos aceites esenciales y se cerraron herméticamente hasta el momento justo de comienzo del análisis dónde una aguja perfora la tapa. Tras el análisis se obtuvieron las curvas TG que representa la pérdida de peso con la temperatura y la DTG (curva derivada de TG) (Chen y Chen, 2009).

Los parámetros de cinética de evaporación de los distintos aceites esenciales se determinaron mediante estas curvas de acuerdo con Zhang et al., 2009 y Martins et al., 2011 y según la ecuación:

$$d\alpha/dt = k \cdot (1-\alpha)^n$$

donde α es la cantidad de material vaporizada, n es el orden de la reacción y k es la constante cinética, dependiente de la temperatura y definida por la ecuación de Arrhenius:

$$k = A \cdot \exp(-E_a/RT)$$

siendo A el factor pre-exponencial o factor de frecuencia de la reacción, R la constante universal de los gases, T la temperatura (en Kelvin) y E_a la energía de activación.

Si hacemos logaritmos en ambos miembros de la ecuación se tiene la siguiente expresión:

$$\ln(d\alpha/dt) = [\ln A \cdot (1 - x)^n] - E_a/RT$$

Como la reacción es de orden cero ($n=0$), entonces:

$$\ln d\alpha/dt = \ln A + (- E_a/RT)$$

Representando gráficamente el $\ln (d\alpha/dt)$ frente a $1/T$ y ajustando la curva a una recta de regresión, se pueden obtener los valores de E_a/R como pendiente de la recta y $\ln A$ equivalente a la ordenada en el origen.

3.6. Análisis de la cinética de crecimiento de las levaduras durante la fermentación.

Se han descrito numerosos estudios sobre los factores que influyen en el rendimiento en la fermentación de las levaduras. Por tanto, resulta vital que aquellos que tienen un impacto negativo sobre el rendimiento en la fermentación sean sometidos a control. Entre los factores que pueden afectar a su crecimiento tenemos altos niveles de etanol, estrés debido a la presión osmótica elevada consecuencia de las altas concentraciones de azúcares, densidad del mosto, etc. Se han realizado recuentos microbiológicos de *S. cerevisiae* durante el curso de la fermentación de las pieles de cítricos pretratadas.

El conteo del número de células viables se realizó tomando 1 mL cada 24 horas de la muestra. Se hicieron diluciones seriadas con agua de peptona estéril y se sembraron en placa Petri en agar Saboraud Scharlau con oxitretraciclina Sigma (100 mg/L). Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 horas y se cuantificaron en unidades formadoras de colonias (UFC)/ mL.

3.7. Análisis estadístico.

Todos los resultados se analizaron usando el programa STATGRAPHICS Plus. Se realizó análisis de varianza (ANOVA) considerando diferencias significativas con $P < 0,05$.

PARTE III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 4

Obtención de bioetanol y co-productos de las cortezas y pulpas de mandarina

Parte del texto de este Capítulo ha sido publicado en los trabajos:

- Boluda-Aguilar M, García-Vidal L, González-Castañeda FP, López-Gómez A (2010). Mandarin peel wastes pretreatment with *steam explosion* for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 101: 3506–3513.
- Boluda-Aguilar, M., Belisario-Sánchez, Y.Y., López-Gómez, A (2010). Modified *steam explosion* process for pre-treatment of citrus peel wastes. En: FITO, P., TOLDRA, F. (Eds.), *Food Innova 2010*. ISBN 978-84-693-5010-2, Valencia, España.

4.1. Introducción

La mandarina es el segundo cítrico en importancia destinado a la producción de zumos. El zumo de mandarina se produce principalmente en España y China, siendo la producción mundial de zumo de 1,5 millones de toneladas. Concretamente en España, la producción media de desechos procedentes de esta industria es de 150.000 toneladas. Además, se espera un crecimiento de este tipo de productos en los próximos años que hace necesaria la búsqueda de alternativas de uso de estos subproductos (Beltrán et al., 2008).

El uso de cortezas de mandarina como biomasa para la producción de bioetanol resulta de gran interés, ya que se trata de un material lignocelulósico rico en carbohidratos, al igual que otras materias primas estudiadas (ver Tabla 2.3) (Marín et al., 2007; Mielenz et al., 2009). Sin embargo, los trabajos realizados hasta ahora sobre aprovechamiento de corteza de mandarina se centran en su uso como sustrato para la producción de preparados multienzimáticos (Mamma et al., 2008; Adeleke et al., 2012) y como fuente de fibras funcionales (Marín et al., 2007) y aceites esenciales (Viuda-Martos et al., 2008; Chutia et al., 2009).

4.2. Influencia del pretratamiento de *steam explosion* sobre la composición de las cortezas de mandarina

Para todos los cítricos, se realizaron pruebas de *steam explosion* a 4-6 bar (abs) frente a un vacío de 100 mbar y frente a condiciones ambientales en un tanque unido a un refrigerador/condensador (con agua fría a 2°C). No se vieron diferencias significativas entre estos dos tipos de tratamientos en cuanto al contenido residual de D-limoneno de las muestras de cítricos pretratadas. Se logró una recuperación de D-limoneno en torno al 90%. Estos resultados coinciden con los trabajos de Rezzoug y Louka (2009) que estudiaron distintos procesos termomecánicos para la extracción de los aceites esenciales de cortezas de naranjas, y que consistían en someter la piel de naranja durante un corto periodo de tiempo a presión de vapor, seguida de una descompresión instantánea frente a un vacío de 50 mbar. En este caso las condiciones

óptimas de proceso seleccionadas fueron presión de vapor de 6,6 bar y tiempo del proceso de 3,68 minutos, de forma que se obtenía un rendimiento de recuperación de aceites en la corteza cercano al 99%.

En cuanto a la realización del pretratamiento en condiciones secas (sin adición de agua a la biomasa tratada) o con cierto grado de humedad (con adición de agua a la biomasa), se observaron diferencias en la cantidad de D-limoneno extraído durante el proceso, y sucedió así para todos los cítricos probados. Cuando el tratamiento se realizó en seco el contenido residual de D-limoneno fue de más de 0,09% (v/v), mientras que en condiciones de humedad este contenido residual fue inferior a 0,05% (v/v).

El objetivo principal del estudio del efecto del pretratamiento *steam explosion* sobre las cortezas de cítricos fue conocer el nivel de ruptura de las paredes celulares y comprobar que existe una mejora de la accesibilidad de los enzimas a los polisacáridos que componen esta biomasa. Para ello, se determinó la producción de azúcares y etanol durante el proceso SF y SSF de las cortezas previamente sometidas a *steam explosion*. Además, se estudió la eficiencia de extracción de los aceites esenciales presentes en la corteza mediante este pre-tratamiento, y se analizó en qué medida estos aceites residuales en la biomasa pueden resultar inhibidores de la fermentación (Wilkins et al., 2007c; Wilkins 2009).

Las Fotos 4.1 y 4.2 muestran las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, *Scanning Electron Microscopy*) de pieles de mandarina antes y después de sufrir el pretratamiento de *steam explosion*. En las Fotos 4.1, referentes a cortezas frescas de mandarina, se pueden ver las células intactas junto con las glándulas oleíferas (donde se alojan los aceites esenciales). Tras el tratamiento, las glándulas y las paredes celulares se rompen, liberando los aceites y los azúcares simples (Fotos 4.2). Además, en la Foto 4.2.B se pueden ver las fibras de celulosa separadas tras el tratamiento, que posteriormente serán hidrolizadas por los enzimas celulasas y β -glucosidasas.

Mediante el pretratamiento de *steam explosion* se produce la liberación y separación parcial de fibras, así como la eliminación de hemicelulosa y re-localización

de la lignina, factores fundamentales en el aumento de la digestibilidad enzimática de la biomasa. Esto tiene gran interés en la determinación de la cantidad óptima de enzimas necesarias para la hidrólisis de material pretratado con el fin de reducir el costo económico y aumentar al máximo la rentabilidad del proceso. La disminución de la dosis enzimática es uno de los aspectos más importantes para conseguir la justificación económica de este proceso (Wilkins et al., 2007c).

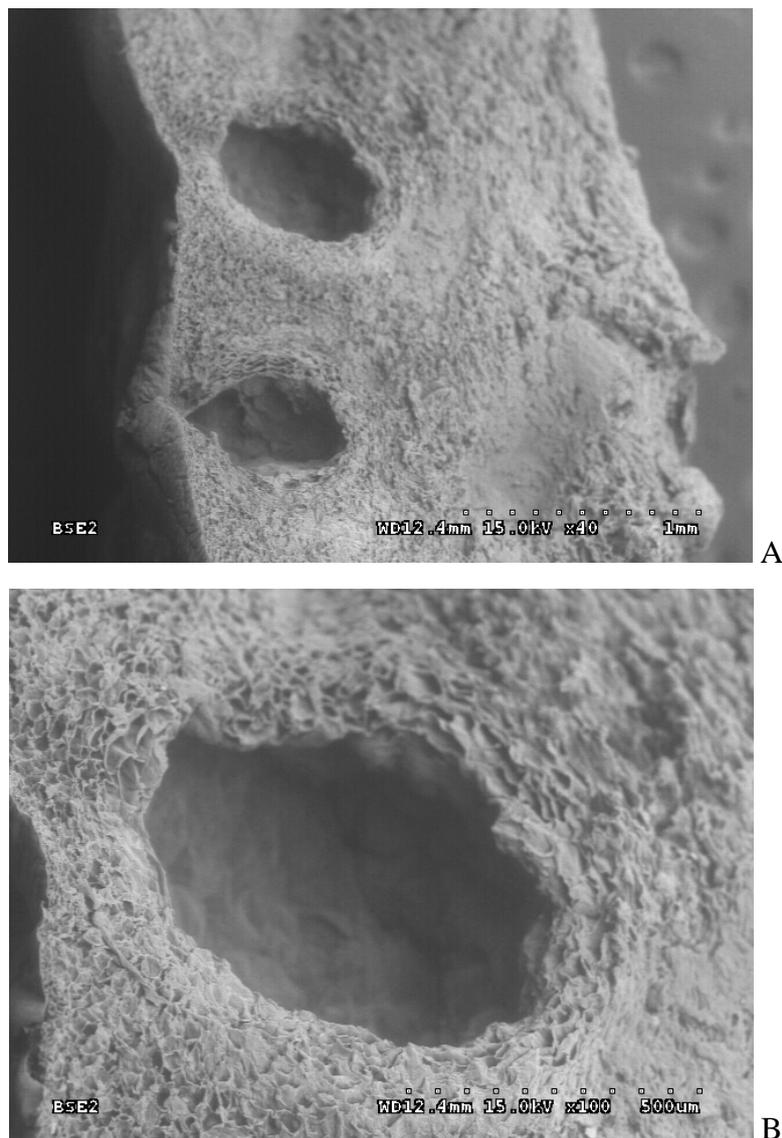


Foto 4.1. Imágenes SEM de cortezas frescas de mandarina sin pretratamiento de *steam explosion*. Paredes celulares y glándulas oleíferas intactas.

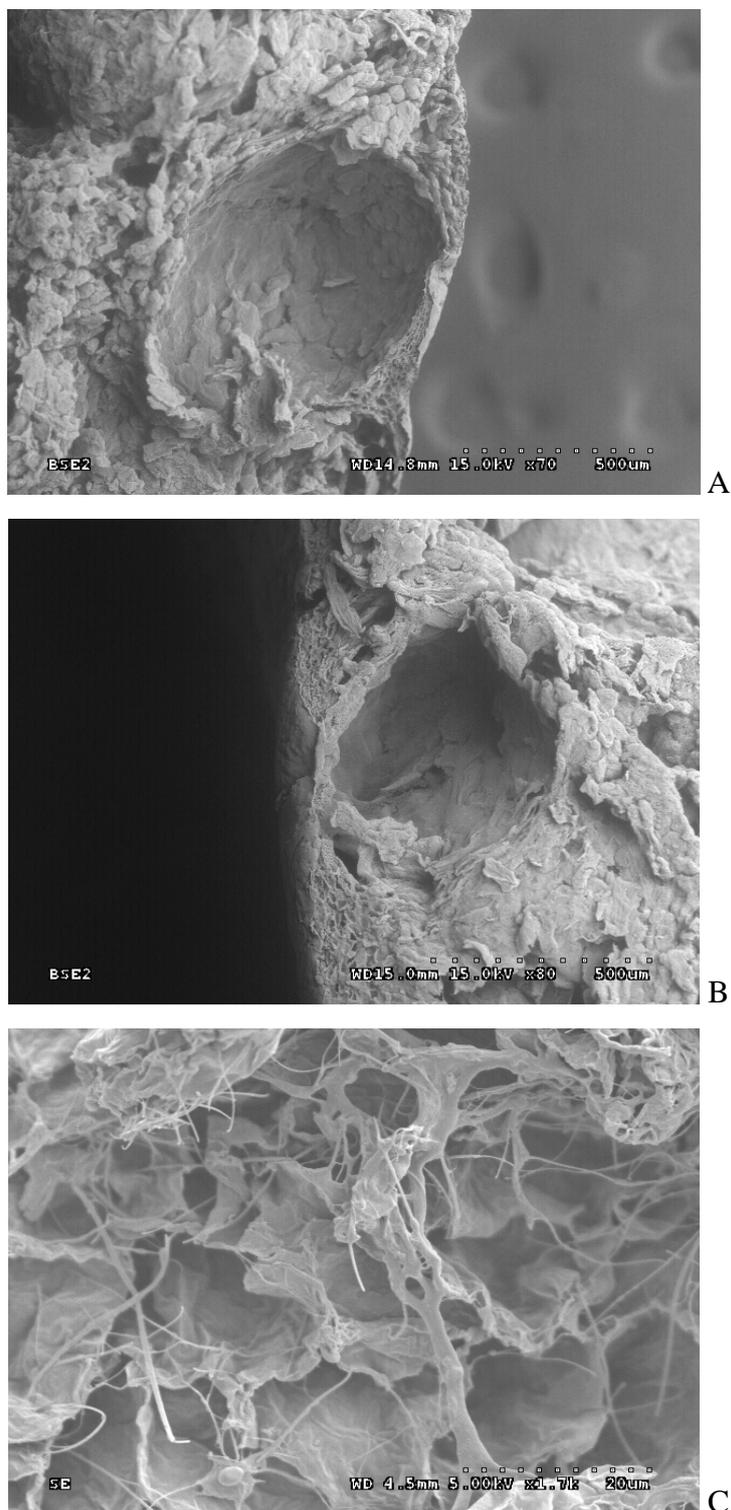


Foto 4.2. Imágenes SEM de cortezas de mandarina pretratadas con *steam explosion*. Ruptura de las paredes celulares y glándulas oleíferas (imágenes A y B) y aparición de fibras de celulosa separadas (imagen C)

Los resultados obtenidos en el análisis termogravimétrico de cortezas frescas de mandarina pretratadas y del producto final resultante tras la fermentación (CPP), se muestran en la Figura 4.1. Como se describe en Chen y Chen (2009), la pérdida de peso durante el análisis termogravimétrico de las cortezas sucede en un amplio rango de temperatura, con un descenso pronunciado en el intervalo de 150-400 °C. En la curva derivada de la pérdida de peso (curva DTG) se observan 4 picos máximos, dentro de este intervalo de temperaturas, que determinan los distintos componentes presentes en la biomasa. Se observa un primer pico a 95°C, el cual es atribuido a la pérdida de agua (~5,0 % pf). Las pérdidas de peso observadas a las temperaturas de 196°C (13% pf), 231°C (18% pf) y 335°C (20% pf), se relacionan con la descomposición de la pectina, la hemicelulosa y la celulosa de las corteza fresca de mandarina, respectivamente (Chen y Chen, 2009). Estos valores de temperatura son inferiores a los descritos por Einhorn-Stoll y Kunzek (2009) para la pectina (210-270°C), y también a los de Yang et al., (2007) para la hemicelulosa (268°C) y la celulosa (355°C).

Según Aguiar et al. (2008), la descomposición de la celulosa se completa alrededor de los 360°C, la hemicelulosa entre 200 y 260°C (aunque la mayor parte sucede por debajo de 180°C), la lignina entre 280°C y 500°C, y la descomposición de la pectina se completa a los 400°C.

Observando las curvas obtenidas para mandarina pretratada con *steam explosion* se pone de manifiesto que la hemicelulosa está compuesta por dos fracciones distintas que se degradan separadamente a 228 y 245°C, respectivamente. De acuerdo con Sun et al. (2005), esto se debe a que la fracción de la hemicelulosa ya degradada durante el pretratamiento de *steam explosion* (aproximadamente el 50%) tiene una mayor estabilidad térmica que la fracción no degradada. La razón por la que aumenta la estabilidad térmica de este polímero se debe probablemente a la generación de sustancias a partir de la hemicelulosa degradada, dando lugar a un residuo recalcitrante que requiere temperaturas superiores para la descomposición completa (Sun et al., 2005).

De las curvas TG/DTG se obtuvo la composición aproximada de las cortezas frescas de mandarina, mandarina pretratada y del residuo de la fermentación (CPP) que

se detalla en la Tabla 4.1. La degradación de la celulosa y la lignina no parece significativa si se comparan las curvas TG/DTG de las cortezas frescas de mandarina con las pretratadas con *steam explosion*. Además, se puede observar que el residuo resultante tras la hidrólisis y fermentación aún es rico en polisacáridos. La composición aproximada de estos CPP fue de 3% pf de humedad, 9% pf de pectina, 17% de hemicelulosa, 27% pf de celulosa, 13% pf de lignina y 4% pf de cenizas.

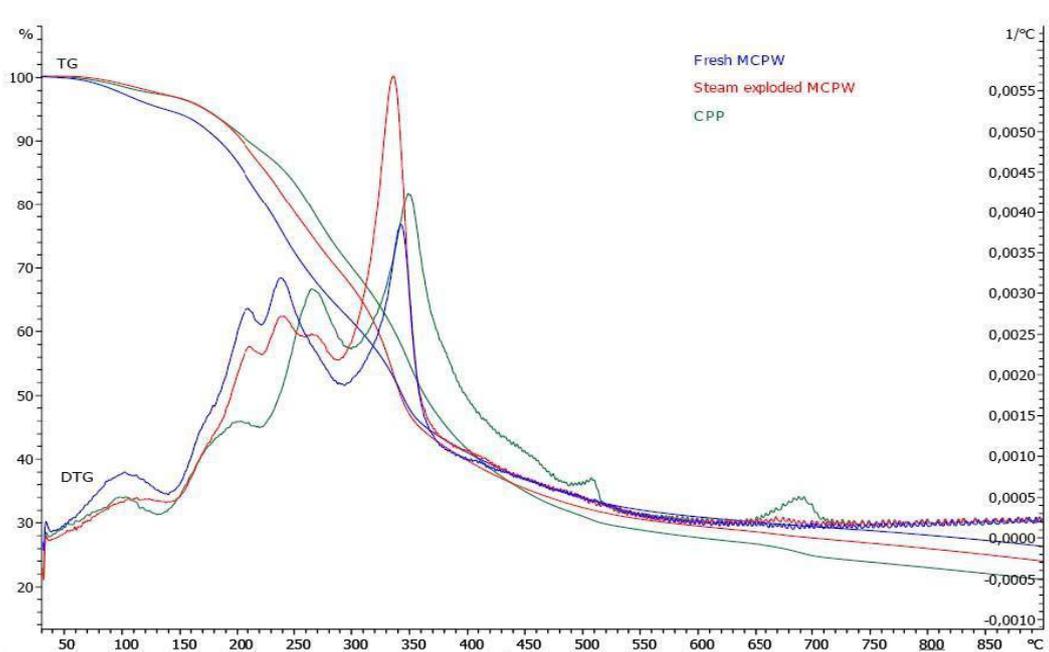


Figura 4.1. Curvas TG-DTG de muestras de cortezas frescas de mandarina, de cortezas pretratadas mediante *steam explosion* y del CPP obtenido tras la fermentación

Tabla 4.1. Composición de las cortezas frescas de mandarina, tras el pretratamiento de *steam explosion* y tras la hidrólisis y fermentación simultáneas (CPP)

| | Agua (% pf) | Pectina (% pf) | Hemicelulosa a(% pf) | Hemicelulosa b (% pf) | Celulosa (% pf) | Lignina (% pf) | Carbón (% pf) | Cenizas (% pf) |
|---------------------------|-------------|----------------|----------------------|-----------------------|-----------------|----------------|---------------|----------------|
| CPW mandarina fresca | 5,57±0,03 | 13,48±1,08 | 18,18±1,45 | 0,00±0,00 | 20,44±0,50 | 9±0,14 | 23,09±0,15 | 3,1±0,08 |
| CPW mandarina pre-tratada | 5,22±1,49 | 14,32±2,29 | 9,52±5,28 | 9,71±3,43 | 20,55±5,30 | 9,46±0,16 | 20,92±0,80 | 3,14±0,74 |
| CPP | 2,71±0,70 | 9,24±0,96 | 16,92±1,23 | 0,00±0,00 | 27,17±2,89 | 13,58±1,77 | 16,61±2,34 | 4,49±0,45 |

4.3. Influencia del pretratamiento de *steam explosion* sobre la producción de azúcares en la hidrólisis enzimática de cortezas de mandarina.

La hidrólisis enzimática de cortezas de mandarina, muestreadas directamente de la industria de zumos, sin ningún pretratamiento y diluidas en agua en distintas proporciones, da lugar a la producción de azúcares que se muestra en la Tabla 4.2. Se observa que las distintas proporciones CPW:agua utilizadas no influyen en el proceso de hidrólisis, ya que no se observan diferencias significativas en la concentración de azúcares resultantes de la misma. El contenido en azúcares fermentables, después de 24 horas de hidrólisis (con dosis enzimática REC), fue de entre $22,64 \pm 4,04$ y $28,48 \pm 3,21$ g de azúcar/ 100 g ps.

La Tabla 4.3 muestra la producción de azúcares que se obtuvo tras la hidrólisis enzimática de cortezas de mandarina pretratadas con *steam explosion* (siendo la dilución CPW: agua de 1:4 v/v, es decir, 25 mL de MCPW pretratada con 100 mL de agua) y usando las dosis enzimáticas detalladas en la Tabla 3.2. Se obtuvieron azúcares fermentables en concentraciones de entre $28,34 \pm 2,23$ y $32,38 \pm 0,91$ g/100 g de piel seca, y entre $46,65 \pm 2,69$ y $49,22 \pm 1,35$ g/100 g de piel seca si se consideran los azúcares totales. Estos valores son mayores que los obtenidos en la hidrólisis de cortezas de mandarina no pretratadas con *steam explosion* y con dosis enzimáticas superiores (dosis REC) (ver Tabla 4.2).

La producción de azúcares fue similar a la obtenida por Wilkins et al. (2007b) utilizando cortezas de pomelo no sometidas a *steam explosion* y realizando la hidrólisis enzimática con dosis enzimáticas superiores (la dosis de referencia, REC). En este caso, el contenido en azúcares fermentables fue de $38,55$ g/100 gramos de piel seca ($15,09 \pm 1,45$ g de fructosa, $22,14 \pm 0,41$ g de glucosa y $1,32 \pm 0,28$ g de sacarosa, por 100 g de piel seca).

La Tabla 4.3, muestra la baja influencia de las concentraciones de celulasa y β -glucosidasa en la producción final de azúcares, no observándose diferencias significativas entre las distintas dosis utilizadas.

La producción de azúcares después de 3 horas de hidrólisis enzimática de cortezas pretratadas de mandarina, cuando se lleva a cabo un proceso SSF y utilizando concentraciones enzimáticas cercanas a las de referencia (45% REC en pectinasa, 90% REC en β -glucosidasa y 90% REC en celulasa), en botellas de 250 mL (diluciones CPW: agua de 2:1 v/v) fue de $32,18 \pm 2,3$ g de azúcares fermentables y $46,52 \pm 1,9$ g de azúcares totales/100 g de piel seca.

Sin embargo, cuando se hizo este mismo proceso en bioreactor de 5 L, la concentración de azúcares fue de 46,88 g de azúcares fermentables y 61,7 g de azúcares totales/100 g de piel seca. En este caso, los rendimientos de azúcar, usando incluso dosis enzimáticas inferiores a la dosis REC, son superiores a los obtenidos en los ensayos previos con mandarina pretratada y con proceso SF. Estos resultados también fueron superiores a los obtenidos por Wilkins et al. (2007b) mediante el procesado SF de cortezas de pomelo no pretratadas. También, son superiores a los observados por Talebnia et al., (2008) en la hidrólisis (en condiciones óptimas de pH y temperatura) de cortezas de naranja no pretratadas.

Tabla 4.2. Producción de azúcares después de 24 horas de hidrólisis enzimática (dosis enzimática REC) de cortezas frescas de mandarina sin pretratamiento de *steam explosion*, y usando el proceso SF, y distintas diluciones CPW:agua, en botellas de vidrio de 250 mL.

| Dilución (MCPW:agua, v/v) | GA ¹ | RAM ¹ | ARA ¹ | GLUC ¹ | GAL ¹ | XYL ¹ | FRUC ¹ | SUCR ¹ | FS ² | TS ³ | D-limoneno (% v/v) |
|---------------------------|-----------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------------|
| 1:8 | 11,45 (0,48)a | 0,24 (0,17)ab | 2,63 (0,01)a | 12,36 (0,34)a | 2,84 (0,07)a | 0,68 (0,03)a | 12,13(4,18)ab | 0,27 (0,18)a | 24,77 (2,87)a | 42,28 (3,46)a | 0,0361 |
| 1:4 | 10,86 (1,33)a | 0,20 (0,01)a | 2,59 (0,48)ab | 13,38 (048)a | 2,25 (0,40)b | 0,63 (0,12)ac | 14,94 (3,47)ab | 0,15 (0,01)a | 28,48 (3,21)a | 45,04 (3,22)a | 0,065 |
| 1:2 | 12,45 (1,10)ab | 0,21 (0,07)ab | 2,19 (0,50)a | 11,13 (0,33)a | 1,50 (0,10)c | 0,42 (0,02)b | 11,23 (1,81)a | 0,27 (0,23)a | 22,64 (4,04)a | 39,43 (5,79)a | 0,108 |
| 1:1 | 12,87 (0,01)b | 0,28 (0,04)b | 2,88 (0,04)b | 13,41 (0,43)a | 1,74 (0,00)c | 0,54 (0,00)c | 14,06 (0,42)b | 0,21 (0,00)a | 27,69 (0,85)a | 46,01 (0,82)a | 0,163 |

Media con desviación estándar entre paréntesis.

¹ Azúcares producidos tras la hidrólisis; GA-ác. Galacturónico, RAM- ramosa, ARA- arabinosa, GLUC-glucosa, GAL-galactosa, XYL-xilosa, FRUC-fructosa, SUCR-sacarosa.

²FS: azúcares fermentables

³TS: azúcares totales en g/ 100 g de corteza seca.

Tabla 4.3. Producción de azúcares después de 24 horas de hidrólisis enzimática de cortezas de mandarina pretratadas por *steam explosion* (CPW: agua, 1:4).
v/v)

| Dosis enzimática | GA ¹ | RAM ¹ | ARA ¹ | GLUC ¹ | GAL ¹ | XYL ¹ | FRUC ¹ | SUCR ¹ | FS ² | TS ³ |
|------------------|-----------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| Dosis 1 | 9,48(0,89)a | 0,44(0,07)a | 4,30(0,46)a | 12,73(1,30)a | 3,40(0,35)a | 0,70(0,07)a | 12,85(1,3)a | 2,75(0,36)a | 28,34(2,23)a | 46,65(2,69)a |
| Dosis 2 | 11,68(0,27)b | 0,2(0,05)b | 2,49(0,08)b | 14,8(0,05)b | 2,49(0,04)b | 0,52(0,02)b | 16,96(0,06)b | 0,35(0,03)b | 32,17(0,10)b | 49,56(0,44)b |
| Dosis 3 | 11,42(0,18)b | 0,2(0,05)b | 2,15(0,12)b | 14,98(0,79)b | 2,56(0,07)b | 0,49(0,03)b | 16,18(0,18)b | 1,2(0,06)c | 32,38(0,91)c | 49,22(1,35)b |
| Dosis 4 | 9,97(0,94)a | 0,16(0,03)b | 2,18(0,72)b | 15,34(2,23)b | 2,64(0,43)b | 0,547(0,12)b | 10,62(1,15)ab | 2,69(0,82)d | 30,13 (0,02)a | 44,16(1,00)a |

Media con desviación estándar entre paréntesis.

¹ Azúcares producidos tras la hidrólisis; GA-ác. Galacturónico, RAM- ramnosa, ARA- arabinosa, GLUC-glucosa, GAL-galactosa, XYL-xilosa, FRUC-fructosa, SUCR-sacarosa.

²FS: azúcares fermentables

³TS: azúcares totales en g/ 100 g de corteza seca.

4.4. Influencia del pretratamiento de *steam explosion* sobre la producción de etanol y otros co-productos de cortezas de mandarina.

La hidrólisis de cortezas frescas de mandarina, sin ser sometidas a *steam explosion*, tenían un contenido inicial en aceites esenciales de 0,3-0,4% (v/v). Tras la realización del pretratamiento de *steam explosion*, ese contenido disminuyó a una concentración de 0,02-0,05% (v/v).

En todos los ensayos que se realizaron con mandarinas pretratadas mediante *steam explosion*, tanto con proceso SF como con SSF, la concentración de aceites esenciales fue inferior a 0,05% (v/v). Este contenido equivale a una concentración mínima inhibitoria por debajo de la cual no hay efecto de inhibición en el desarrollo de la fermentación (Wilkins, 2009). El control del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación, describió una cinética similar a la obtenida por Pourbafrani et al. (2007) con concentraciones de D-limoneno de 0,054%. En principio, no se observó inhibición de la fermentación como consecuencia de la presencia de aceites esenciales (D-limoneno), furfural o hidroximetilfurfural, puesto que la concentración de *S. cerevisiae* se mantuvo durante toda la fermentación por encima de 10^7 UFC/mL.

El etanol obtenido, tanto mediante el proceso SF como con el SSF, y llevando a cabo los ensayos en botellas de vidrio de 250 mL, se muestra en la Tabla 4.4. De estos resultados se deduce que la tecnología utilizada, en el proceso de hidrólisis y fermentación de cortezas de mandarina pretratadas con *steam explosion*, es un factor que influye en el rendimiento de etanol. Sin embargo, la dosis enzimática utilizada para la hidrólisis no afecta al rendimiento en etanol cuando se trata de un proceso SSF. No se observó una mayor producción con dosis enzimáticas superiores (Ver Tabla 4.4).

En el caso del proceso SF, no existe relación directa entre la dosis enzimática y la producción de etanol. Cuando se utilizó la dosis enzimática más alta (Dosis 5) la producción de etanol fue superior al resto, alcanzando un rendimiento de 58,55 L de etanol/1000 kg MCPW fresca. Sin embargo, cuando la dosis enzimática fue inferior (dosis 2, 3 y 4) la producción de etanol fue aproximadamente la misma (entre 30 y 40

L/1000 kg MCPW fresca) (Tabla 4.4). La producción de etanol en el caso de la menor dosis enzimática (dosis 1) fue de $46,1 \pm 4,4$ L/1000 kg MCPW fresca. Este rendimiento es superior al obtenido por otros autores (del orden de 36 L/1000 kg MCPW fresca) a partir de cortezas de pomelo (sin tratamiento previo) y sometidas a un proceso SF con dosis enzimáticas superiores (Wilkins et al., 2007b).

Se repitieron los ensayos de procesado SF, pero reduciendo más la cantidad de pectinasa añadida (Tabla 3.3) y disminuyendo el contenido en agua necesario para llevar a cabo el proceso (con diluciones MCPW: agua, 2:1, v/v). La producción de etanol que se obtuvo se muestra en la Figura 4.5. No se observaron diferencias significativas en el rendimiento de etanol entre las distintas dosis enzimáticas probadas, alcanzándose valores de $46,67 \pm 0,72$ L / 1000 kg MCPW fresca, similares a los obtenidos anteriormente con dosis que incluyen mayores cantidades de pectinasa, pero menores en celulasa y β -glucosidasa (dosis enzimática 1, Tabla 3.2).

Cuando se llevó a cabo la hidrólisis y fermentación simultáneas, hubo una mejora del rendimiento en la producción de etanol, independientemente de la dosis enzimática utilizada. Se tuvo una producción de $59,26 \pm 3,56$ L etanol / 1000 kg MCPW fresca con la dosis enzimática más alta (dosis enzimática 5, Tabla 3.2) y $54,63 \pm 4,15$ L etanol / 1000 kg MCPW fresca cuando se redujo la celulasa y la β -glucosidasa al 90% (dosis enzimática 1, Tabla 3.2). Es por tanto evidente que el proceso SSF mejora la producción de etanol frente al proceso SF para una misma concentración enzimática (en este último caso se obtienen $46,1 \pm 4,40$ L etanol / 1000 kg MCPW fresca).

Otro aspecto a destacar, es la cantidad de residuo (CPP) obtenido tras la fermentación. En la Figura 4.2 se observa que con las dosis enzimáticas donde se obtiene el mayor rendimiento en etanol también se tienen mayores cantidades de CPP (dosis 1 y 5). En estos casos se tuvieron cantidades de CPP de aproximadamente 80 kg CPP / 1000 kg MCPW fresca, valores que son superiores a los obtenidos con las dosis 2, 3 y 4 (que llegan a ser de 35 kg CPP/ 1000 kg MCPW fresca).

Utilizando una misma concentración enzimática, el proceso SSF produce mejores rendimientos de etanol, aunque en detrimento de la producción de CPP. La

producción de CPP, en el caso de hidrólisis con la dosis enzimática 5, fue de 35,33 kg/ 1000 kg MCPW fresca, frente a los 80 kg / 1000 kg MCPW conseguidos en el caso del proceso SF.

La recuperación del ácido galacturónico y de los otros coproductos es muy importante en la justificación económica del proceso de obtención de bioetanol a partir de los subproductos cítricos. La tecnología necesaria para la recuperación de este compuesto, mediante electrodiálisis, se describe en los trabajos de Molnár et al., (2009). En la Figura 4.3 se ve la influencia de la concentración enzimática en la producción final de ácido galacturónico, tras un proceso SF y después de 24 horas de hidrólisis. Existe una relación directa entre la cantidad obtenida de ácido galacturónico y la concentración enzimática utilizada en la hidrólisis. En las pruebas realizadas con dosis enzimáticas 1 y 2, la producción de ácido galacturónico fue próxima a 20 kg/ 1000 kg MCPW fresca.

Tabla 4.4. Producción de etanol (L etanol /1000 kg CPW de mandarina) utilizando los procesos SF y SSF con mandarina pretratada (con diluciones de 1:4 v/v), usando diferentes dosis enzimáticas, y botellas de vidrio de 250 mL.

| Dosis enzimática | Proceso HF | Proceso SSF |
|------------------|-------------|-------------|
| Dosis 1 | 46,1±4,4a | 54,63±4,15 |
| Dosis 2 | 41,13±0,5ab | 57,59±3,42 |
| Dosis 3 | 35,52±2,64b | nd |
| Dosis 4 | 32,25±1,98b | nd |
| Dosis 5 | 58,55±1.03c | 59,26±2,4 |

Media (n=3) con su desviación típica.
 Los datos con una misma letra no tienen diferencias significativas, siendo $p \leq 0,05$.
 Nd: no existen datos

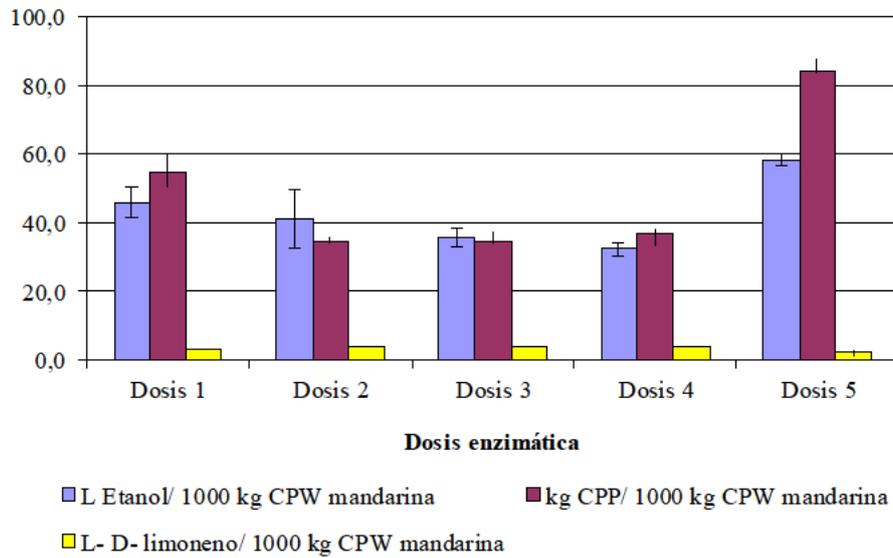


Figura 4.2. Etanol y coproductos obtenidos tras el procesado SF de mandarina pretratada (con diluciones CPW:agua de 1:4 v/v), usando diferentes concentraciones enzimáticas de Pectinex, Celluclast y Novozyme.

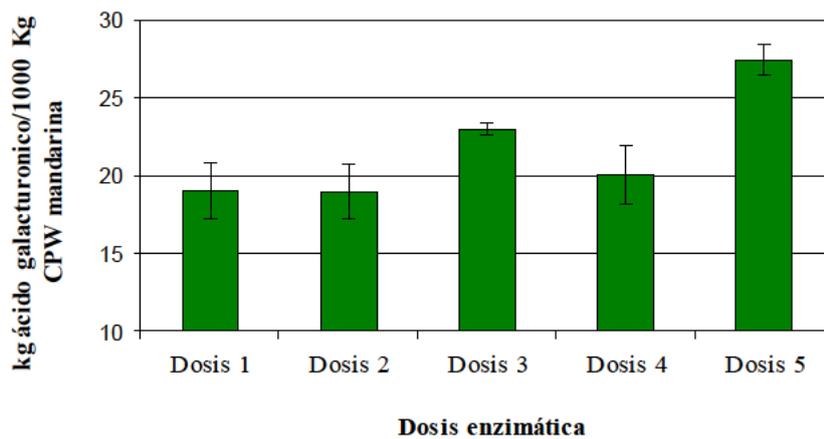


Figura 4.3. Producción de ácido galacturónico (kg/ 1000 kg CPW mandarina), obtenida después de la hidrólisis enzimática, con distintas concentraciones enzimáticas, y usando pieles de mandarina pretratada mediante *steam explosion* (con diluciones CPW:agua de 1:4 v/v).

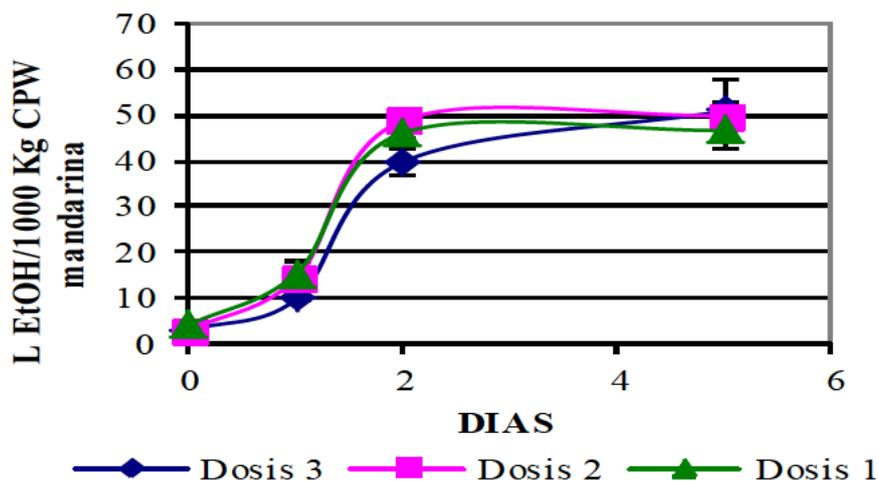


Figura 4.4. Curvas de producción de etanol (en L/1000 kg CPW mandarina) obtenidas tras el procesado SF de pieles de mandarina pretratada (con diluciones CPW: agua de 2:1 v/v), usando distintas dosis enzimáticas, y botellas de vidrio de 250 mL. Las dosis enzimáticas utilizadas (mg proteína/mg corteza seca) se corresponden con las detalladas en la Tabla 3.3.

4.5. Producción de bioetanol con cortezas y pulpas de mandarina a escala piloto en bioreactor.

Las cortezas de mandarina, procedentes de la industria de zumos de la Región de Murcia, tenían un contenido aproximado de materia seca de $20,86 \pm 0,48\%$ (en base húmeda), y un contenido en aceite esencial de D-limoneno, tras someterlas al pretratamiento de *steam explosion*, de 0,02-0,05% (v/v).

La Figura 4.5 muestra la producción de etanol en bioreactores de 5 L y botellas de vidrio de 250 mL, a partir de cortezas de mandarina pretratadas, en el caso de un proceso SSF (a 37°C) y llevado a cabo con una dilución MCPW: agua de 2:1 v/v. Se consiguió una producción máxima de unos 60 L/1000 kg de MCPW fresca a los 5 días en bioreactores de 5 L y un poco inferior cuando el proceso se hizo en botellas de 250 mL (50 L/1000 kg MCPW fresca). En estas condiciones, tras el proceso de SSF, se tuvo

un residuo de 25-28 kg CPP / 1000 kg MCPW fresca en el bioreactor de 5 L y de 40 kg CPP / 1000 kg MCPW fresca en botellas de 250 mL.

Es interesante comparar los resultados obtenidos con el proceso de SSF frente a los obtenidos con el proceso SF, ya que la cantidad de CPP obtenidos en este último resulta el doble que para el proceso simultáneo. Este hecho puede ser debido a un posible efecto inhibitor de la glucosa sobre el proceso de sacarificación en el proceso SF, y una menor dilución del contenido en materia seca.

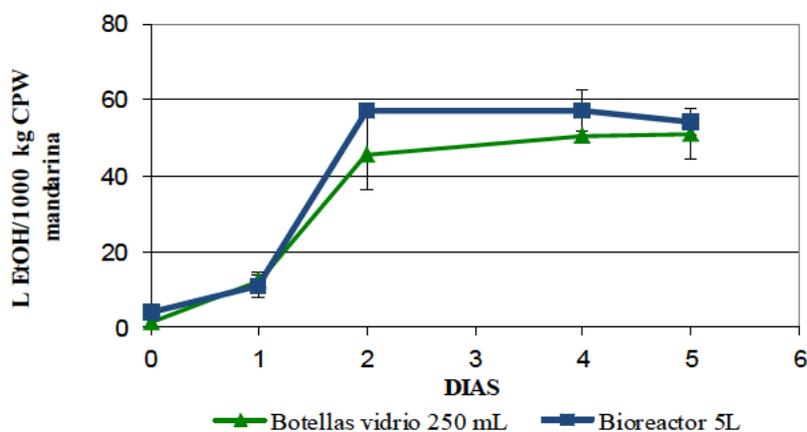


Figura 4.5. Curvas de producción de etanol (en L/1000 kg CPW mandarina) obtenidas tras el procesado SSF de pieles de mandarina pretratada (con diluciones CPW: agua de 2:1 v/v), en bioreactores de 5L y botellas de 250 mL. Las dosis enzimáticas utilizadas (mg proteína/mg corteza seca) fueron: 2,21 mg pectinasa, 1,95 mg β -glucosidasa y 1,82 mg celulasa.

4.6. Influencia del contenido en aceites esenciales de las cortezas de mandarina en la producción de azúcares y etanol

Los aceites esenciales presentes en las cortezas de cítricos, y más concretamente el aceite esencial D-limoneno, con conocido carácter antimicrobiano, pueden resultar inhibidores de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* durante el desarrollo de la fermentación. Esto se debe principalmente a la capacidad de estos aceites esenciales de provocar la ruptura de las paredes celulares de las levaduras y alterar la cadena de transferencia de los iones H^+ y K^+ durante la glicolisis (Viuda-Martos et al., 2008; Chutia et al., 2009; Pourbafrani et al., 2007; Wilkins, 2009).

En la Figura 4.6 se muestra el etanol producido, a partir de cortezas de mandarina no pretratadas mediante *steam explosion*, en función la concentración en aceites esenciales. Se observó que existía una disminución en la producción de etanol cuando las concentraciones de los aceites eran iguales o superiores a 0,1% (v/w). Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos en otros trabajos realizados con cortezas de naranja (Grohmann et al., 1995a). Otros estudios previos de otros autores también han puesto de manifiesto que las concentraciones de entre 0,05 y 0,15% (v/w) provocan inhibición del crecimiento microbiano (Grohmann et al., 1994; Wilkins et al., 2007c; Wilkins 2009).

Si la concentración de aceites esenciales supera el 0,16% (v/w), la fermentación se inhibe completamente y no hay producción de etanol. Por debajo de esta concentración, se observa un valor óptimo (del 0,065% v/w) dónde la producción es máxima. Wilkins et al., (2007c) obtuvieron resultados similares con concentraciones de D-limoneno de 0,08% (v/w). Utilizando cortezas de mandarina no pretratadas, se obtuvo un rendimiento en etanol de alrededor de 74 L / 1000 kg de MCPW cuando la concentración de aceites esenciales fue de 0,065% v/w y la dosis enzimática utilizada fue la dosis de referencia (REC). Este rendimiento en etanol es superior al obtenido en los ensayos de hidrólisis y fermentación de cortezas de mandarina pretratadas, por lo que se puede decir que el pretratamiento de *steam explosion* no mejora la producción de etanol. Sin embargo, se han obtenido rendimientos bastante elevados mediante la hidrólisis y fermentación simultánea de cortezas pretratadas (alrededor de 60 L/1000 kg CPW) y con reducciones de la dosis enzimática recomendada de hasta un 90%. Por tanto, el pretratamiento no mejora la producción de etanol, pero si hace que el proceso sea más rentable económicamente.

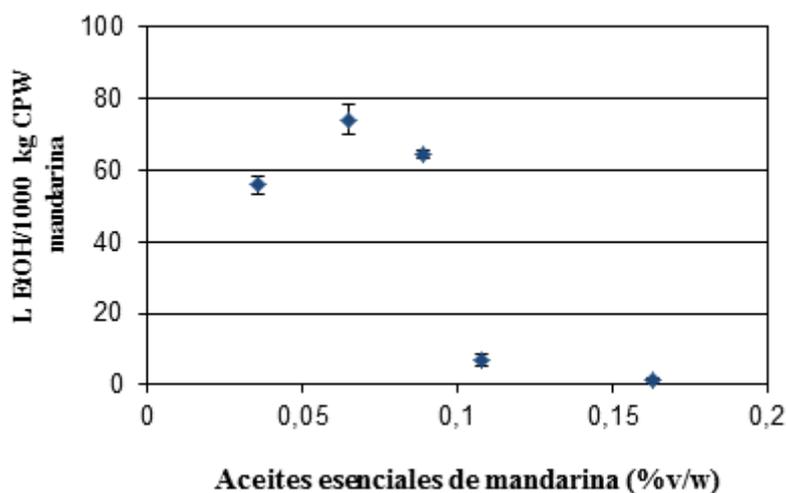


Figura 4.6. Influencia del contenido en aceites esenciales en la fermentación de pieles de mandarina no pretratada con *steam explosion*, sobre la producción de etanol (L/1000 kg CPW mandarina), y usando un proceso SF.

4.7. Conclusiones

El pretratamiento *steam explosion* provoca la ruptura de las paredes celulares de cortezas de mandarina procedentes de la industria de zumos, facilitando el acceso de los enzimas a los polisacáridos y eliminando de forma eficaz los aceites esenciales presentes que tienen un efecto inhibitorio de la fermentación alcohólica.

El pretratamiento *steam explosion* permite separar y recuperar los aceites esenciales presentes en la cortezas de cítricos, de forma que no inhiban la fermentación, y además, permite la obtención de un co-producto del proceso con gran valor comercial.

El rendimiento en azúcares, tras la hidrólisis enzimática, resultó mayor en el caso de cortezas de mandarina pretratadas mediante *steam explosion* que en cortezas frescas, incluso utilizando dosis enzimáticas inferiores.

El procesado SSF, usando concentraciones enzimáticas inferiores a la dosis de referencia REC, y mandarinas pretratadas con *steam explosion*, dio lugar a una producción de etanol de 50-60 L/ 1000 kg MCPW fresca.

De todo esto se puede concluir que el proceso de *steam explosion* puede ser una alternativa al pretratamiento de cortezas de mandarina, para reducir las dosis enzimáticas necesarias en la sacarificación y fermentación simultáneas de estas cortezas, para la producción de etanol.

Los ensayos realizados en laboratorio se han extrapolado a escala piloto y se ha alcanzado una producción máxima de etanol de 60 L/ 1000 kg MCPW.

CAPÍTULO 5

Obtención de bioetanol y coproductos de las cortezas y pulpas de limón

Parte del texto de este Capítulo ha sido publicado en los trabajos:

- Boluda-Aguilar, M., Belisario-Sánchez, Y.Y., López-Gómez, A (2010). Modified steam explosion process for pre-treatment of citrus peel wastes. En: FITO, P., TOLDRA, F. (Eds.), *Food Innova 2010*. ISBN 978-84-693-5010-2, Valencia, España.
- Boluda-Aguilar M, López-Gómez A (2013). Production of bioethanol by fermentation of lemon (*Citrus limon* L.) peel wastes pretreated with steam explosion. *Industrial Crops and Products*, 41, 188-197.

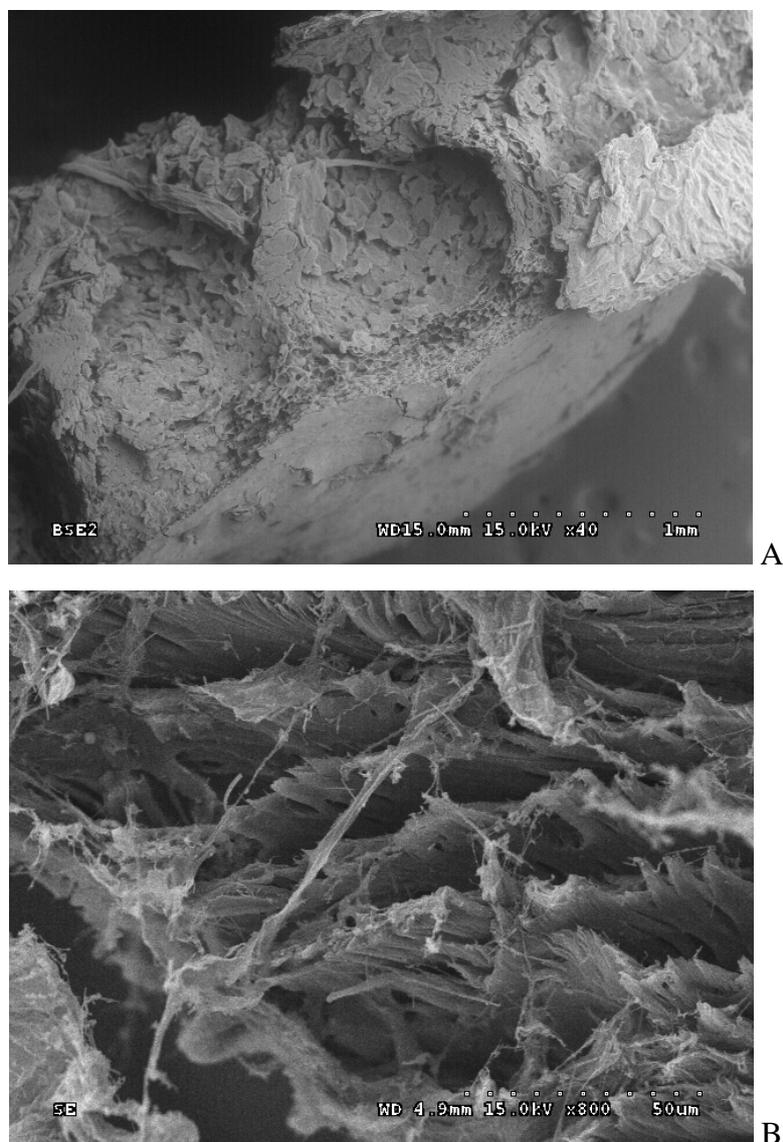
5.1. Introducción.

El limón es la tercer cítrico en importancia en cuanto a la extensión de su cultivo, con una producción mundial en 2010 de 14.234.000 t (FAO, 2010). Los principales países productores de limón destinado a industria son Argentina (1.000.000 toneladas), Italia (304.000 toneladas), España (unas 300.000 t, en 2011), USA (230.000 toneladas) y México (296.000 toneladas). En 2007 se procesaron 2.130.000 toneladas de limón en todo el mundo, las cuales dieron lugar aproximadamente a 1.200.000 toneladas de residuos (González-Molina et al., 2010).

Las cortezas de limón, como material lignocelulósico rico en carbohidratos, tienen gran interés para la producción de bioetanol al igual que otros cultivos ya estudiados para este fin (Marín et al., 2007; Mielenz et al., 2009). Sin embargo, a pesar de la gran disponibilidad de este material, no hay estudios sobre su posible uso para la producción de etanol. Actualmente, este subproducto se ha pensado como sustrato en la fermentación para la producción de preparados multienzimáticos (Mamma et al., 2008), para la extracción de pectinas (Masmoudi et al., 2010) y como fuente de compuestos naturales como ácido cítrico, vitaminas, flavonoides, carotenoides, minerales, fibra dietética y aceites esenciales (González-Molina et al., 2010; Marín et al., 2007; De Gregorio et al., 2002; Ferhat et al., 2007).

5.2. Influencia del pretratamiento de *steam explosion* sobre la composición de las cortezas de limón.

Las Fotos 5.1 A y B (o imágenes SEM) de microscopía electrónica muestran las cortezas de limón pretratadas mediante *steam explosion*. El pretratamiento provoca la destrucción tanto de las paredes celulares como de las glándulas oleíferas. Este efecto, al igual que se observaba en mandarina, tiene como resultado: (i) la separación parcial de las fibras de celulosa que serán posteriormente hidrolizadas, (ii) la separación de los aceites esenciales (lo que permite su recuperación como co-producto), y (iii) la producción de azúcares simples, que serán convertidos en etanol mediante fermentación.



Fotos 5.1. Imágenes SEM de cortezas de limón pretratadas con *steam explosion*. Se aprecia la ruptura de las paredes celulares y de las glándulas oleíferas (imagen A), y la separación de las fibras de celulosa (imagen B)

Los resultados del análisis termogravimétrico de cortezas frescas de limón, cortezas pretratadas y del residuo tras la fermentación (CPP), se muestra en la Figura 4.8 y la Tabla 4.5.

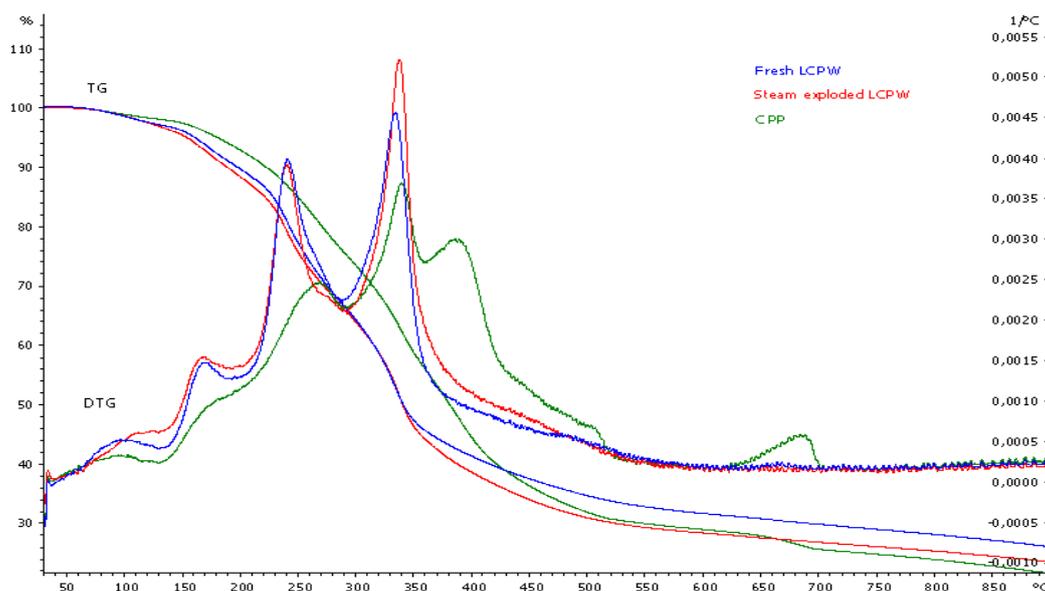


Figura 5.1. Curvas TG-DTG de muestras de cortezas frescas de limón, de cortezas pretratadas mediante *steam explosion*, y del CPP obtenido tras la fermentación.

En las curvas TG-DTG obtenidas se puede apreciar que se tiene una pérdida de agua libre (del 3% en peso) a una temperatura de 90°C; luego se observan tres picos de descomposición a temperaturas máximas de 160°C, 235°C y 328°C, que se corresponden, respectivamente, con la degradación de la pectina (que supone una pérdida de peso del 9%), la hemicelulosa (22%) y la celulosa (8,3%). Tal y como se observó en cortezas de mandarina, estos valores de temperaturas máximas no coinciden con los obtenidos por Yang et. (2007) y Einhorn-Stoll et al. (2009), que observaron temperaturas superiores de pirolisis para la pectina, la hemicelulosa y la celulosa. No obstante, los valores obtenidos para las temperaturas de descomposición de estos compuestos son similares a los observados para mandarina y a los encontrados en los trabajos de Aguiar et al. (2008).

Como en el caso de las cortezas de mandarina pretratada, se observa la descomposición de dos fracciones de hemicelulosa a temperaturas distintas de 234°C y 255°C. En este caso se pone de manifiesto que hay un 35% en peso de la fracción total de hemicelulosa que tiene una mayor estabilidad térmica tras haber sido sometida a tratamiento de *steam explosion*.

Igual que se vio en los estudios sobre las cortezas de mandarina, y de acuerdo con los resultados de otros autores (Zhang et al., 2008), el proceso de *steam explosion* no modifica la composición en lignina y celulosa, ya que se obtienen curvas similares en limón fresco y pretratado. Por tanto, en este caso, el objetivo de este pretratamiento se centra fundamentalmente en conseguir que estos compuestos sean más accesibles a la acción de los enzimas hidrolíticos. La composición aproximada del residuo CPP obtenido tras la fermentación de estas cortezas de limón: humedad (2,0% en peso), pectina (6,5% en peso), hemicelulosa (16% en peso), celulosa (19,0%), lignina (17%) y ceniza (6,5%).

Tabla 5.1. Composición de las cortezas de limones frescos, de cortezas de limón pretratadas con *steam explosion*, del residuo CPP obtenido tras la fermentación.

| | Agua (% pf) | Pectina (% pf) | Hemicelulosa a (% pf) | Hemicelulosa b (% pf) | Celulosa (% pf) | Lignina (% pf) | Carbón (% pf) | Cenizas (% pf) |
|----------------------|-------------|----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------|----------------|---------------|----------------|
| CPW limón fresco | 3,32±0,31 | 8,82±2,11 | 22,45±2,11 | 0,00±0,00 | 22,85±2,15 | 8,29±0,78 | 22,04±2,07 | 4,16±0,39 |
| CPW limón pretratado | 3,88±0,36 | 10,48±0,97 | 13,13±1,21 | 7,37±0,68 | 24,95±2,31 | 9,58±0,88 | 20,32±1,88 | 3,28±0,30 |
| CPP | 2,01±0,20 | 6,41±0,63 | 16,64±1,65 | 0,00±0,00 | 18,50±1,84 | 17,15±1,70 | 15,21±1,51 | 6,45±0,60 |

5.3. Influencia del pretratamiento de *steam explosion* sobre la producción de azúcares en la hidrólisis enzimática de cortezas de limón.

Cuando se llevó a cabo la hidrólisis enzimática de cortezas frescas de limón, sin pretratamiento de *steam explosion*, no se encontraron diferencias significativas de producción de azúcares, al utilizar distintas diluciones CPW:agua, y usando una misma dosis enzimática (la dosis REC). Igual ocurría en los ensayos realizados con cortezas frescas de mandarina. Tan sólo existen diferencias respecto de la muestra con la mayor dilución con agua (CPW:agua, 1:8), donde se observa una producción de azúcares totales y fermentables inferior al resto. El contenido en azúcares fermentables, después de 24 horas, fue de entre $11,42 \pm 1,17$ y $20,62 \pm 2,3$ g de azúcar / 100 g piel seca y el contenido en azúcares totales entre $37,71 \pm 1,91$ y $47,75 \pm 3,39$ g de azúcar / 100 g piel seca.

La Tabla 5.3 muestra el rendimiento en azúcares después de la hidrólisis enzimática de limón pretratado mediante *steam explosion*, con dilución de CPW:agua de 1:4 v/v (25 mL de corteza en 100 mL de agua), añadiendo las dosis enzimáticas 2, 3, 4 y 5 de la Tabla 3.2. En este caso, el rendimiento en azúcares fermentables fue de entre $27,03 \pm 5,76$ y $36,68 \pm 12,21$ g / 100 g de piel seca y en azúcares totales de entre $46,84 \pm 8,84$ g / 100 g de piel seca y $61,94 \pm 7,24$ g / 100 g piel seca.

La Figura 5.2 muestra el rendimiento en azúcar, después de 24 horas de hidrólisis enzimática, de limón fresco sin pretratamiento y de limón pretratado con *steam explosion* (ambos diluidos en agua en proporción CPW:agua de 1:4 v/v), y utilizando diversas dosis enzimáticas. Se comprueba que hay una mayor producción de azúcares cuando el material se somete previamente a *steam explosion*, si se compara con la producción de las cortezas no pretratadas, incluso añadiendo dosis enzimáticas superiores (dosis REC). Además, se obtuvo un mejor rendimiento en azúcares a partir de cortezas de limón pretratadas con *steam explosion*, si se compara con el obtenido a partir de cortezas de mandarina pretratadas.

Cuando se lleva a cabo un proceso SSF en botellas de 250 mL (con diluciones CPW:agua de 2:1 v/v), y utilizando concentraciones enzimáticas reducidas respecto de

las de referencia (45% REC en pectinasa, 90% REC en β -glucosidasa y 90% REC en celulasa), la producción de azúcares, tras 3 horas de hidrólisis enzimática de cortezas pretratadas de limón, fue de $30,97 \pm 1,3$ g de azúcares fermentables y $52,86 \pm 1,9$ g de azúcares totales/100 g de piel seca. En los ensayos realizados en bioreactor de 5 L, la producción de azúcares tras 3 horas de sacarificación fue de $25,81 \pm 0,86$ g de azúcares fermentables/100 g de piel seca y de $40,35 \pm 2,1$ g de azúcares totales/100 g de piel seca.

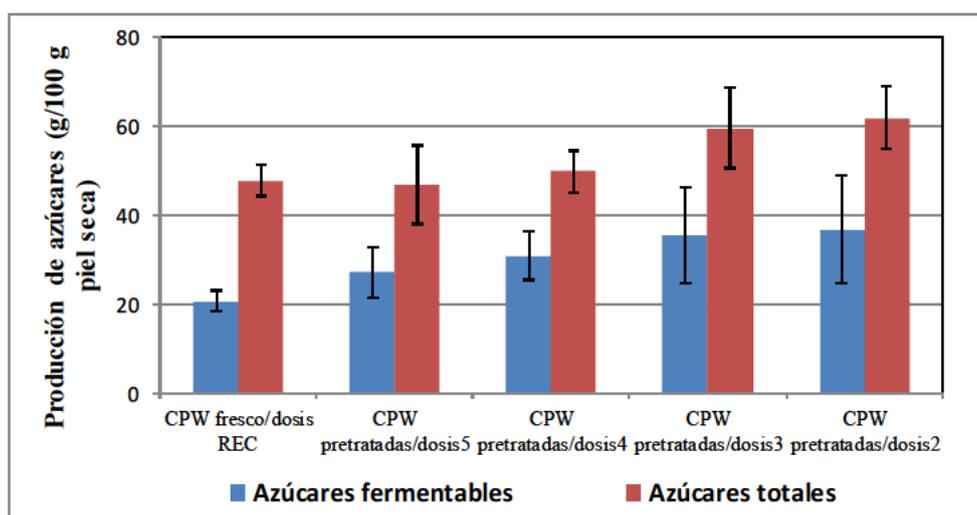


Figura 5.2. Producción de azúcares después de 24 horas de hidrólisis enzimática, en cortezas frescas de limón (con dosis REC) y en cortezas pretratadas con *steam explosion* (con dilución CPW:agua de 1:4 v/v, y usando el proceso SF y las dosis enzimáticas de la Tabla 3.2). Los valores de la dosis REC (mg de proteína / g piel seca) fueron: 5 mg de pectinasa, 2 mg de β -glucosidasa, 2,1 mg de celulasa

Tabla 5.2. Producción de azúcares después de 24 horas de hidrólisis enzimática (con dosis enzimática REC) de cortezas frescas de limón sin pretratamiento de *steam explosion*, y usando el proceso SF y distintas diluciones CPW:agua, en botellas de vidrio de 250 mL.

| Dilución (LCPW:agua,v/v) | GA ¹ | RAM | ARA ¹ | GLUC ¹ | GAL ¹ | XYL ¹ | FRUC ¹ | SUCR ¹ | FS ¹ | TS ¹ | D-limoneno (% v/v) |
|--------------------------|-----------------|--------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------------|
| 1:8 | 19,19 (0,29)a | 0,74 (0,06)a | 3,33 (0,33)a | 5,35 (0,4)a | 2,08 (0,23)a | 0,95 (0,15)a | 6,04 (0,84)a | 0,03 (0,00)a | 11,42 (1,17)a | 37,71 (1,91)a | 0,036 |
| 1:4 | 16,94 (0,27)b | 0,56 (0,04)b | 5,01 (0,54)bd | 12,42 (5,35)b | 3,57 (0,38)b | 1,05 (0,11)b | 8,20 (0,61)b | 0,00 (0,00)b | 20,62 (2,30)b | 47,75 (3,39)b | 0,065 |
| 1:2 | 17,17 (0,38)b | 0,47 (0,04)c | 4,10 (0,26)cd | 10,00 (0,56)b | 2,30 (0,13)a | 0,71 (0,05)b | 9,12 (0,54)c | 0,05 (0,01)c | 19,17 (1,08)b | 43,92 (1,46)b | 0,081 |
| 1:1 | 16,56 (0,41)b | 0,52 (0,01)b | 4,48 (0,07)d | 10,73 (0,29)b | 2,44 (0,07)ab | 0,73 (0,01)b | 9,25 (0,29)c | 0,06 (0,01)c | 20,05 (0,42)b | 44,77 (0,30)b | 0,162 |

Media con desviación estándar entre paréntesis.

¹ Azúcares producidos tras la hidrólisis; GA-ác. galacturónico, RAM-ramnosa, ARA-arabinosa, GLUC-glucosa, GAL-galactosa, XYL-xilosa, FRUC-fructosa, SUCR-sacarosa.

²FS: azúcares fermentables

³TS: azúcares totales en g/ 100 g de corteza seca.

Tabla 5.3. Producción de azúcares tras 24 horas de hidrólisis enzimática de cortezas de limón pretratadas con *steam explosion* (CPW: agua, 1:4 v/v).

| Dosis enzimática | GA ¹ | Ram ¹ | Ara ¹ | Glu ¹ | Gal ¹ | Xyl ¹ | Fruc ¹ | Sucr ¹ | FS ² | TS ³ |
|------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| Dosis 2 | 15,39(0,15)c | 0,44(0,18)b | 3,49(0,91)c | 23,64(5,76)c | 4,25(0,75)c | 1,69(0,31)b | 13,05(6,46)a | 0,00(0,00)a | 36,68(12,21)a | 61,94(7,24)a |
| Dosis 3 | 15,01(0,31)b | 0,46(0,07)b | 2,94(1,32)b | 22,96(7,93)c | 4,15(1,29)c | 1,46(0,02)b | 12,53(7,81)a | 0,00(0,00)a | 35,49(10,74)a | 59,51(8,96)a |
| Dosis 4 | 14,83(0,09)b | 0,28(0,13)a | 1,12(0,14)a | 19,12(1,38)b | 2,16(0,71)b | 0,59(0,35)c | 11,70(0,97)a | 0,00(0,00)a | 30,82(5,58)a | 49,81(4,61)b |
| Dosis 5 | 13,99(0,76)a | 0,29(0,19)a | 3,22(1,13)c | 15,13(3,42)a | 1,38(0,53)a | 0,93(0,39)a | 11,75(2,30)a | 0,15(0,01)a | 27,03(5,76) a | 46,84(8,84)b |

Media con desviación estándar entre paréntesis.

¹ Azúcares producidos tras la hidrólisis; GA-ác. galacturónico, RAM-ramnosa, ARA-arabinosa, GLUC-glucosa, GAL-galactosa, XYL-xilosa, FRUC-fructosa, SUCR-sacarosa.

²FS: azúcares fermentables

³TS: azúcares totales en g/ 100 g de corteza seca.

5.4. Influencia del pretratamiento de *steam explosion* sobre la producción de etanol y otros co-productos de cortezas de limón.

Las cortezas de limón pretratadas mediante *steam explosion*, tuvieron una concentración en aceites esenciales por debajo del 0,05% (v/v). Con el pretratamiento de estas cortezas se consiguió una recuperación de más del 90% de los aceites esenciales presentes en la corteza fresca de limón, igual que se obtuvo en cortezas de mandarina, y en cortezas de naranja en los trabajos de Rezzoug y Louka (2009).

Las cortezas de limón, tal y como venían de la industria, tenían una concentración en aceites esenciales de 0,2-0,3% (v/v) y tras el pretratamiento este valor oscilaba entre 0,015 y 0,05% (v/v). En todos los ensayos realizados de SSF y SF, el contenido en aceites esenciales se encontraba por debajo del 0,05% de forma que se evitara un posible efecto antimicrobiano de aquellos sobre *S. cerevisiae* (Wilkins, 2009). Los recuentos microbiológicos mostraron que la concentración de la levadura se mantuvo constante durante el transcurso de la fermentación en un valor de 10^7 UFC/mL, cinética similar a la obtenida durante la fermentación de cortezas de mandarina y a la obtenida por Pourbafrani et al. (2007). Se comprueba así que no hay efecto inhibitorio de compuestos como D-limoneno, furfural o HMF en la fermentación de cortezas de limón pretratadas mediante *steam explosion*.

En la Tabla 5.3 se detalla la producción de etanol tras la hidrólisis enzimática, de cortezas de limón pretratadas usando diferentes dosis enzimáticas, tanto para el proceso SF como SSF. De estos resultados se puede deducir que la producción de etanol no se ve influenciada por la dosis enzimática utilizada en la hidrólisis de cortezas de limón pretratadas. Cuando se lleva a cabo el proceso de hidrólisis y fermentación de forma simultánea (SSF), se tuvo una producción de etanol de $63,1 \pm 4,96$ L/ 1000 kg LCPW de limón usando la máxima dosis enzimática (dosis 5 según Tabla 3.2) y de $63,54 \pm 2,87$ L/1000 kg LCPW cuando se redujo la dosis de las enzimas β -glucosidasa y celulasa (dosis 1 según Tabla 3.2). Por tanto, no se han observado diferencias significativas en la producción de azúcares tras la hidrólisis y fermentación simultánea de cortezas de limón pretratadas, para las distintas dosis enzimáticas utilizadas.

En este caso de las cortezas de limón, el rendimiento en etanol obtenido en el proceso SSF es superior al que se tiene con el proceso SF ($45,5 \pm 5,4$ L/ 1000 kg LCPW). Además, el rendimiento es mayor que el obtenido con cortezas de mandarina en iguales condiciones de procesado ($54,63 \pm 4,15$ L / 1000 kg MCPW).

En cuanto al residuo de CPP obtenido tras el proceso SSF, era de $25,58$ kg/ 1000 kg LCPW, lo que se corresponde con una alta tasa de producción de etanol a expensas de la producción de CPP. La Figura 4.3 muestra que la producción de CPP es significativamente mayor cuando se usan las dosis enzimática 2 y 4, ya que se consiguen 60 kg CPP / 1000 kg LCPW en estos casos y sobre 45 kg CPP / 1000 kg LCPW para las dosis enzimáticas 1 y 3.

La producción del otro co-producto del proceso, el ácido galacturónico, se muestra en la Figura 5.4. Se puede ver la influencia de la dosis enzimática utilizada en la hidrólisis (tras 24 horas de reacción) en el contenido final de GA. Cuando la dosis enzimática fue mayor (dosis 5), la producción de este azúcar fue ligeramente superior al resto de dosis enzimáticas ($41,51 \pm 2,14$ kg/1000 kg LCPW). No se han visto diferencias significativas en la producción de GA cuando se han utilizado las dosis enzimáticas 1, 2, 3 o 4 (se producen entre $33,2 \pm 3,4$ y $36,7 \pm 0,7$ kg/1000 kg LCPW). Es de destacar que la cantidad de GA producido en todos los casos, con cortezas de limón, es superior a los valores obtenidos en cortezas de mandarina.

Los aceites esenciales de las cortezas de limón recuperados tras el pretratamiento de *steam explosion* fueron el 93% del contenido total presente. Se obtienen unos 6 L de aceites esenciales por cada tonelada de corteza de limón.

Tabla 5.4. Producción de etanol (L etanol /1000 kg CPW de limón) tras el procesado SF y SSF de cortezas de limón pretratadas con *steam explosion* (con diluciones de CPW:agua de 1:4 v/v; y usando diferentes dosis enzimáticas, en botellas de vidrio de 250 mL).

| Dosis enzimática | Proceso SF | Proceso SSF |
|------------------|-------------|-------------|
| Dosis 1 | 45,5±5,4a | 63,54±2,87a |
| Dosis 2 | 30,8±2,7b | 63,4±7,96a |
| Dosis 3 | 30,3±5,4b | nd |
| Dosis 4 | 28,6±10,9bc | nd |
| Dosis 5 | 38,6±4,9c | 63,10±4,96a |

Media (n=3) con su desviación típica. Los datos con una misma letra no tienen diferencias significativas siendo $p \leq 0,05$. nd: no existen datos

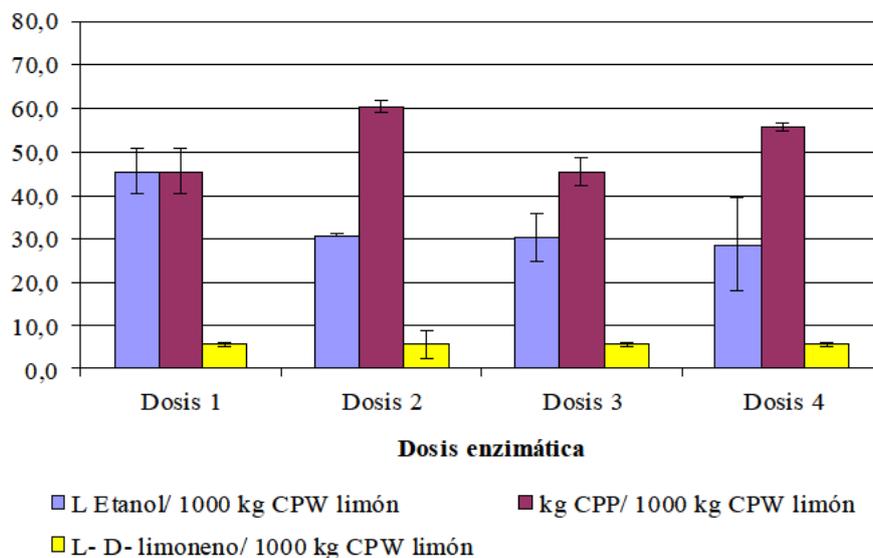


Figura 5.3. Etanol y co-productos obtenidos tras el procesado SF de cortezas de limón pretratadas con *steam explosion* (con diluciones de CPW:agua de 1:4 v/v; y usando diferentes dosis enzimáticas de Pectinex, Celluclast y Novozyme, en botellas de vidrio de 250 mL).

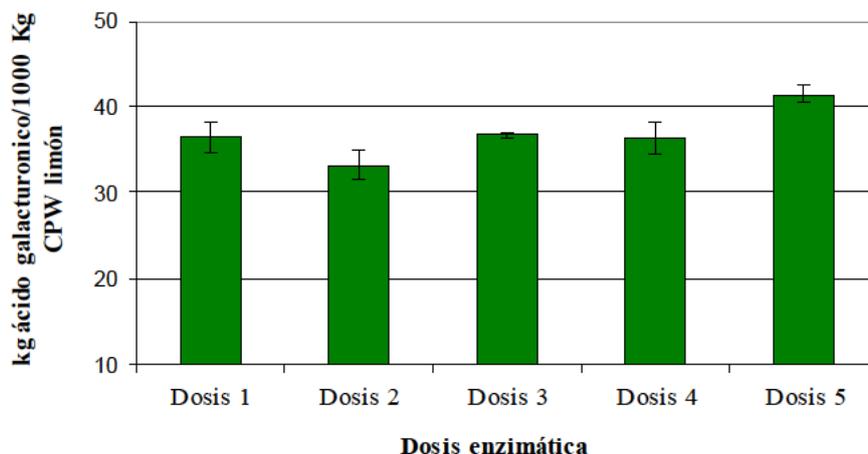


Figura 5.4. Producción de ácido galacturónico (kg/ 1000 kg CPW limón) después de la hidrólisis enzimática con distintas dosis enzimáticas de la pieles de limón pretratadas con *steam explosion* (con diluciones CPW:agua de 1:4 v/v; con distintas dosis enzimáticas, y en botellas de vidrio de 250 mL).

En la siguiente Figura 5.5., se muestra la producción de etanol tras un proceso de hidrólisis y fermentación (SF) de cortezas de limón pretratadas con *steam explosion* usando las diferentes dosis enzimáticas de la Tabla 3.3 y una dilución LCPW: agua de 2:1, w/w.

La máxima producción de etanol se consiguió con tan sólo dos días de fermentación y no se vieron diferencias significativas entre las muestras con concentraciones enzimáticas 1, 2 y 3 (entorno a los 45-50 L etanol/ 1000 kg LCPW). La reducción en la dosis de pectinasa (dosis 2 y 1 de la Tabla 3.3) no ha tenido efecto sobre la producción de etanol tras la hidrólisis y posterior fermentación de pieles de limón pretratadas. Sin embargo, en general se observa una mejora del rendimiento en etanol cuando se utilizan diluciones CPW:agua de 2:1 v/v, con respecto a los ensayos realizados con diluciones de 1:4 y añadiendo mayores dosis de la enzima pectinasa.

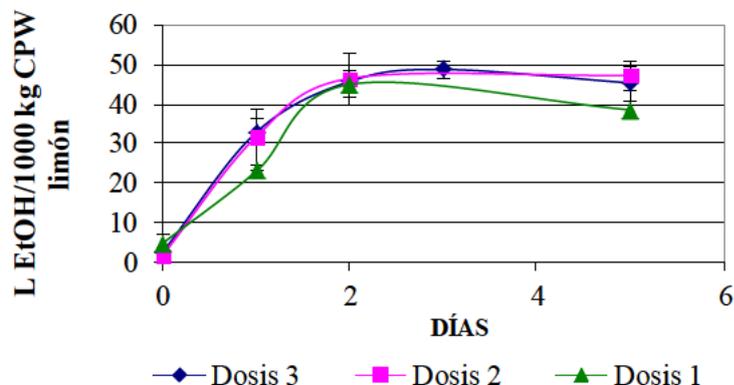


Figura 5.5. Curvas de producción de etanol (en L/1000 kg CPW limón) obtenidas tras el procesado SF de pieles de limón pretratadas (con diluciones CPW: agua de 2:1 v/v), usando distintas dosis enzimáticas, en botellas de vidrio de 250 mL. Las dosis enzimáticas utilizadas (mg proteína/mg corteza seca) corresponden a las detalladas en la Tabla 3.3.

5.5. Producción de bioetanol con cortezas y pulpas de limón a escala piloto en bioreactor

La Figura 5.6. muestra la cantidad de etanol producido en un bioreactor de 5 Litros de capacidad y en botellas de vidrio de 250 mL, a partir de cortezas de limón pretratadas con *steam explosion*, tras la realización de un proceso SSF (37°C) con diluciones de CPW:agua de 2:1 (v/v). La máxima producción de etanol, después de tres días de fermentación, fue de $67,83 \pm 7,87$ L/1000 kg LCPW en el caso de bioreactores mientras que, en las botellas de vidrio, aquella fue menor ($63,54 \pm 2,87$ L/1000 kg LCPW).

En cuanto a la producción de CPP, fue de $33,50 \pm 1,83$ kg CPP/ 1000 kg LCPW a escala piloto (en bioreactor) y de $31,68 \pm 0,50$ kg CPP/ 1000 kg LCPW en botellas de 250 mL. Si comparamos estos resultados con los obtenidos en el proceso SF vemos que la producción es menor cuando los procesos de hidrólisis y fermentación tienen lugar de forma simultánea.

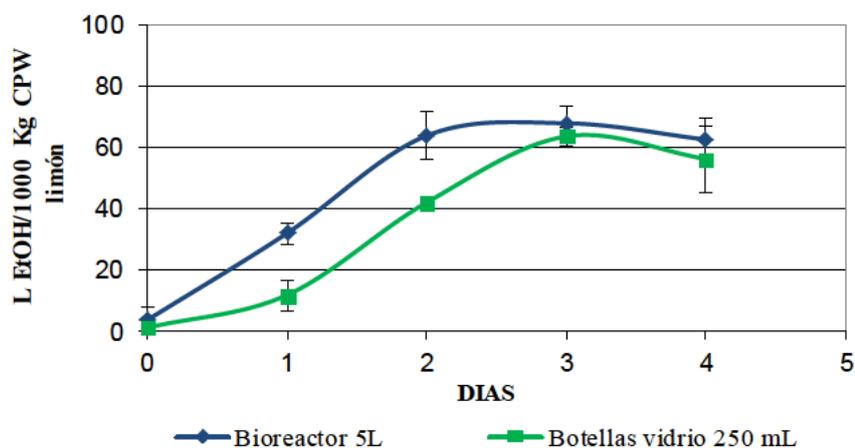


Figura 5.6. Curvas de producción de etanol (en L/1000 kg CPW limón) obtenidas mediante el procesado SSF de pieles de limón pretratadas con *steam explosion* (con diluciones CPW: agua de 2:1 v/v), usando distintas dosis enzimáticas, en bioreactores de 5L.

Las dosis enzimáticas utilizadas (mg proteína/mg corteza seca) fueron: 2,21 mg pectinasa, 1,95 mg β -glucosidasa y 1,82 mg celulasa.

5.6. Influencia del contenido en aceites esenciales de las cortezas de limón en la producción de azúcares y etanol.

La Figura 5.7 muestra el efecto de la concentración residual de los aceites esenciales (siendo el D-limoneno el aceite mayoritario) sobre la producción de etanol en la fermentación de cortezas de limón no pretratadas. La inhibición completa de la fermentación tuvo lugar en concentraciones superiores a 0,2% (v/w), donde prácticamente no hay producción de etanol. En mandarina (ver Capítulo 4 anterior) y naranja (Grohmann, 1995a), la inhibición se produce con concentraciones iguales o superiores a 0,1% (v/w).

En el caso de las cortezas de limón, el menor efecto inhibitor se dio cuando la concentración era inferior a 0,05% v/w, donde se obtuvo una producción de etanol (55 L etanol / 1000 kg de pieles frescas de limón) que es inferior a la obtenida a partir de cortezas de limón pretratadas con *steam explosion* y con dosis enzimática menor (con procesado SSF). Sin embargo, en los ensayos realizados con mandarina, este valor de

aceites esenciales residuales fue ligeramente superior (0,065%, v/w). En los trabajos realizados con pieles de naranja no se observa inhibición de la fermentación con concentraciones de 0,08% (v/w).

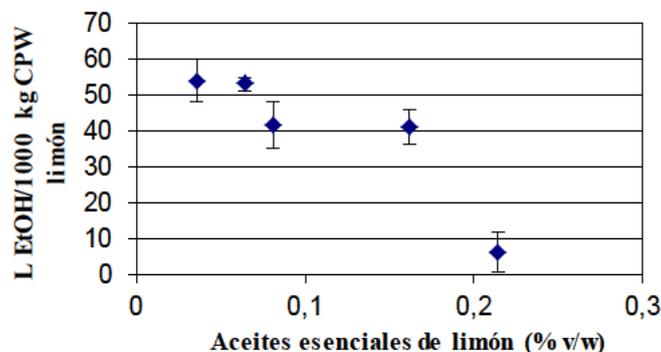


Figura 5.7. Influencia del contenido en aceites esenciales de pieles de limón no pretratadas con *steam explosion* sobre la producción de etanol (L/1000 kg CPW limon), con procesado SF.

5.7. Conclusiones

De los resultados obtenidos se desprende que las cortezas de limón procedentes de la industria de zumos son una excelente materia prima para la producción de bioteanol, ácido galacturónico y aceites esenciales. El proceso de hidrólisis enzimática y fermentación simultáneas de cortezas de limón pretratadas con *steam explosion* ha dado lugar a una producción de etanol de unos 60 L/1000 kg CPW fresco. Estos resultados han sido igual de satisfactorios tanto a escala de laboratorio como a escala de bioreactores de 5 L.

El proceso de *steam explosion* produce la ruptura de las paredes celulares de las cortezas de limón, facilitando el acceso de los enzimas a los polisacáridos que componen esta biomasa, y permitiendo la liberación de los aceites esenciales de la piel de limón que son recuperados y aprovechados como co-producto del proceso.

La concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales de limón sobre la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, en el transcurso de la fermentación alcohólica, fue de 0,05%. El pretratamiento de las pieles mediante *steam explosion* hizo que el mosto

de pieles de limón tuviera una concentración en aceites esenciales por debajo de este valor de concentración mínima inhibitoria.

CAPÍTULO 6

Obtención de bioetanol y coproductos de las cortezas y pulpas de pomelo

Parte del texto de este Capítulo ha sido publicado en los trabajos:

- Boluda-Aguilar, M., Belisario-Sánchez, Y.Y., López-Gómez, A (2010). Modified steam explosion process for pre-treatment of citrus peel wastes. En: FITO, P., TOLDRA, F. (Eds.), *Food Innova 2010*. ISBN 978-84-693-5010-2, Valencia, España.

6.1. Introducción

Dentro de los cultivos de frutos cítricos, el pomelo se encuentra en cuarto lugar en importancia de producción, por detrás de la naranja, limón y mandarina, con una producción mundial en 2010 de 6.952.737 toneladas métricas (FAO, 2010). Además, en ocasiones los pomelos y naranjas se procesan simultáneamente en la industria, por lo que muchas veces estos residuos se encuentran mezclados como un único desecho (Wilkins et al., 2007b).

El aprovechamiento de los subproductos de la extracción de zumo de pomelo no ha sido suficientemente estudiado, ya que sólo se encuentra en la bibliografía el trabajo de Wilkins et al. (2007b), que estudian el aprovechamiento de los CPW de pomelo para la producción de etanol, obteniendo unos rendimientos teóricos de 3,6 L Etanol / 100 kg de CPW de pomelo fresco.

En este Capítulo se estudia el aprovechamiento de las cortezas de pomelo como material lignocelulósico para la producción de bioetanol. Además se ha estudiado el efecto del pretratamiento con *steam explosion* de estas cortezas con el fin de disminuir las dosis utilizadas de enzimas, de mejorar el rendimiento en etanol, y obtener otros coproductos que rentabilicen aún más el proceso.

6.2. Influencia del pretratamiento de *steam explosion* sobre la composición de las cortezas de pomelo.

En las Fotos 6.1 y 6.2 se muestran las cortezas de pomelo antes y después del pretratamiento de *steam explosion*. En la Foto 6.1 se puede ver una glándula oleífera intacta rodeada de células que conservan perfectamente sus paredes celulares. Tras realizar el pretratamiento (Foto 6.2), se produce la ruptura de estas paredes celulares y, tal como se puede observar, se separan las fibras de celulosa que serán atacadas por los enzimas para su conversión en azúcares simples fermentables.



Foto 6.1. Imágenes SEM de cortezas frescas de pomelo sin pretratamiento de *steam explosion*. Se aprecian las paredes celulares y la glándula oleífera intactas.

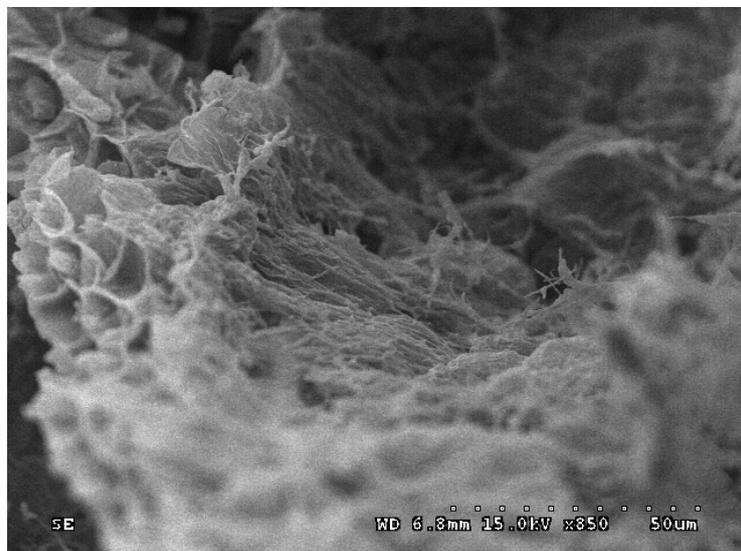


Foto 6.2. Imágenes SEM de cortezas de pomelo pretratadas con *steam explosion*. Se ve la ruptura de las paredes celulares y la aparición de fibras separadas de celulosa.

Los resultados del análisis termogravimétrico (curvas TG-DTG) de cortezas frescas de pomelo, de cortezas pretratadas con *steam explosion* y del residuo CPP que queda tras la fermentación, se muestran en la Figura 6.1 y la Tabla 6.1.

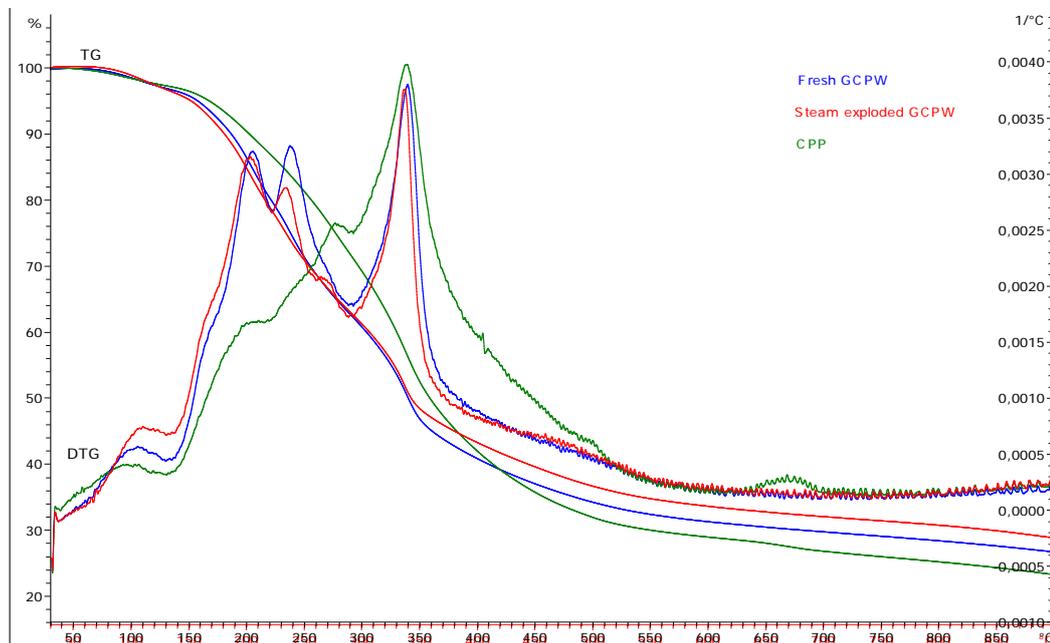


Figura 6.1. Curvas TG-DTG de cortezas frescas de pomelo y pretratadas con *steam explosion* y CPP obtenido tras la hidrólisis enzimática y fermentación.

En el caso de las pieles no tratadas (frescas), se tiene primeramente la pérdida del agua libre (3,4% en peso) a 98°C y, seguidamente, aparecen tres picos de descomposición a temperaturas de 198°C, 231°C y 333°C, correspondientes a la degradación de la pectina (pérdida de peso del 16%), la hemicelulosa (18%), y la celulosa (20%), respectivamente.

Las temperaturas de degradación de cada uno de los componentes principales presentes en las cortezas de pomelo, son aproximadamente iguales a las obtenidas para las cortezas de limón y mandarina, y similares a las detalladas en el trabajo de Aguiar et al. (2008).

La composición en polisacáridos de la corteza fresca de pomelo es similar a la corteza de mandarina, por tanto, los rendimientos de etanol en principio deberían ser del mismo orden. Sin embargo, el contenido de celulosa de las cortezas de pomelo tras el

pretratamiento de *steam explosion* (aproximadamente 16 %) disminuye con respecto al de la corteza fresca (20%).

En el caso de las cortezas de pomelo sometidas a *steam explosion*, se tiene la descomposición de la hemicelulosa en dos fracciones que se traducen en la curva DTG en dos picos a las temperaturas de 227°C y 250°C. La fracción más sensible (hemicelulosa a) se corresponde con una pérdida de peso (en la curva TGA) de aproximadamente el 9,5% y, para la hemicelulosa b del 9%.

Los resultados de termogravimetría de las cortezas de pomelo pretratadas con *steam explosion* no muestran diferencias en el contenido de pectina, celulosa o lignina con respecto a las cortezas frescas sin tratamiento. Se demuestra de nuevo que el proceso de *steam explosion* no tiene influencia sobre el contenido en pectina, celulosa o lignina de las cortezas de pomelo.

La composición aproximada del residuo CPP obtenido tras la fermentación de estas cortezas de pomelo pretratadas fue: contenido de humedad (2,7% en peso), pectina (9,9% en peso), hemicelulosa (17% en peso), celulosa (26,0%), lignina (21%), carbón (15%) y ceniza (4,8 %).

Tabla 6.1. Composición química de las cortezas de pomelos frescos, tras el pretratamiento de *steam explosion* y tras la fermentación (CPP)

| | Agua (%pf) | Pectina (%pf) | Hemicelulosa a (%pf) | Hemicelulosa b (%pf) | Celulosa (%pf) | Lignina (%pf) | Carbón (%pf) | Cenizas (%pf) |
|------------------------|------------|---------------|----------------------|----------------------|----------------|---------------|--------------|---------------|
| CPW pomelo fresco | 3,46±0,32 | 16,1±1,51 | 18,31±1,72 | 0,0±0,0 | 19,78±1,86 | 15,42±1,45 | 23,64±2,22 | 3,29±0,31 |
| CPW pomelo pre-tratado | 3,78±0,36 | 17,39±1,68 | 9,42±0,91 | 8,74±0,84 | 16,38±1,58 | 15,54±1,50 | 25,27±2,44 | 3,59±0,34 |
| CPP | 2,70±0,26 | 9,94±0,95 | 17,15±1,65 | 0,0±0,0 | 25,97±2,50 | 20,93±2,01 | 15,31±1,47 | 4,88±0,47 |

6.3. Influencia del pretratamiento de *steam explosion* sobre la producción de azúcares en la hidrólisis enzimática de cortezas de pomelo.

La Tabla 6.2 muestra la cantidad de azúcares producidos, tras la hidrólisis enzimática (usando dosis REC y tras 24 horas) de cortezas de pomelo no pretratadas mediante *steam explosion*, en distintas condiciones de dilución CPW:agua. No se han visto diferencias significativas en la cantidad de azúcares producidos, tras la hidrólisis enzimática con dosis REC, a las distintas diluciones CPW:agua.

La producción de azúcares fermentables y azúcares totales fue similar, independientemente de la dilución CPW:agua utilizada, alcanzando valores aproximados de entre $38,51 \pm 0,44$ y $44,28 \pm 0,83$ g de azúcar fermentable / 100 g piel seca, y de entre $58,56 \pm 0,6$ y $64,16 \pm 0,86$ g de azúcar total / 100 g piel seca, respectivamente. El contenido en azúcares de las cortezas frescas de pomelo tras la hidrólisis, es muy superior al obtenido en las cortezas de mandarina o limón. Estos resultados son similares a los obtenidos en los trabajos de Wilkins et al. (2007b) tras la hidrólisis de cortezas frescas de pomelo. En ellos se consiguió una producción de azúcares de 57,86 g de azúcares totales / 100 g piel seca, 22,13 g de glucosa / 100 g piel seca, 12,72 g de fructosa / 100 g piel seca y 0,56 g de sacarosa / 100 g de piel seca, cuando se aplicaron dosis enzimática de 2 mg de proteína pectinasa / g piel seca y 2,1 mg de proteína β -glucosidasa.

La Tabla 6.3 muestra el rendimiento en azúcares, después de la hidrólisis enzimática de pomelo pretratado mediante *steam explosion*, con dilución de CPW: agua de 1:4 w/v (25 g de corteza en 100 mL de agua), añadiendo las dosis enzimáticas 1, 2, 3, 4 y 5 de la Tabla 3.2. En este caso, la cantidad de azúcares fermentables tras la hidrólisis fue similar en los distintos tratamientos, a excepción de cuando se utilizó la dosis enzimática 2, donde se obtiene una menor concentración. El contenido en azúcares fermentables usando las dosis enzimáticas 1, 3, 4 y 5 se encontraba entre $29,38 \pm 3,22$ y $35,47 \pm 1,06$ g / 100 g de piel seca. En este caso, los rendimientos de azúcar obtenido tras la hidrólisis de cortezas pretratadas es igual o inferior al que se tiene con cortezas frescas hidrolizadas con una dosis enzimática superior (dosis REC) (Figura 6.2).

En el caso de realizar el proceso de sacarificación y fermentación de forma simultánea, la producción de azúcares tras 3 horas de hidrólisis de pieles de pomelo pre-tratadas no fue superior a la que se tiene a partir de pieles no pre-tratadas usando dosis enzimática REC. Cuando el proceso se lleva a cabo en botellas de 250 mL se obtuvieron 31,54 g azúcares fermentables / 100g de piel seca y 41,24 g azúcares totales/ 100g de piel seca, y, en el caso de bioreactores de 5 L, se tuvieron cantidades inferiores ($23,23 \pm 2,13$ g azúcares fermentables /100 g de piel seca y $33,60 \pm 0,89$ g azucares totales / 100 g de piel seca).

Una de las causas por las que no hay un aumento en el rendimiento en azúcares podría ser el efecto inhibitor sobre la hidrólisis de celulosa de ciertos compuestos generados durante el tratamiento de *steam explosion* (ácidos débiles, furanos que son productos de la degradación de la hemicelulosa, compuestos fenólicos e incluso monosacáridos). Se ha visto además, que la glucosa ejerce un fuerte efecto inhibitor sobre la velocidad de la hidrólisis (Prado et al., 2006; Lu et al., 2010).

Además, hay que destacar que la hidrólisis enzimática se puede ver limitada por, entre otros factores, el contenido en lignina que actúa como un escudo evitando que partes del sustrato sean hidrolizadas por los enzimas (Hendriks and Zeeman, 2009; Chang y Holtzapple, 2000).

En el caso de las pieles de pomelo, el contenido en lignina se encuentra alrededor de un 15%, casi el doble de lo que se tiene en pieles de mandarina y limón. Es por eso que puede haber una menor producción de azúcares cuando se usan dosis enzimáticas inferiores a la REC, y a pesar de que el material haya sido previamente sometido al pretratamiento de *steam explosion*. El pretratamiento libera las fibras de celulosa y hemicelulosa pero el alto contenido en lignina impide el buen transcurso de la hidrólisis enzimática.

Tabla 6.2. Producción de azúcares después de 24 horas de hidrólisis enzimática (dosis enzimática REC) de cortezas de pomelo sin pretratamiento de *steam explosion*, usando SF y distintas diluciones CPW:agua, en botellas de vidrio de 250 mL

| Dilución(GPW:agua,w/v) | GA ¹ | RAM | ARA ¹ | GLUC ¹ | GAL ¹ | XYL ¹ | FRUC ¹ | SUCR ¹ | FS ¹ | TS ¹ | D- limoneno (% v/v) |
|------------------------|-----------------|-------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-----------------|---------------------------|
| 1:8 | 13,71(0,05)a | 0,72(0,02)a | 3,20(0,13)a | 19,19(1,06)a | 2,29(0,25)a | 1,10(0,12)a | 20,13(1,37)a | 0,39(0,21)a | 39,72(2,56)a | 60,73(3,04)a | 0,048 |
| 1:4 | 12,35(0,17)a | 0,57(0,03)a | 3,11(0,01)a | 19,48(0,18)a | 2,08(0,06)a | 1,04(0,05)a | 19,02(0,31)a | 0,9 (0,20)a | 38,51(0,44)a | 58,56(0,60)a | 0,095 |
| 1:2 | 12,30(0,22)a | 0,57(0,08)a | 3,11(0,10)a | 20,85(0,10)a | 2,39(0,05)a | 1,13(0,01)a | 19,49(0,75)a | 2,57(1,13)a | 42,92(1,29)a | 62,41(1,25)a | 0,187 |
| 1:1 | 11,86(0,17)a | 0,63(0,06)a | 3,82(0,12)a | 21,24(0,53)a | 2,48(0,08)a | 1,09(0,01)a | 20,58(0,38)a | 2,46(0,67)a | 44,28(0,83)a | 64,16(0,86)a | 0,214 |

Media con desviación estándar entre paréntesis.

¹ Azúcares producidos tras la hidrólisis; GA-ác. Galacturónico, RAM-ramnosa, ARA-arabinosa, GLUC-glucosa, GAL-galactosa, XYL-xilosa, FRUC-fructosa, SUCR-sacarosa.

²FS: azúcares fermentables

³TS: azúcares totales en g/ 100 g de corteza seca.

Tabla 6.3. Producción de azúcares tras 24 horas de hidrólisis enzimática de cortezas de pomelo pre-tratadas por steam explosion (CPW: agua, 1:4 v/v)

| Dosis enzimática | GA ¹ | RAM ¹ | ARA ¹ | GLU ¹ | GAL ¹ | XYL ¹ | FRU ¹ | SUCR ¹ | FS ² | TS ³ |
|------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| Dosis 1 | 8,38(0,37)a | 0,20(0,01)a | 2,22(0,51)a | 14,89(0,69)a | 1,66(0,33)a | 0,87(0,19)a | 14,50(0,91)a | 0,00(0,00)a | 29,38(3,22)ab | 42,72(5,29)a |
| Dosis 2 | 13,07(0,97)b | 0,47(0,02)b | 1,64(0,03)b | 12,46(0,20)b | 1,15(0,03)b | 0,38(0,03)b | 15,07(0,13)ab | 1,00(0,38)b | 28,23(1,12)a | 44,24(1,15)a |
| Dosis 3 | 15,53(0,16)c | 0,34(0,03)c | 1,44(0,04)c | 13,08(0,42)b | 1,44(0,06)a | 0,43(0,00)b | 15,98(0,48)ab | 1,72(0,16)c | 30,78(1,06)b | 49,96(1,04)b |
| Dosis 4 | 12,58(0,22)b | 0,20(0,09) a | 1,61(0,32)abc | 17,26(3,00)a | 2,03(0,74)a | 0,94(0,18)a | 16,15(0,95)ab | 2,06(0,39)c | 35,47(3,66)b | 52,83(0,33)c |
| Dosis 5 | 12,99(0,46)b | 0,00(0,00)d | 1,84(0,24)ab | 15,49(1,25)a | 1,93(0,26)a | 0,86(0,18)a | 16,46(0,80)b | 1,55(0,21)c | 33,50(0,86)b | 51,14(2,01)bc |

Media con desviación estándar entre paréntesis.

¹ Azúcares producidos tras la hidrólisis; GA-ác. Galacturónico, RAM-ramnosa, ARA-arabinosa, GLUC-glucosa, XYL-xilosa, GAL-galactosa, FRUC-fructosa, SUCR-sacarosa.

²FS: azúcares fermentables

³TS: azúcares totales en g/ 100 g de corteza seca.

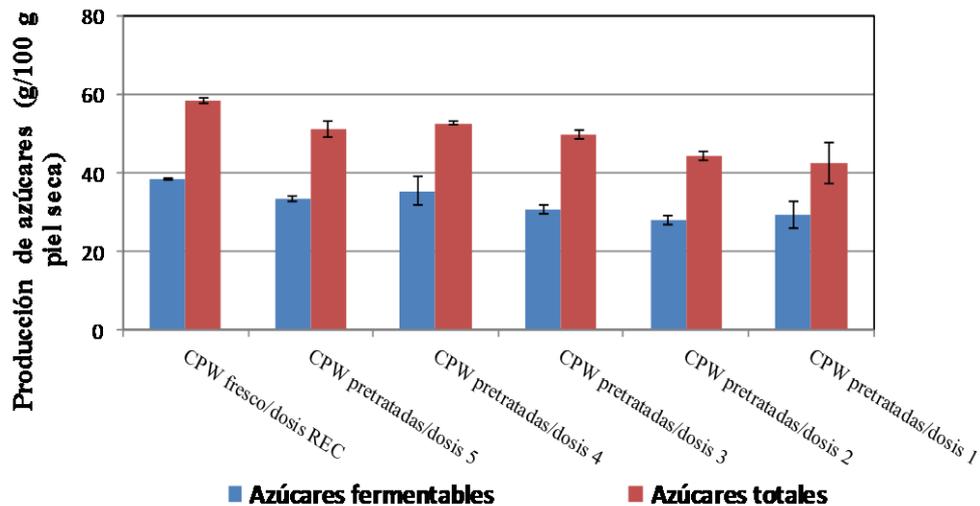


Figura 6.2. Producción de azúcares después de 24 horas de hidrólisis enzimática de cortezas frescas de pomelo (dosis REC), y de cortezas pretratadas con *steam explosion* (con dilución CPW: agua de 1:4 v/v), y usando proceso SF y las dosis enzimáticas de la Tabla 3.2. Los valores de la dosis REC (mg de proteína / g piel seca) fueron: 5 mg de pectinasa, 2 mg de β -glucosidasa, 2,1 mg de celulasa.

6.4. Influencia del pretratamiento de *steam explosion* sobre la producción de etanol y otros co-productos de cortezas de pomelo.

En la Tabla 6.4 se muestra la producción de etanol a partir de cortezas de pomelo pretratadas con *steam explosion*, y según los procesos SF y SSF, en botellas de 250 mL y usando distintas dosis enzimáticas. Cuando se hizo hidrólisis y fermentación por separado, la máxima producción de etanol que se obtiene fue con la dosis enzimática más baja y resultó ser de 50 L / 100 kg CPW de pomelo. Es de destacar que, en el caso del proceso SF, una mayor dosis enzimática no está relacionada con un mayor rendimiento en etanol.

Los ensayos de SF realizados con cortezas de pomelo pretratadas con *steam explosion*, y con diluciones de CPW:agua de 2:1 (Figura 6.5), mostraron resultados satisfactorios para la producción de etanol. Para una misma dosis enzimática (dosis 1 de la Tabla 3.3.), el rendimiento en etanol fue de aproximadamente el doble cuando la dilución de pieles de pomelo en agua era menor (CPW:agua de 2:1, v/v) e incluso

reduciendo la dosis de pectinasa añadida para la hidrólisis. Se alcanzaron valores de $59,9 \pm 1,13$ L/ 1000 kg CPW de pomelo.

Cuando la sacarificación y fermentación tienen lugar de forma simultánea, hay una mejora en el rendimiento en etanol, alcanzándose valores de entre 60 y 70 L/ 1000 kg CPW de pomelo, pero, al contrario que ocurre en el proceso SF, el máximo valor se obtuvo cuando la dilución de las cortezas en agua fue mayor (CPW:agua 1:4, v/v). El que la sacarificación tenga lugar durante todo el proceso, y conjuntamente con la fermentación, mejora notablemente el rendimiento en etanol, aun cuando el contenido inicial en azúcares sea no muy elevado, como se ha visto en el apartado 6.3.

La cantidad de etanol producido a partir de pieles de pomelo pretratadas con *steam explosion* y según el proceso SSF, y con la menor dosis enzimática, fue de $67,45 \pm 1,92$ L/1000 kg CPW. Este rendimiento es superior al alcanzado con pieles de limón y mandarina. Se pone de manifiesto que los subproductos de la extracción de zumo de pomelo constituyen una biomasa (una materia prima) con un alto potencial en la producción de etanol. Se ha conseguido un rendimiento en etanol de 60 L/1000 kg CPW de pomelo, mediante el proceso de hidrólisis y posterior fermentación, y reduciendo un 70% la dosis enzimática de referencia de pectinasa, celulasa y β -glucosidasa.

Tabla 6.4. Producción de etanol (L etanol /1000 kg CPW de pomelo) tras el procesado SF y SSF de cortezas de pomelo pretratadas con *steam explosion* (con diluciones de CPW:agua de 1:4 v/v), y usando diferentes dosis enzimáticas, en botellas de vidrio de 250 mL.

| Dosis enzimática | Proceso SF | Proceso SSF |
|------------------|-------------|-------------|
| Dosis 1 | 50,68±13,1a | 39,18±7,50a |
| Dosis 2 | 42,00±1,18a | 68,36±4,86b |
| Dosis 3 | 49,10±13,0a | nd |
| Dosis 4 | 32,80±3,60b | nd |
| Dosis 5 | 31,37±0,48b | 67,45±1,92b |

Media (n=3) con su desviación típica. Los datos con una misma letra no tienen diferencias significativas, siendo $p \leq 0,05$. nd: no existen datos

Tras la fermentación de pieles de pomelo mediante el proceso SF, se obtuvieron los contenidos de CPP que se indican en la Figura 6.3, y usando distintas concentraciones enzimáticas. La máxima producción se tuvo para la menor dosis enzimática, y fue alrededor de 45 kg CPP/1000 kg CPW pomelo. Para el resto de dosis enzimáticas se tuvo una producción de entre 20-40 kg CPP/ 1000 kg CPW pomelo.

En cuanto a la producción de ácido galacturónico (kg/ 1000 kg CPW pomelo), después de la hidrólisis enzimática de la pieles de pomelo pretratadas (Figura 6.4), fue ligeramente superior en el caso de la dosis enzimática más baja y fue de $30,07 \pm 0,305$ kg/ 1000 CPW pomelo. Algo parecido ocurre con la producción de CPP.

Los trabajos de Wilkins et al. (2007b) sobre la producción de bioetanol a partir de pieles de pomelo, mostraron que la hidrólisis enzimática de estas cortezas no tratadas daba lugar a una mayor producción de ácido galacturónico cuando las concentraciones de pectinasa son superiores. En nuestro caso también ocurre lo mismo, aunque esa producción no es muy superior a la que se obtiene en el resto de los casos. Se comprueba también que las distintas concentraciones de β -glucosidasa y celulasa no tienen ninguna influencia sobre la cantidad de ácido galacturónico producido. En todos los casos la producción fue en torno a 25 kg/1000 kg CPW pomelo.

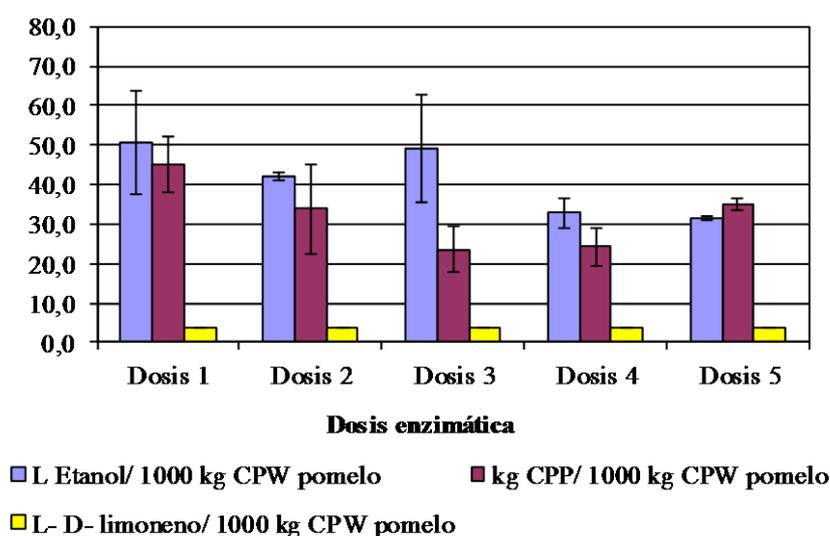


Figura 6.3. Etanol y co-productos obtenidos con el procesado SF de pieles de pomelo pretratadas con *steam explosion* (con diluciones de CPW:agua de 1:4 v/v; y usando diferentes concentraciones enzimáticas de Pectinex, Celluclast y Novozyme).

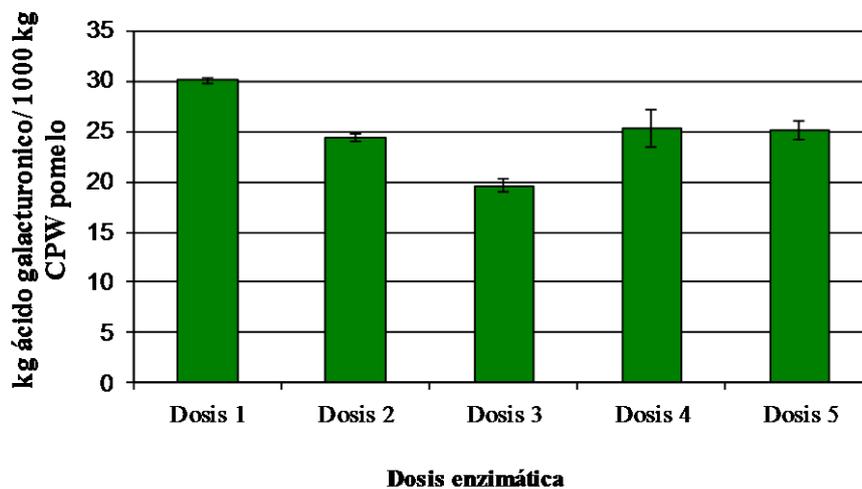


Figura 6.4. Producción de ácido galacturónico (kg/ 1000 kg CPW pomelo) tras la hidrólisis enzimática, con distintas dosis enzimáticas, de la pieles de pomelo pretratadas con *steam explosion* (con diluciones CPW:agua de 1:4 v/v).

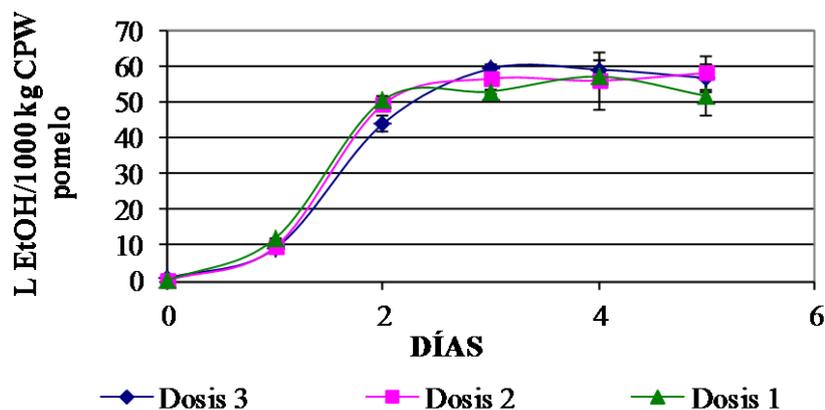


Figura 6.5. Curvas de producción de etanol (en L/1000 kg CPW pomelo) obtenidas con el procesado SF de pieles de pomelo pretratadas con *steam explosion* (con diluciones CPW: agua de 2:1 v/v), usando distintas dosis enzimáticas, en botellas de vidrio de 250 mL. Las dosis enzimáticas utilizadas (mg proteína/mg corteza seca) son las que se indican en la Tabla 3.3.

6.5. Producción de bioetanol con cortezas y pulpas de pomelo a escala piloto en bioreactor.

La Figura 6.6 muestra la producción de etanol en bioreactores de 5 L y botellas de vidrio de 250 mL, a partir de cortezas de pomelo pretratadas con *steam explosion*, con procesado SSF (a 37°C), y utilizando una dilución GCPW: agua de 2:1 v/v. Se consiguió una producción máxima de aproximadamente 50 L/1000 kg de GCPW fresca a los 5 días en bioreactores de 5 L, siendo inferior cuando el proceso se hizo en botellas de 250 mL (40 L/1000 kg GCPW fresca).

Estos resultados, a diferencia de los obtenidos con el proceso SF, revelan que a pesar del aumento en el contenido de los enzimas pectinasa, β -glucosidasa y celulasa (cerca de la dosis de referencia), un menor contenido de agua durante la hidrólisis y fermentación de cortezas de pomelo pretratadas con *steam explosion* (CPW:agua, 2:1 v/v) da lugar a rendimientos en etanol iguales o inferiores a los obtenidos en los ensayos SSF, con diluciones GCPW:agua de 1:4 v/v y usando menores dosis de enzimas.

Es de destacar que cuando se realiza el proceso SF el rendimiento en azúcares fermentables, tras 24 horas de hidrólisis fue de entre 35-40 g/100 g corteza seca y de entre 30-35 g/100 g corteza seca, para diluciones CPW:agua de 2:1 y 1:4, respectivamente. En estos casos, la producción de etanol fue de 60 L/ 1000 kg GCPW para una dilución CPW:agua de 2:1 y de 50 L/ 1000 kg GCPW en el caso de 1:4.

Por el contrario, cuando el proceso utilizado es el SSF, con hidrólisis y fermentación simultáneas, con tan sólo 3 horas de fermentación, y con dilución CPW:agua de 1:4, se tuvo un rendimiento en azúcares ligeramente inferior al del proceso SF (23-30 g/100 g corteza seca) y una producción de etanol de 68 L/1000 kg GCPW. En poco tiempo, se consigue el mismo rendimiento que tras 24 horas, por lo que rápidamente los azúcares fermentables empiezan a ser consumidos por las levaduras y los enzimas continúan realizando la hidrólisis de los carbohidratos complejos de forma que se alcanza la máxima producción de etanol.

Alfani et al. (2000) observaron que el pretratamiento de *steam explosion* de la paja de trigo como biomasa para la producción de etanol, producía inhibidores de la hidrólisis como residuos de lignina que precipitan en agua y se depositan sobre las fibras de celulosa, dificultando el acceso de los enzimas para su hidrólisis. En estos estudios se comprobó que el lavado de esta biomasa pretratada producía una disminución de estos compuestos inhibidores y que si además aumentaba el pH (mediante lavado con NaOH) se mejoraba la accesibilidad de los enzimas a las fibras de celulosa.

Es por ello que, considerando el alto contenido de lignina de las cortezas de pomelo, se podría pensar que el aumento en el contenido de agua de lugar a un aumento de pH y una disminución en la concentración de los residuos de lignina generados tras el pretratamiento, favoreciendo, por tanto, la hidrólisis en el proceso de sacarificación y fermentación simultáneas, y el aumento del rendimiento en etanol.

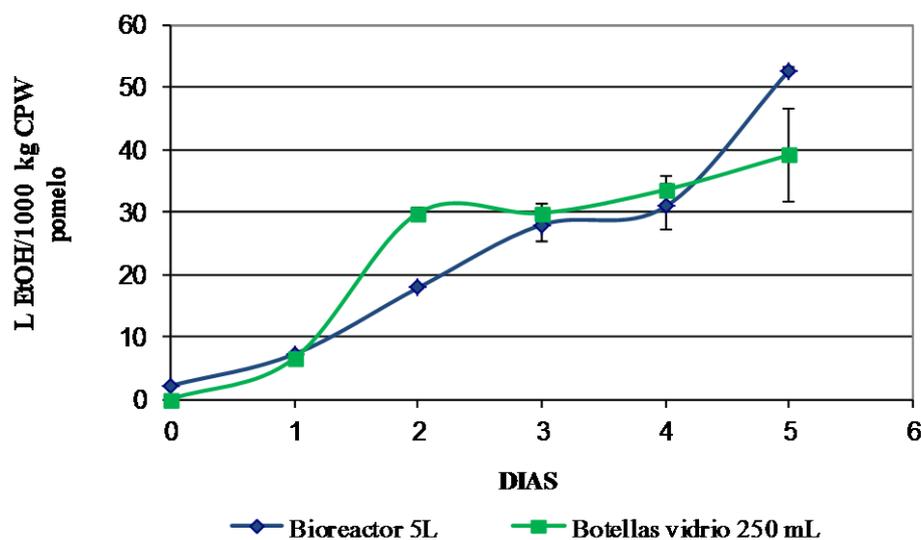


Figura 6.6. Curvas de producción de etanol (en L/1000 kg CPW pomelo) obtenidas tras el procesado SSF de pieles de pomelo pretratadas con *steam explosion* (con diluciones CPW: agua de 2:1 v/v), usando distintas dosis enzimáticas, en bioreactores de 5L.

Las dosis enzimáticas utilizadas (mg proteína/mg corteza seca) fueron: 2,21 mg pectinasa, 1,95 mg β -glucosidasa y 1,82 mg celulasa.

El residuo CPP que queda tras la fermentación fue analizado y se comprobó que, durante los pretratamientos y la fermentación, hubo una degradación de la pectina y de la hemicelulosa liberada tras el tratamiento de *steam explosion*. Los CPP de pomelo tras un proceso SSF y usando las dosis enzimáticas indicadas generan un residuo rico, además de en proteínas, en celulosa, lignina y hemicelulosa.

La cantidad de CPP producida fue de $26,33 \pm 2,86$ kg CPP/ 1000 kg GCPW a escala piloto (en bioreactor) y de $15,75 \pm 1,02$ kg CPP/ 1000 kg GCPW en botellas de 250 mL. En ambos casos, la producción es inferior a los obtenidos con pieles de mandarina o limón, en igualdad de condiciones.

Los aceites esenciales de las cortezas de pomelo, recuperados tras el pretratamiento de *steam explosion*, fueron alrededor del 90% del contenido total presente. Las cortezas frescas de pomelo presentan una concentración inicial de aceites esenciales de aproximadamente 0,4% v/v, mientras que tras el tratamiento con *steam explosion* este valor fue de 0,03% v/v. Se obtienen aproximadamente 4 L de aceites esenciales de corteza de pomelo por cada tonelada de subproductos frescos.

6.6. Influencia del contenido en aceites esenciales de las cortezas de pomelo en la producción de azúcares y etanol.

La Figura 6.7 muestra la influencia del contenido en aceites esenciales de pieles de pomelo no pretratadas sobre la producción de bioetanol tras un proceso SF. Es de destacar que cuando la concentración en aceites esenciales es superior a 0,05% (v/w) hay una inhibición casi total de la producción de etanol. A diferencia de otros cítricos, la concentración en aceites esenciales tiene que ser inferior a este valor para asegurar que la fermentación se lleve a cabo.

Tras el pretratamiento de *steam explosion*, se elimina gran parte de los aceites esenciales presentes en estas cortezas, de forma que los ensayos de hidrólisis y fermentación se hicieron con diluciones CPW:agua de 1:4 y 2:1 v/v con una concentración de estos aceites de 0,006% y 0,02% (v/w), respectivamente.

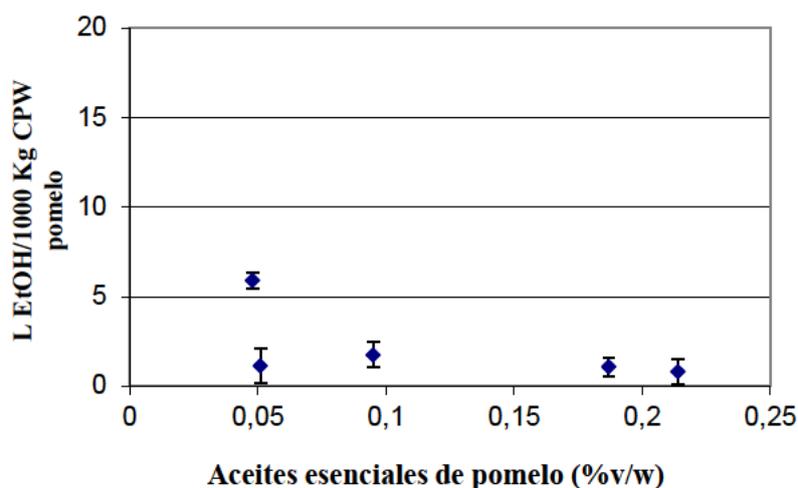


Figura 6.7. Influencia del contenido en aceites esenciales de pieles de pomelo no pretratado con *steam explosion* sobre la producción de etanol (L/1000 kg CPW pomelo) tras un proceso SF.

6.7. Conclusiones

De los resultados obtenidos se deduce que las cortezas de pomelo constituyen una excelente materia prima para la producción de etanol, obteniéndose un rendimiento de alrededor de 68 L/ 1000 kg GCPW, tras la hidrólisis (con dosis enzimática un 70% menor que la dosis de referencia) y fermentación simultáneas de cortezas pretratadas y diluidas en agua en una proporción CPW:agua de 1:4 (v:v).

Tras los procesos de hidrólisis y fermentación de cortezas de pomelo frescas o pretratadas, no se ha visto un aumento en el rendimiento en azúcares como consecuencia del pretratamiento de *steam explosion*, tanto si se realiza un proceso SF como SSF. Este hecho se podría deber al alto contenido de lignina de esta biomasa (casi el doble que la de las cortezas de limón y mandarina) que actúa como escudo, evitando que partes del sustrato sean hidrolizadas.

Sin embargo, el pretratamiento de *steam explosion* resulta fundamental para eliminar los aceites esenciales de estas cortezas de pomelo, que se ha visto que ejercen un potente efecto inhibitor de la fermentación, llegando a paralizarla totalmente cuando la concentración supera el 0,05% (v/w)

Cuando se realiza el proceso SF, la máxima producción de etanol se produce con diluciones CPW:agua de 2:1 v/v. Sin embargo, en el caso de realizar la hidrólisis y fermentación simultáneas, la producción continua de azúcares hasta el final del proceso se ve favorecida por un mayor contenido en agua (diluciones CPW:agua de 1:4, v:v).

CAPÍTULO 7

Obtención de bioetanol y coproductos de las cortezas y pulpas de naranja

Parte del texto de este Capítulo ha sido publicado en el trabajo:

- Boluda-Aguilar, M., Belisario-Sánchez, Y.Y., López-Gómez, A (2010). Modified steam explosion process for pre-treatment of citrus peel wastes. En: FITO, P., TOLDRA, F. (Eds.), *Food Innova 2010*. ISBN 978-84-693-5010-2, Valencia, España.

7.1. Introducción

La naranja representa el 55% de la producción mundial de cítricos, alcanzándose producciones en 2010 de hasta 69.507.617 t (FAO, 2010). A nivel europeo, en este mismo año se tuvo una producción de 6.495.029 t.

Los desechos procedentes del procesado de naranjas suponen un 50% del peso total del fruto. Hasta hace relativamente pocos años, estas cortezas de naranja se secaban, se prensaban en pellets (obteniendo el denominado CPP), y se vendían con un precio relativamente bajo, pero estas instalaciones de secado y pelletizado implican una gran inversión de capital por parte de la industria que en muchas ocasiones no se ve compensada por las ventas de este CPP. Por ello, cada vez más, se está optando por el simple uso de estos subproductos en estado fresco, para alimentación animal. Pero, debido a que este uso no puede absorber toda la producción durante la cosecha de cítricos, finalmente estos subproductos se pueden convertir en un vertido incontrolado, generando un grave problema medioambiental.

Existen diversos estudios donde se pone de manifiesto el éxito de la hidrólisis enzimática de las cortezas de naranja para la liberación de azúcares fermentables que puedan ser convertidos en etanol (Wilkins et al., 2007; Grohmann et al., 1994, 1995 y 1996; Hari et al., 2000). Pero, solamente algunos de estos trabajos han estudiado el interés del pretratamiento de *steam explosion* para la separación / liberación de carbohidratos complejos, para que puedan ser convertidos en azúcares fermentables con bajas dosis de enzimas. En los distintos trabajos de la bibliografía, y a diferencia de los demás cítricos, se pone de manifiesto que el rendimiento en etanol no supera los 40 L/1000 kg OCPW (Wilkins, 2007b y Widmer et al., 2010).

7.2. Influencia del pretratamiento de *steam explosion* sobre la composición de las cortezas de naranja

Las imágenes SEM de microscopía electrónica de barrido de las cortezas frescas de naranja (Foto 7.1) y pretratadas mediante *steam explosion* (Foto 7.2), muestran la eficacia del pretratamiento de *steam explosion*, en cuanto a que provocan la ruptura de la pared celular (Foto 7.2A) y la separación / liberación de fibras de celulosa (Foto 7.2B y 7.2C). Como resultado del pretratamiento de *steam explosion* se produce una cierta despolimerización y rotura de los enlaces de forma que la celulosa queda más accesible a la hidrólisis enzimática. La Foto 7.1 muestra una glándula oleífera de corteza de naranja no pretratada en donde se acumulan los aceites esenciales, los cuales serán separados y recuperados con este pretratamiento.

Se ha estudiado, mediante análisis termogravimétrico, la composición de las cortezas de naranja frescas, de naranjas pretratadas por *steam explosion* y del residuo CPP que queda tras la hidrólisis y fermentación (Figura 7.1). Los resultados (Tabla 7.1) muestran que las pieles de naranja frescas tienen una composición muy similar a las pieles de mandarina, aunque tienen un alto contenido en lignina (alrededor del 16% pf).

Igual que ocurre con el resto de pieles de cítricos sometidos a tratamiento de *steam explosion*, la hemicelulosa aparece compuesta por dos fracciones distintas que se degradan separadamente debido a que una tiene una mayor estabilidad térmica que la otra. Estas fracciones se encuentran aproximadamente al 50% con respecto al total de hemicelulosa presente en la corteza. También se ha visto que tanto la pectina, como la celulosa y la lignina se encuentran en iguales proporciones antes y después del pretratamiento de las cortezas de naranja.

Además, se ha observado que el residuo CPP resultante tras la hidrólisis y fermentación de estas pieles es rico en polisacáridos (3,16% pf de humedad, 11,11% pf de pectina, 14,8% pf de hemicelulosa, 30,0% pf de celulosa, 19,8% pf de lignina y 3% pf de cenizas).

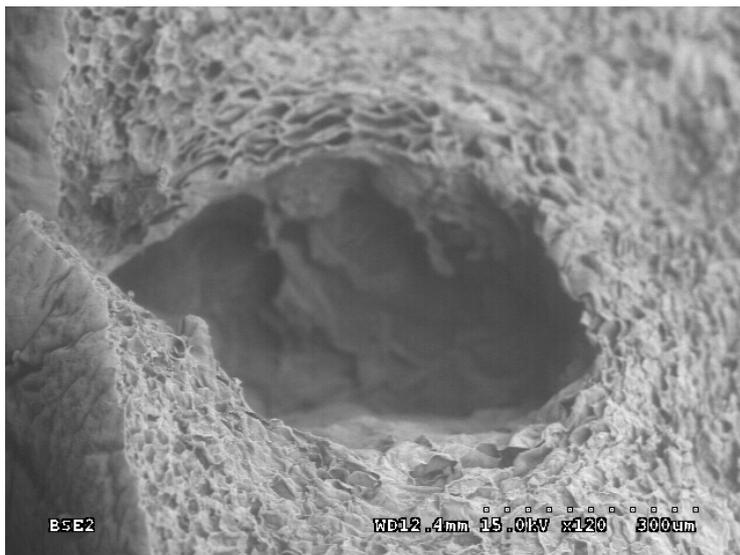


Foto 7.1. Imagen SEM de la corteza fresca de naranja sin pretratamiento de *steam explosion*. Se aprecian las paredes celulares y la glándula oleífera intactas.

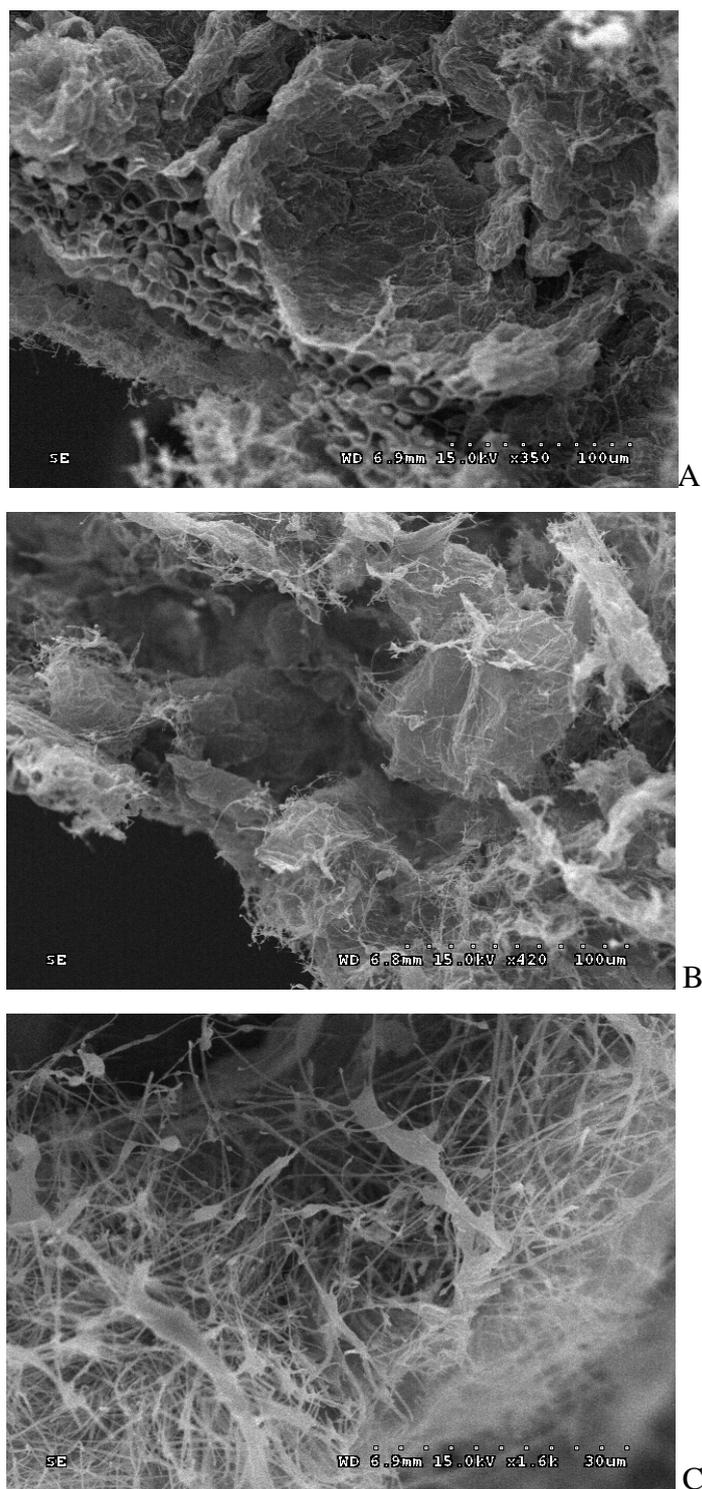


Foto 7.2. Imágenes SEM de cortezas de naranja pretratadas con *steam explosion*. Se aprecian tanto la ruptura de las paredes celulares (A y B), como la separación de las fibras de celulosa.

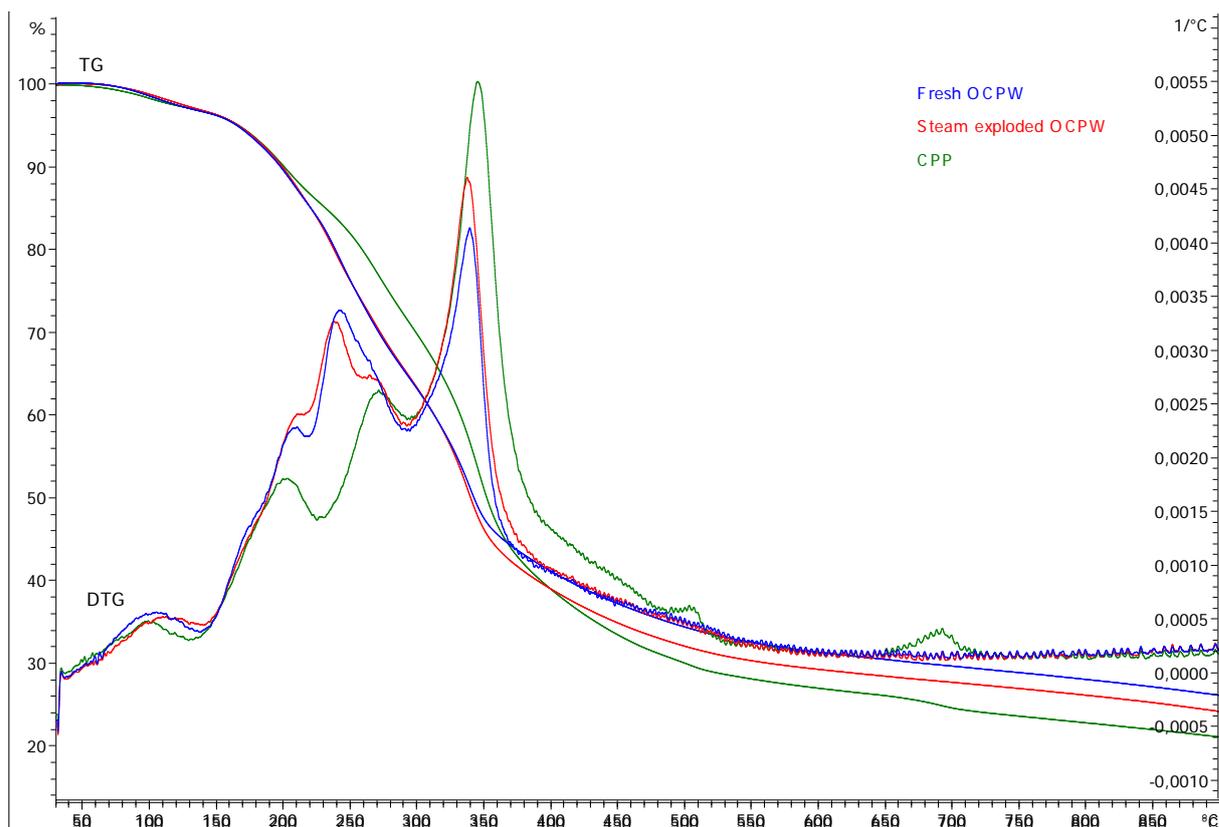


Figura 7.1. Curvas TG-DTG de las cortezas frescas de naranja y pretratadas mediante *steam explosion* y del CPP obtenido tras la hidrólisis enzimática y fermentación.

Tabla 7.1. Composición química de las cortezas frescas de naranja, tras el pretratamiento de *steam explosion* y tras la fermentación (CPP)

| | Agua (% pf) | Pectina (% pf) | Hemicelulosa a (% pf) | Hemicelulosa b (% pf) | Celulosa (% pf) | Lignina (% pf) | Carbón (% pf) | Cenizas (% pf) |
|-------------------------|--------------------|-----------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| CPW naranja fresca | 3,38±0,31 | 12,28±1,12 | 19,98±1,82 | 0,0±0,0 | 22,05±2,01 | 16,24±1,48 | 22,28±2,04 | 3,84±0,35 |
| CPW naranja pre-tratado | 2,13±0,22 | 13,02±1,38 | 9,24±0,98 | 11,69±1,24 | 23,52±2,49 | 16,48±1,75 | 19,83±2,10 | 3,00±0,36 |
| CPP | 3,16±0,32 | 11,11±1,13 | 14,78±1,51 | 0,0±0,0 | 30,00±3,00 | 19,72±2,02 | 16,87±1,72 | 4,40±0,45 |

7.3. Influencia del pretratamiento de *steam explosion* sobre la producción de azúcares en la hidrólisis enzimática de cortezas de naranja

En las Tablas 7.2 y 7.3 se muestra la composición en azúcares de las cortezas de naranja hidrolizadas enzimáticamente, sin pretratamiento de *steam explosion* (Tabla 7.2), y con pretratamiento de *steam explosion*. La Tabla 7.2 muestra la producción de azúcares tras 24 horas de hidrólisis enzimática (usando las dosis REC), de cortezas de naranja no sometidas a *steam explosion*, para distintas condiciones de dilución CPW:agua. Los análisis estadísticos realizados no muestran diferencias significativas en el contenido de azúcares de las cortezas de naranja hidrolizadas con distintas diluciones de CPW:agua. Por ello, y teniendo en cuenta que la adición de agua supone un gasto adicional de procesado, se podría realizar la hidrólisis enzimática con el menor grado de dilución en agua, sin que se espere una merma significativa de rendimiento de azúcares.

La cantidad de azúcares fermentables y totales producidos tras 24 horas de hidrólisis de cortezas de naranja frescas oscilaron dentro de los intervalos 23,58-38,06 y 48,64-63,13 g de azúcar/100 g piel seca, respectivamente (Tabla 7.2). Estos valores son similares a los obtenidos a partir de mandarina y ligeramente superiores a los de limón. Los trabajos de Pourbafrani et al. (2007) mostraron mejores resultados tras la hidrólisis enzimática (dosis REC) de cortezas de naranja frescas con valores de 67,5 g azúcares totales / 100 g piel seca. Wilkins et al. (2005) realizaron la hidrólisis de pieles de naranja con dosis inferiores a la dosis REC (1,7 mg pectina, 1,4 mg celulasa y 1,5 mg β -glucosidasa) y consiguieron una producción de azúcares fermentables de 40 g / 100 g piel seca.

Los ensayos de hidrólisis enzimática, con un 99% menos de pectinasa y un mayor contenido en celulasa y β -glucosidasa (un 19% y 44% superior) con respecto a la dosis REC, realizados por Widmer (2010), mostraron un rendimiento en azúcares totales más o menos similar al obtenido en esta Tesis, de 57,66 g azúcar / 100 g piel seca. En este trabajo se vio que, tras la hidrólisis enzimática de estas cortezas, el rendimiento en azúcares totales fue más del doble del contenido inicial de las pieles de naranja fresca (24,43 g / 100 g piel seca).

A continuación (Tabla 7.3), se muestra el rendimiento en azúcares después de la hidrólisis enzimática, utilizando dosis inferiores a la dosis REC, de pieles de naranja pretratadas con *steam explosion*, con dilución CPW: agua de 1:4 w/v (25 g de pieles pretratadas en 100 mL de agua). La cantidad de enzimas utilizadas se corresponde con las detalladas en la Tabla 3.2. No se ha observado una relación directa entre la dosis enzimática utilizada y el rendimiento de azúcares tras la hidrólisis. Los rendimientos máximos se obtuvieron cuando se tenía una reducción en enzimas del 30% en celulasa y β -glucosidasa y del 70% en pectinasas, con respecto a la dosis de referencia REC.

Además, se ha visto que, en general, el pretratamiento no mejora el rendimiento en azúcares producidos tras la hidrólisis enzimática (con dosis enzimáticas inferiores a la REC) de pieles de naranja, si se compara con los obtenidos con pieles no pretratadas, pero hidrolizadas con dosis enzimática superior. En el caso de realizar el pretratamiento, la producción fue de entre 23,59 y 37,46 g azúcares fermentables / 100 g piel seca y de entre 38,28 y 62,22 g azúcares totales / 100 g piel seca. Estos resultados coinciden con los obtenidos mediante cortezas de pomelo. Es decir, en ambos casos, la hidrólisis enzimática de estas pieles con las distintas dosis estudiadas da lugar a una misma cantidad de azúcares, tanto si se realiza pretratamiento de *steam explosion* como si no. Sin embargo, contradicen a los obtenidos en los trabajos de Widmer et al. (2010), en los cuales se vio un aumento de más del 20% en la producción de azúcares totales de naranja sometida a pretratamiento de *steam explosion* y posterior hidrólisis enzimática con un 99% menos de pectinasa y mayor contenido en celulasa y β -glucosidasa (un 19% y 44% superior), con respecto a la dosis REC.

En el caso de realizar el proceso de sacarificación y fermentación de forma simultánea, la producción de azúcares a las 3 horas de hidrólisis de pieles de naranja pretratadas fue de $53,9 \pm 9,6$ g azúcares totales / 100 g piel seca y de $43,1 \pm 3,35$ g azúcares fermentables / 100 g piel seca.

Tras seis días de sacarificación y fermentación simultáneas de estas pieles de naranja pretratadas, a pesar de haber alcanzado la máxima producción de etanol (ver Figura 7.6), el contenido en azúcares fermentables era aún elevado ($32,78 \pm 8,2$ g azúcares / 100 g piel seca).

Según esto, parece lógico pensar que puedan existir, en mayor concentración que en los demás cítricos, compuestos inhibidores de la fermentación que impidan que se produzca la máxima producción de etanol a pesar del alto contenido en azúcares fermentables. Widmer et al. (2010) observaron que durante la degradación de las hexosas y las pentosas se produce HMF y furfural, respectivamente. Además, en muchas ocasiones aparece también el ácido acético como un importante inhibidor del crecimiento de las levaduras y de su metabolismo, y éste se puede producir como consecuencia de la ruptura de los enlaces de la hemicelulosa cuando se somete a alta temperatura y presión, en condiciones ácidas.

Dado el alto contenido en lignina de estas cortezas de naranja, y después de que algunos estudios, como el de Palmqvist y Hahn-Hagerdal (2000), hayan observado la aparición de compuestos fenólicos derivados de la degradación de la lignina con efecto adverso sobre el crecimiento de microorganismos, se puede considerar también como una de las causas de inhibición de la fermentación de hidrolizados de pieles de naranja pretratadas con *steam explosion*.

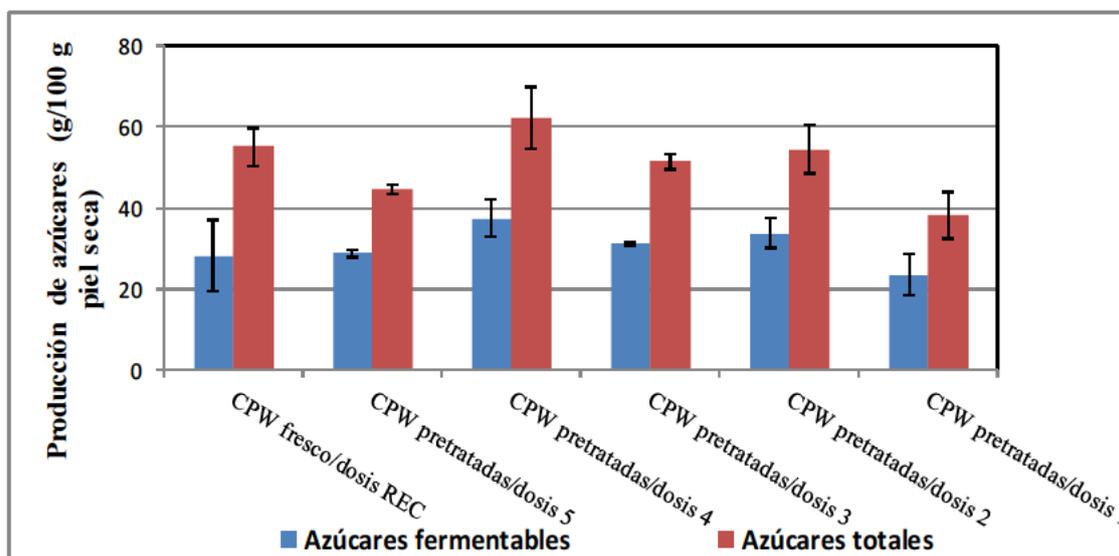


Figura 7.2. Producción de azúcares después de 24 horas de hidrólisis enzimática de cortezas frescas de naranja (con dosis REC), y de cortezas pretratadas con *steam explosion* (con dilución

CPW: agua de 1:4 v/v), y usando proceso SF y las dosis enzimáticas de la Tabla 3.2.

Los valores de la dosis REC (mg de proteína / g piel seca) fueron: 5 mg de pectinasa, 2 mg de β -glucosidasa, 2,1 mg de celulasa

Tabla 7.2. Producción de azúcares después de 24 horas de hidrólisis enzimática (dosis enzimática REC) de cortezas de naranja sin pretratamiento de *steam explosion*, usando SF y distintas diluciones CPW:agua, en botellas de vidrio de 250 mL.

| Dilución (OCPW:water, v/v) | GA ¹ | RAM | ARA ¹ | GLUC ¹ | GAL ¹ | XYL ¹ | FRUC ¹ | SUCR ¹ | FS ¹ | TS ¹ | D-limonene (% v/v) |
|----------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------|
| 1:8 | 14,86(2,15) ^a | 1,07(0,33) ^a | 4,97(0,87) ^a | 8,43(0,78) ^a | 3,21(0,04) ^a | 0,95(0,01) ^a | 10,72(0,78) ^a | 4,43(1,15) ^a | 23,58(1,15) ^a | 48,64(1,76) ^a | 0,028 |
| 1:4 | 15,19(0,26) ^a | 0,78(0,08) ^a | 5,06(0,34) ^a | 13,60(1,00) ^a | 2,95(0,35) ^a | 1,11(0,07) ^a | 11,03(5,49) ^a | 5,40(0,64) ^a | 28,11(8,71) ^a | 55,12(4,58) ^a | 0,095 |
| 1:2 | 13,99(0,40) ^a | 0,60(0,14) ^a | 5,56(1,02) ^a | 20,64(4,36) ^a | 3,74(0,76) ^a | 1,18(0,25) ^a | 17,42(3,42) ^a | 0,00(0,00) ^b | 38,06(7,83) ^a | 63,13(9,99) ^a | 0,085 |
| 1:1 | 14,23(0,13) ^a | 0,55(0,25) ^a | 5,30(1,15) ^a | 12,84(5,62) ^a | 3,45(0,47) ^a | 0,92(0,09) ^a | 12,36(1,90) ^a | 0,00(0,00) ^b | 25,20(7,52) ^a | 49,65(5,73) ^a | 0,128 |

Media con desviación estándar entre paréntesis.

¹ Azúcares producidos tras la hidrólisis; GA-ác. Galacturónico, RAM-ramnosa, ARA-arabinosa, GLUC-glucosa, GAL-galactosa, XYL-xilosa, FRUC-fructosa, SUCR-sacarosa.

²FS: azúcares fermentables

³TS: azúcares totales en g/ 100 g de corteza seca.

Tabla 7.3. Producción de azúcares tras 24 horas de hidrólisis enzimática de cortezas de naranja pretratadas con *steam explosion* (CPW: agua, 1:4 v/v).

| Dosis enzimática | GA ¹ | RAM ¹ | ARA ¹ | GLU ¹ | GAL ¹ | XYL ¹ | FRU | SUCR ¹ | FS ² | TS ³ |
|------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|---------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| Dosis 1 | 7,83(0,75)a | 0,25(0,04)a | 2,96(0,47)a | 12,16(2,90)a | 3,04(0,22)a | 0,65(0,10)a | 11,35(2,12)a | 0,01(0,01)a | 23,59(5,01)a | 38,28(5,82)a |
| Dosis 2 | 13,40(1,28)b | 0,49(0,08)b | 2,94(0,33)a | 16,86(2,40)ab | 3,41(0,53)ab | 0,66(0,18)a | 16,35(1,34)b | 0,38(0,01)b | 33,61(3,76)bc | 54,54(6,17)bc |
| Dosis 3 | 13,78(1,24)b | 0,28(0,06)a | 2,48(0,02)b | 15,25(0,07)a | 3,19(0,36)a | 0,60(0,14)a | 14,45(0,01)c | 1,28(0,30)c | 31,00(0,38)b | 51,35(2,05)b |
| Dosis 4 | 14,46(1,37)b | 0,27(0,05)a | 2,96(0,53)ab | 20,26(3,18)b | 4,47(0,80)b | 0,92(0,01)b | 16,47(2,36)bc | 2,39(1,33)c | 37,46(4,52)c | 62,22(7,53)c |
| Dosis 5 | 10,24(0,07)c | 0,50(0,06)b | 2,22(0,08)c | 15,07(0,33)a | 2,43(0,09)c | 0,86(0,04)b | 13,64(0,67)c | 0,02(0,00)a | 28,72(0,98)a | 44,68(1,23)a |

Media con desviación estándar entre paréntesis.

¹Azúcares producidos tras la hidrólisis; GA-ác. Galacturónico, RAM-ramnosa, ARA-arabinosa, GLUC-glucosa, GAL-galactosa, XYL-xilosa, FRUC-fructosa, SUCR-sacarosa.

²FS: azúcares fermentables

³TS: azúcares totales en g/ 100 g de corteza seca.

7.4. Influencia del pretratamiento de *steam explosion* sobre la producción de etanol y otros co-productos de cortezas de naranja

Los resultados de producción de etanol tras la hidrólisis y fermentación, realizadas de forma separada (SF) o simultánea (SSF), de cortezas de naranja pretratadas usando diferentes dosis enzimáticas se muestran en la Tabla 5.4.

A diferencia de lo que sucede en el resto de cítricos estudiados hasta ahora, el proceso SSF no mejora el rendimiento en etanol de las cortezas pretratadas. En el caso del proceso SF, la mayor producción se obtuvo cuando se utilizaron las dosis enzimáticas 1, 2 y 5 (de la Tabla 3.2), con valores aproximados de 34 – 37 L/ 1000 kg CPW. Si se realiza el proceso SSF, la distintas dosis enzimáticas no tienen influencia sobre el rendimiento en etanol, obteniéndose alrededor de 35-38 L / 1000 kg CPW.

Teniendo en cuenta que, tal como se ha visto en el apartado anterior, la producción de azúcares mediante procesos SF o SSF a partir de las pieles de naranjas pretratadas no es el factor limitante en la producción de etanol, parece lógico pensar que debe haber compuestos que inhiban la fermentación para que no se pueda conseguir el máximo rendimiento en etanol.

En los trabajos de Oberoi et al. (2010) se observó una máxima producción de etanol a partir de cortezas de naranjas pretratadas mediante *steam explosion* e hidrólisis ácida de 39,4 L/ 1000 kg CPW. Wilkins et al. (2007) realizaron el pretratamiento de *steam explosion* antes de la hidrólisis y fermentación de las cortezas de naranja (proceso SSF y dosis enzimática 5 de la Tabla 3.2) y el rendimiento fue también similar al nuestro (40 L/ 1000 kg CPW).

Para el caso de la producción de etanol a partir de cortezas de naranja, existen estudios que intentan poner solución a esta inhibición de la fermentación debida a compuestos presentes en esta biomasa o bien generados tras la sacarificación de los azúcares complejos. Entre ellos se encuentra el trabajo de Pourbafrani et al. (2007), donde se realiza la encapsulación de las levaduras para su protección, y el de Rakin et al. (2009), que plantean la aplicación de alginatos y otros compuestos para la

inmovilización de *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación de harina de maíz hidrolizada de forma que se consiga un mayor rendimiento en etanol.

Tabla 7.4. Producción de etanol (L etanol /1000 kg CPW de naranja) tras el procesado SF y SSF de pieles de naranja pretratadas con *steam explosion* (con diluciones de CPW:agua de 1:4 v/v) usando diferentes dosis enzimáticas, en botellas de vidrio de 250 mL.

| Dosis enzimática | Proceso SF | Proceso SSF |
|------------------|-------------|-------------|
| Dosis 1 | 36,90±0,00a | 35,37±2,74a |
| Dosis 2 | 37,60±3,50a | 37,18±5,02a |
| Dosis 3 | 16,60±0,70b | nd |
| Dosis 4 | 22,60±7,88b | nd |
| Dosis 5 | 34,00±1,80a | 38,84±5,37a |

Media (n=3) con su desviación típica. Los datos con una misma letra no tienen diferencias significativas siendo $p \leq 0,05$. nd: no existen datos

La cantidad de CPP y aceites esenciales obtenidos en los ensayos de hidrólisis y fermentación (proceso SF) de cortezas de naranja pretratadas con *steam explosion* (con diluciones de CPW: agua de 1:4 v/v), y con distintas dosis enzimáticas, se muestra en la Figura 7.3.

Las distintas dosis enzimáticas utilizadas no influyeron en el residuo resultante tras la fermentación, teniéndose producciones alrededor de 40 CPP/1000 kg CPW en todos los casos a excepción de la dosis más alta (dosis 5) donde la cantidad fue algo menor (aproximadamente 30 kg/1000 kg CPW). Cuando la hidrólisis y fermentación tuvo lugar simultáneamente (proceso SSF), la cantidad de CPP fue similar (37 kg/ 1000 kg CPW) para todas las dosis enzimáticas probadas.

La producción de ácido galacturónico tras la hidrólisis enzimática, con distintas dosis de enzimas, de pieles de naranja pretratadas se muestra en la Figura 7.4. Se observa una producción similar cuando se añadieron las dosis enzimáticas 2, 3 y 4 (de la Tabla 3.2.) con valores de entre 12 y 14 g de GA / 100 g piel seca, lo que equivale a más de 25 kg ac. galacturónico / 1000 kg OCPW fresca. En el caso de las dosis 1 y 5, la

producción fue, en ambos casos, inferior (15 y 20 kg/ 1000 kg OCPW fresca, respectivamente).

Se pone de manifiesto que el rendimiento en ácido galacturónico, tras 24 horas de hidrólisis enzimática (dosis enzimática REC), de cortezas de naranja sin pretratamiento de *steam explosion*, usando SF y diluciones CPW:agua, de 1:4, fue alrededor de 15 g / 100 g de piel seca. Este resultado es similar al obtenido en los ensayos con pieles de naranja sometidas a *steam explosion*. Esto indica que este pretratamiento no mejora el rendimiento de GA tras la hidrólisis enzimática de cortezas de naranja. El rendimiento en ácido galacturónico es similar al obtenido por Wilkins et al. (2005), que es de 13 g de GA / 100 g de piel seca, tras 24 horas de hidrólisis enzimática (con dosis 5 según Tabla 3.2), y sin pretratamiento previo con *steam explosion* de las pieles de naranjas.

Estos resultados coinciden con los trabajos de Widmer et al. (2010), que observaron una mayor producción de ácido galacturónico en el procesado SSF de cortezas frescas de naranja, si se compara con lo que se obtiene con pieles de naranja que han sufrido un tratamiento previo a alta presión y temperatura. Se puso de manifiesto que temperaturas por encima de 160°C durante más de 2 a 4 minutos influyen negativamente en la hidrólisis de la pectina, en donde se encuentra el ácido galacturónico.

Se ha visto en todos los cítricos estudiados que el pretratamiento con *steam explosion* no tiene ningún efecto sobre la producción de ácido galacturónico. En general, el rendimiento en GA siempre es igual o superior cuando las pieles se someten únicamente a hidrólisis enzimática durante 24 horas.

Las cortezas frescas de naranja contenían aceites esenciales en concentraciones entre 0,2 y 0,3% (v/v) y de 0,03-0,04% (v/v) después de ser sometidas al pretratamiento de *steam explosion*. Mediante el pretratamiento se recuperó la gran mayoría de los aceites esenciales presentes en estas pieles de naranja como co-producto del proceso con producciones de 4-5 L de aceites esenciales naranja / 1000 kg CPW. Todos los ensayos de hidrólisis y fermentación de cortezas pretratadas se hicieron en pieles de naranja que

tenían una concentración de aceites esenciales por debajo de la concentración mínima inhibitoria de las levaduras, según la bibliografía (Wilkins, 2009).

Los ensayos de hidrólisis y fermentación de pieles de naranja pretratadas (según el proceso SF) con distintas dosis enzimáticas, pero añadiendo menor cantidad de agua (diluciones CPW:agua de 2:1 v/v), dieron como resultado las curvas de producción de etanol (en L/1000 kg CPW naranja) de la Figura 7.5.

Curiosamente, en los ensayos realizados con las dosis más bajas de enzimas hubo una inhibición completa de la fermentación. La producción de etanol para la dosis más alta (dosis 3 de la Tabla 3.2) fue similar a la obtenida tras el proceso SF con diluciones de CPW: agua de 1:4, siendo en este caso de 40 L/1000 kg CPW.

La curva de producción de etanol se muestra hasta el día 5, ya que después de este tiempo el rendimiento disminuye bruscamente. Se observa además que la duración de la fase de latencia (aproximadamente 3 días) es superior a la del resto de cítricos estudiados en estas mismas condiciones. Este hecho nos hace pensar en la posible existencia de compuestos en el mosto con carácter bacteriostático que frenan el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*. Algunos de estos compuestos son productos de la degradación del azúcar como furfural y HMF, que se generan en grandes cantidades en tratamientos ácidos y a alta temperatura. Compuestos como el ácido acético, que se encuentra en la hemicelulosa; ácidos hidrocarboxílicos, como el ácido láctico, que son comunes en la degradación alcalina de carbohidratos; el ácido fórmico, generado tras la degradación de la lignina; y los azúcares, furanos y fenoles, sales alcalinas y metales pesados. En concreto, los furanos y los fenoles provocan la inhibición de *S. cerevisiae* y la velocidad de producción de etanol aunque no se ha visto que tengan un efecto claro sobre la producción final de etanol (Klinke et al., 2004).

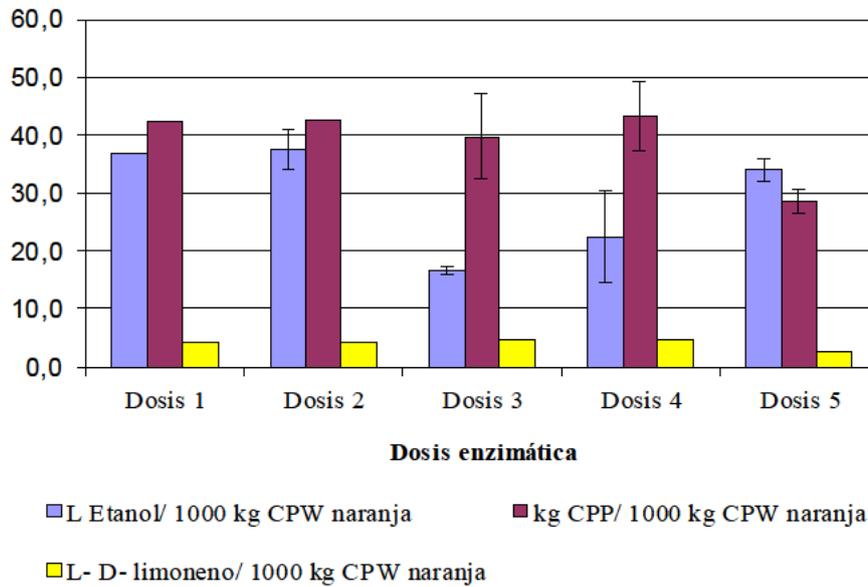


Figura 7.3. Etanol y co-productos obtenidos tras el procesado SF de pieles de naranja pretratadas con *steam explosion* (con diluciones de CPW:agua de 1:4 v/v) usando diferentes dosis enzimáticas de Pectinex, Celluclast y Novozyme.

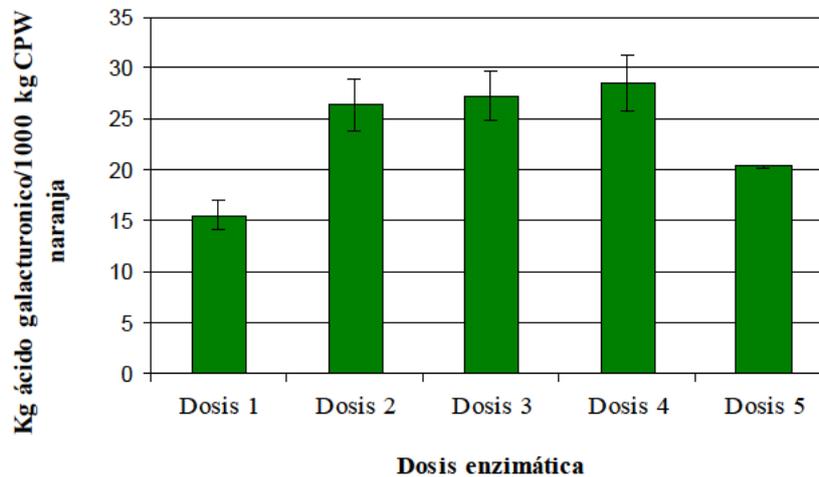


Figura 7.4. Producción de ácido galacturónico (kg/1000 kg CPW naranja) después de la hidrólisis enzimática, con distintas dosis enzimáticas, de la pieles de naranja pretratadas con *steam explosion* (con diluciones CPW:agua de 1:4 v/v).

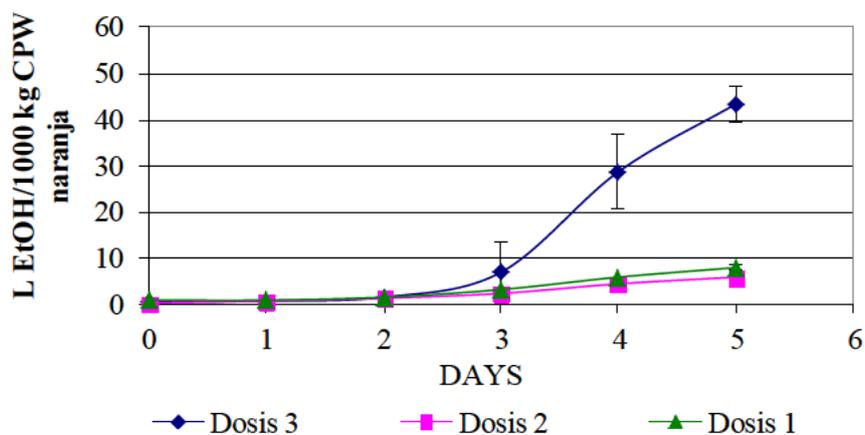


Figura 7.5. Curvas de producción de etanol (en L/1000 kg CPW naranja) obtenidas tras el procesado SF de pieles de naranja pretratadas con *steam explosion* (con diluciones CPW: agua de 2:1 v/v), usando distintas concentraciones enzimáticas, en botellas de vidrio de 250 mL. Las dosis enzimáticas utilizadas (mg proteína/mg corteza seca) corresponden a las de la Tabla 3.2.

7.5. Producción de bioetanol con cortezas y pulpas de naranja a escala piloto en bioreactor.

A continuación, en la Figura 7.6, se muestra la producción de etanol en bioreactores de 5 L y botellas de vidrio de 250 mL a partir de cortezas de naranja pretratadas con *steam explosion*, tras un proceso SSF llevado a cabo con una dilución OCPW: agua de 2:1 v/v. En este caso la dosis enzimática utilizada fue de 2,21 mg pectinasa, 1,95 mg β -glucosidasa y 1,82 mg celulasa.

Se ha conseguido una producción máxima de etanol de 30 L/ 1000 kg CPW cuando el proceso se realizó en botellas de 250 mL y 40 L/ 1000 kg en el caso de bioreactores de 5 L. El rendimiento en etanol es igual al obtenido tras el proceso SSF, con menor contenido en agua (CPW:agua de 1:4 v/v) y con dosis enzimáticas inferiores (con dosis enzimática 1 de la Tabla 3.2 se obtuvieron alrededor de 35 L/ 1000 kg CPW), e igual al alcanzado en el proceso SF con diluciones CPW:agua de 2:1 con dosis enzimática 1 (de la Tabla 3.3).

La cantidad de azúcares producidos después de tres horas de hidrólisis fue de 53,9 g de azúcares totales / 100 g de piel seca y 43 g de azúcares fermentables/ 100 g de piel seca. Se ha visto que, trascurridos 6 días de fermentación de estas pieles hidrolizadas (proceso SSF), la concentración de azúcares fermentables disminuyó levemente, quedando un residuo con una concentración de 32,8 g de azúcares fermentables/ 100 g de piel seca por lo que la fermentación no se produce de forma completa.

Al igual que sucedía en los ensayos SF con dilución CPW:agua 2:1, el crecimiento de *S.cerevisiae* tiene un periodo de latencia prolongado e incluso superior al alcanzado anteriormente (4 días) donde la producción de etanol fue nula (en el caso de las botellas de 250 mL) o no superior a 10 L/ 1000 kg CPW (cuando la fermentación tuvo lugar en bioreactores de 5 L).

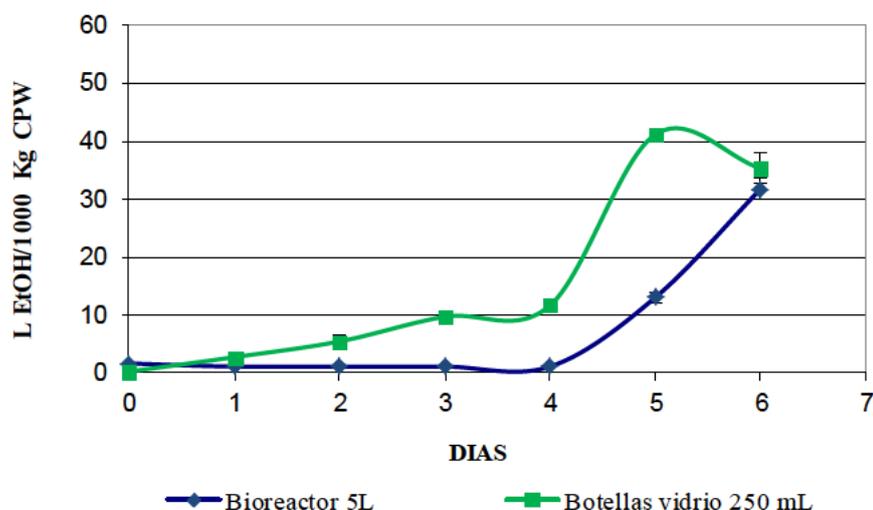


Figura 7.6. Curvas de producción de etanol (en L/1000 kg CPW naranja) obtenidas tras el procesado SSF de pieles de naranja pretratada (con diluciones CPW: agua de 2:1 v/v), usando distintas concentraciones enzimáticas, en bioreactores de 5L.

Las dosis enzimáticas utilizadas (mg proteína/mg corteza seca) fueron: 2,21 mg pectinasa, 1,95 mg β -glucosidasa y 1,82 mg celulasa.

7.6. Influencia del contenido en aceites esenciales de las cortezas de naranja en la producción de azúcares y etanol.

La influencia del contenido de aceites esenciales en el mosto, sobre la producción de etanol a partir de cortezas de naranja no pretratadas con *steam explosion*, y tras un proceso SF y con dosis enzimática REC, se muestra en la Figura 7.7.

Se han observado rendimientos de etanol muy superiores (más del doble) a los alcanzados con cortezas de naranja pretratadas, cuando la concentración de aceites esenciales del mosto se encuentra por debajo aproximadamente de 0,06% (v/w). Se produjeron más de 85 L/ 1000 kg OCPW cuando la concentración en aceites esenciales fue de 0,028% (v/w). Estos resultados son similares a los obtenidos por Wilkins et al. (2007a), que encontraron una concentración mínima inhibitoria de aceites esenciales de naranja sobre el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, que era de 0,05% (v/w).

Según estos resultados, la producción de etanol a partir de cortezas de naranja se ve perjudicada cuando este material se somete a *steam explosion*. Es muy probable, como ya se ha comentado anteriormente, que durante el pretratamiento se produzcan ciertos compuestos que son fuertes inhibidores de la fermentación, que tienen un efecto bacterostático (aumentando la fase de latencia de crecimiento del microorganismo) y bactericida, de forma que se reduce a la mitad el rendimiento en etanol con respecto al que se puede alcanzar teóricamente.

Grohmann et al. (1996) realizaron ensayos de hidrólisis y fermentación con pieles de naranjas no sometidas previamente a tratamiento térmico y obtuvieron rendimientos en etanol de hasta el 85% del rendimiento teórico.

En cualquier caso, para asegurar la buena marcha de la fermentación de cortezas de naranja sin pretratar, es necesario reducir la concentración en aceites esenciales por debajo de 0,06%, lo que supone aumentar la cantidad de agua añadida al proceso. El máximo rendimiento en etanol tras la hidrólisis y fermentación de cortezas de naranja fresca se obtiene con diluciones CPW: agua de 1:8 (v/v).

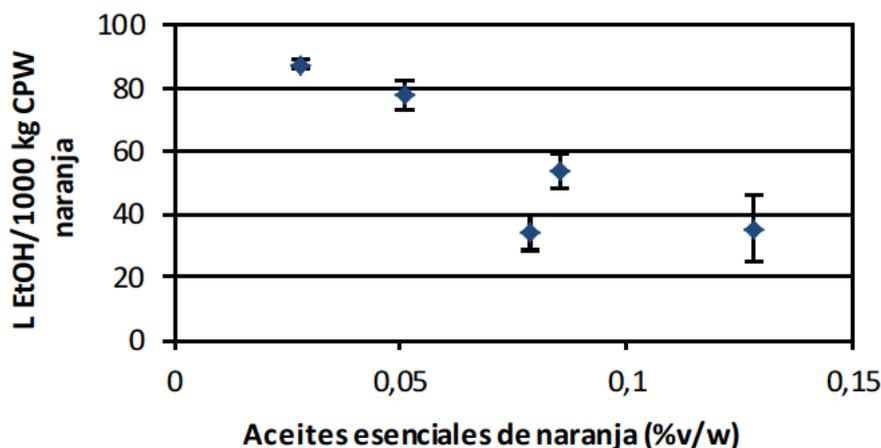


Figura 7.7. Influencia del contenido en aceites esenciales de pieles de naranja no pretratadas con *steam explosion* sobre la producción de etanol (L/1000 kg CPW naranja), con proceso SF.

7.7. Conclusiones

Los resultados del estudio de producción de bioetanol a partir de cortezas de naranja muestran que ni la tecnología utilizada en la hidrólisis y fermentación (proceso SSF o SF), ni el que se realice o no pretratamiento de *steam explosion* de las cortezas, influyen sobre el rendimiento de azúcares totales o fermentables.

Los rendimientos en etanol a partir de cortezas pretratadas mediante *steam explosion* son similares tanto si se realiza el proceso SSF o SF, como si se utilizan diluciones CPW:agua, 2:1 o 1:4, y, en todos los casos, se encuentran por debajo del rendimiento teórico.

La máxima producción de etanol se obtiene a partir de cortezas de naranja no pretratadas con *steam explosion* tras la hidrólisis y fermentación con dosis enzimática recomendada. Se alcanzaron valores de hasta 85 L/ 1000 kg OCPW obteniéndose una producción que duplica la obtenida a partir de cortezas de naranja pretratadas.

La concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales de naranja sobre *Saccharomyces cerevisiae*, en el transcurso de la fermentación alcohólica, fue de 0,05%.

CAPÍTULO 8

Carácter antimicrobiano de los aceites esenciales y flavonoides de subproductos cítricos. Inhibición de la fermentación

Parte del texto de este Capítulo ha sido publicado en los trabajos:

- Boluda-Aguilar M, López-Gómez A (2013). Production of bioethanol by fermentation of lemon (*Citrus Limón L.*) peel wastes pretreated with steam explosion. *Industrial Crops and Products*, 41, 188-197.
- Boluda-Aguilar M, García-Vidal L, González-Castañeda FP, López-Gómez A (2010). Mandarin peel wastes pretreatment with steam explosion for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 101: 3506–3513.
- Boluda-Aguilar, M., Belisario-Sánchez, Y.Y., López-Gómez, A (2010). Modified steam explosion process for pre-treatment of citrus peel wastes. En: FITO, P., TOLDRA, F. (Eds.), *Food Innova 2010*. ISBN 978-84-693-5010-2, Valencia, España.

8.1. Caracterización de los aceites esenciales de cítricos y actividad antimicrobiana.

Además de los ensayos realizados con biomasa pretratada, con el fin de estudiar el efecto de la concentración de los distintos aceites esenciales de cítricos en la producción de etanol (Figuras 4.6, 5.7, 6.7, 7.7), se realizaron pruebas de actividad antimicrobiana sobre *S. cerevisiae*, de los aceites extraídos tras el proceso de *steam explosion*.

La Figura 8.1 muestra la evolución de la absorbancia con el tiempo del caldo de cultivo Sabouraud, inoculado con *S. cerevisiae* y en presencia de distintas concentraciones de aceite esencial de limón.

En general, el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de limón extraídos mediante *steam explosion* tiene lugar cuando las concentraciones de este se encuentran por encima del 0,025%. Las curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* se modelizaron según el modelo de Baranyi y se observó que la fase de latencia del microorganismo, cuando no se añadió aceite esencial y cuando la concentración de este fue de 0,025%, fue inferior a las que se tienen con concentraciones superiores de aceite esencial. En cuanto a la velocidad de crecimiento, esta es mayor cuanto mayor es la concentración del aceite esencial de limón, hasta un máximo de 0,075%. A partir de esta concentración, la velocidad de crecimiento es inferior.

Se ha demostrado la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de frutas y de sus componentes individuales contra mohos y levaduras en muchos estudios (Alves-Silva et al., 2013; Espina et al., 2011; Belletti et al., 2004; Viuda-Martos et al., 2008; Tserennadmid et al., 2011). Entre los componentes de estos aceites, se ha visto que el citral, encontrado en cortezas de limón y naranja, es uno de los más efectivos frente a hongos (Espina et al., 2011).

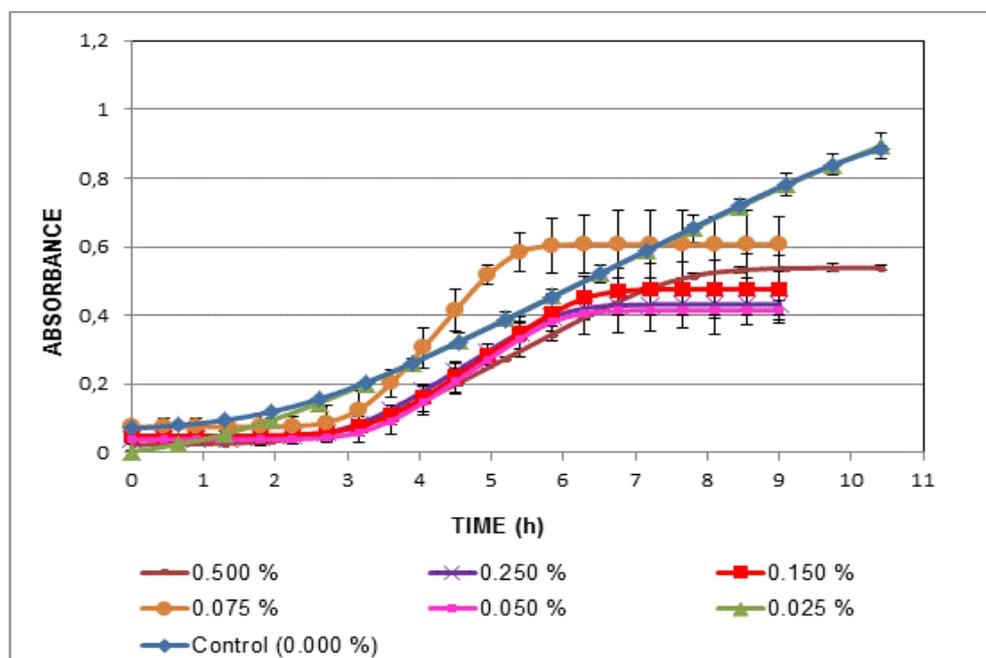


Figura 8.1. Evolución de la absorbancia con el tiempo del caldo de cultivo Sabouraud inoculado con *S. cerevisiae* en presencia de aceite esencial de limón en distintas concentraciones.

La actividad antimicrobiana de mezclas complejas, tales como los aceites esenciales de cítricos, no pueden ser explicados como la acción individual de cada uno de sus componentes, sino que actúan de forma conjunta en la inhibición del crecimiento. La composición química de los aceites esenciales afecta al modo de acción y la actividad antimicrobiana de estos extractos de cítricos. Se pueden dar casos de efectos sinérgicos, antagónicos o aditivos entre los componentes de estos aceites (Espina et al., 2011).

La composición y propiedades biológicas de los aceites esenciales pueden ser diferentes en función de la variedad, origen o estado vegetativo (Uysal et al., 2011). Lo que si es cierto es que, en la mayoría de los casos, hay sustancias activas en una mayor proporción, como pueden ser pineno, cimeno o limoneno, que tienen influencia directa sobre el crecimiento de determinados microorganismos (Belletti et al., 2004). Es por eso que la caracterización de los aceites esenciales de cítricos es necesaria, puesto que son

muchas las variables que afectan a su composición y por tanto al efecto antimicrobiano de estos.

A continuación se detallan los componentes mayoritarios presentes en los aceites esenciales de limón, mandarina, naranja y pomelo, los cuales han sido extraídos mediante el proceso de *steam explosion* (Tablas 8.1, 8.2, 8.3 y 8.4).

El aceite extraído mediante *steam explosion* de cortezas de limón se compone fundamentalmente de limoneno (52,4%), β -pineno (13,4%), α -terpineno (12,82%), geraniol (4,01%), β -phellandreno (3,04%) y β -myrceno (2,52%).

Los trabajos de Espina et al. (2011) muestran resultados similares sobre la composición de los aceites de limón. Estos estaban compuestos principalmente por limoneno (59,10%), γ -terpineno (9,66%), β -pineno (5,20%), β -bisaboleno (3,61%), γ -cymeno (3,29%), ρ -cymeno (3,29%), cis-Thujopseno (2,38%), geraniol (2,11%), sabineno (0,94%) y myrceno (0,84%).

En el caso de los aceites extraídos de pomelo, estos se constituyen fundamentalmente de limoneno (80,1%), β -myrceno (5,94%), α -pineno (2,11%), β -phellandreno (1,95%), y ocimeno (1,24%).

Los estudios de Uysal et al. (2011) se centran en los aceites esenciales extraídos de la corteza de pomelo, y observaron que el compuesto predominante era el limoneno con una concentración de entre 88,6 y 91%, seguido de β -pineno (0,8-1,2%), linolool (0,7-1,1%) y α -terpineno (0,7-1%).

Los resultados del análisis cromatográfico, en el caso de los aceites extraídos de corteza de naranja, muestran como componentes mayoritarios al limoneno (74,2%), β -myrceno (5,27%), β -pineno (2,81%), γ -terpineno (2,49%), β -thujeno (2,06%) y valenceno (1,82%).

Los compuestos predominantes en los aceites esenciales de naranja según Espina et al. (2011) son limoneno (85,5%), cis-limoneno oxide (1,03%), myrceno (0,92%), cis-p-menta (0,75%), carvone (0,65%), decanal (0,43%) y trans-carveol (0,59%). Caccioni

et al. (1998) mostraron la presencia de grandes cantidades de myrceno y linalool en aceites esenciales de naranja de distintas variedades.

Por otro lado, los aceites extraídos mediante *steam explosion* de cortezas de mandarina están compuestos fundamentalmente de limoneno (79,35%), geraniol (3,60%), β -pineno (3,60%), trans-carveol (2,30%), cis-limoneno oxide (1,79%) y β -myrceno (1,09%).

Los trabajos de Espina et al. (2011) mostraron que los componentes mayoritarios de los aceites esenciales de mandarina son principalmente: limoneno (74%); cis-limoneno oxide (2,75%), cis-p-menta (2,26%), trans-carveol (1,75%), carvone (1,87%), patchenol (1,24%) y cis-carveol (0,93%). Además, comprobaron que los aceites esenciales de mandarina tenían una actividad en la inhibición de un amplio espectro de cepas microbianas.

Uribe et al. (1985) pusieron de manifiesto que los compuestos β -pineno y el limoneno eran muy eficaces en la inhibición de levaduras. Tserennadmid et al. (2011) comprobaron que, de entre los aceites esenciales comúnmente encontrados en pieles de cítricos, el limoneno y el α -pineno mostraban una concentración mínima inhibitoria inferior frente al crecimiento de *S. cerevisiae*, seguidos de terpinen-4-ol y linalool. En este trabajo se observó un efecto sinérgico en la inhibición de *Saccharomyces* cuando se utilizaron aceites esenciales de limoneno y pineno.

La Tabla 8.5 muestra los parámetros que definen la cinética de evaporación de los aceites esenciales extraídos mediante el tratamiento de *steam explosion*, y se comparan con los obtenidos de aceites esenciales comerciales, de los mismos cítricos. Se comprueba que presentan unas características cinéticas similares. También, se obtienen valores de temperatura de comienzo de la vaporización (Tonset, °C) y de final de la vaporización (Tenset, °C) con el mismo orden de magnitud que los obtenidos por otros autores para los aceites esenciales de cítricos (Hazra et al., 2004; Martins et al., 2011).

Tabla 8.1. Composición de los aceites esenciales de limón extraídos mediante *steam explosion*.

| Compuesto | Tiempo de retención | % Área relativa |
|-------------------------|----------------------------|------------------------|
| octano | 2,167 | 0,19 |
| Sabineno | 3,499 | 1,27 |
| α -pineno | 3,596 | 3,11 |
| Campheno | 3,795 | 0,12 |
| β -phellandreno | 4,112 | 3,04 |
| β -pineno | 4,176 | 13,4 |
| β -myrceno | 4,315 | 2,52 |
| α -phellandreno | 4,527 | 0,11 |
| Limoneno | 4,933 | 52,4 |
| β -cis-ocimeno | 4,975 | 0,15 |
| Ocimeno | 5,119 | 0,20 |
| α -terpineno | 5,301 | 12,82 |
| 4-careno | 5.711 | 0,90 |
| Linalool | 5,867 | 0,14 |
| Nonanal | 5,922 | 0,17 |
| citronellal | 6,641 | 0,05 |
| terpinen-4-ol | 7,013 | 0,35 |
| α -terpineol | 7,204 | 0,26 |
| Decanal | 7.368 | 0,06 |
| Geraniol | 8,062 | 4,01 |
| Citral | 8,379 | 0,57 |
| undecanal | 8,760 | 0,62 |
| α -bergamoteno | 10,210 | 0,95 |
| α -caryophylleno | 10,316 | 0,44 |
| β -farneseno | 10,692 | 0,12 |
| Germacreno | 11,276 | 0,3 |
| β -bisaboleno | 11,365 | 1,27 |
| otros | - | 0,5 |

Tabla 8.2. Composición de los aceites esenciales de pomelo extraídos mediante *steam explosion*.

| Compuesto | Tiempo de retención | % Área relativa |
|-------------------------|---------------------|-----------------|
| octano | 2,180 | 0,08 |
| α -pineno | 3,613 | 2,11 |
| β -phellandro | 4,125 | 1,95 |
| β -pineno | 4,180 | 0,24 |
| β -myrceno | 4,341 | 5,94 |
| Limoneno | 5,093 | 80,1 |
| ocimeno | 5,174 | 1,24 |
| α -terpineno | 5,330 | 0,25 |
| 4-careno | 5,736 | 0,21 |
| Linalool | 5,880 | 0,14 |
| Nonanal | 5,935 | 0,15 |
| Citronellal | 6,633 | 0,15 |
| p -menth-1-en-8-ol | 7,216 | 0,08 |
| decanal | 7,356 | 0,93 |
| ácido acético | 7,428 | 0,25 |
| geraniol | 7,918 | 0,11 |
| α -cubebeno | 9,732 | 0,27 |
| neryl propionate | 9,758 | 0,43 |
| β -cubebeno | 9,910 | 0,33 |
| 1-deceno | 10,083 | 0,15 |
| α -caryophylleno | 10,320 | 1,34 |
| Germacreno | 11,081 | 0,23 |
| Octanal | 11,123 | 0,74 |
| Bicyclogermacreno | 11,276 | 0,14 |
| Nootkatone | 14,794 | 0,51 |
| Otros | - | 0,98 |

Tabla 8.3. Composición de los aceites esenciales de naranja extraídos mediante *steam explosion*.

| Compuesto | Tiempo de retención | % Área relativa |
|-------------------------|---------------------|-----------------|
| α -thujeno | 3,508 | 0,12 |
| α -pineno | 3,601 | 2,06 |
| β -thujeno | 4,112 | 2,28 |
| β -pineno | 4,172 | 2,81 |
| β -myrceno | 4,328 | 5,27 |
| α -phellandreno | 4,523 | 0,37 |
| Limoneno | 5,064 | 74,2 |
| Ocimeno | 5,157 | 0,23 |
| γ -terpineno | 5,322 | 2,49 |
| 3-careno | 4,624 | 0,85 |
| 4-careno | 4,742 | 0,14 |
| Terpinoleno | 5,724 | 0,41 |
| linalool | 5,863 | 0,62 |
| Nonanal | 5,918 | 0,13 |
| terpinen-4-ol | 7,009 | 0,18 |
| α -terpineol | 7,195 | 0,22 |
| Geraniol | 7,707 | 0,27 |
| Citral | 7,884 | 0,21 |
| nerol acetate | 9,504 | 0,33 |
| β -elemeno | 9,923 | 0,14 |
| Dodecanal | 10,142 | 0,14 |
| α -caryophylleno | 10,312 | 0,28 |
| Valenceno | 11,23 | 1,82 |
| nootkatone | 14,794 | 0,10 |
| methyl linolenate | 17,526 | 0,12 |
| Docosane | 18,371 | 0,19 |
| OTROS | - | 1,73 |

Tabla 8.4. Composición de los aceites esenciales de mandarina extraídos mediante el *steam explosion*.

| Compuesto | Tiempo de retención | % Área relativa |
|-------------------------|---------------------|-----------------|
| Octano | 2,210 | 0,2 |
| Sabineno | 3,170 | 0,38 |
| Cis-limoneno oxide | 3,458 | 1,79 |
| β -pineno | 3,584 | 3,60 |
| β -myrceno | 4,300 | 1,09 |
| Limoneno | 4,950 | 79,35 |
| α -terpineno | 5,275 | 0,23 |
| Linalool | 5,842 | 0,98 |
| Carvone | 7,944 | 3,41 |
| Trans-carveol | 7,666 | 2,30 |
| terpinen-4-ol | 7,002 | 0,25 |
| α -terpineol | 7,187 | 0,14 |
| Geraniol | 9,495 | 3,60 |
| Citral | 7,889 | 0,90 |
| undecanal | 8,034 | 0,26 |
| Nerol | 9,023 | 0,18 |
| α -bergamoteno | 10,290 | 0,36 |
| α -caryophylleno | 10,730 | 0,45 |
| β -farneseno | 10,679 | 0,24 |
| α -sinensal | 14,143 | 0,21 |
| OTROS | - | 0,27 |

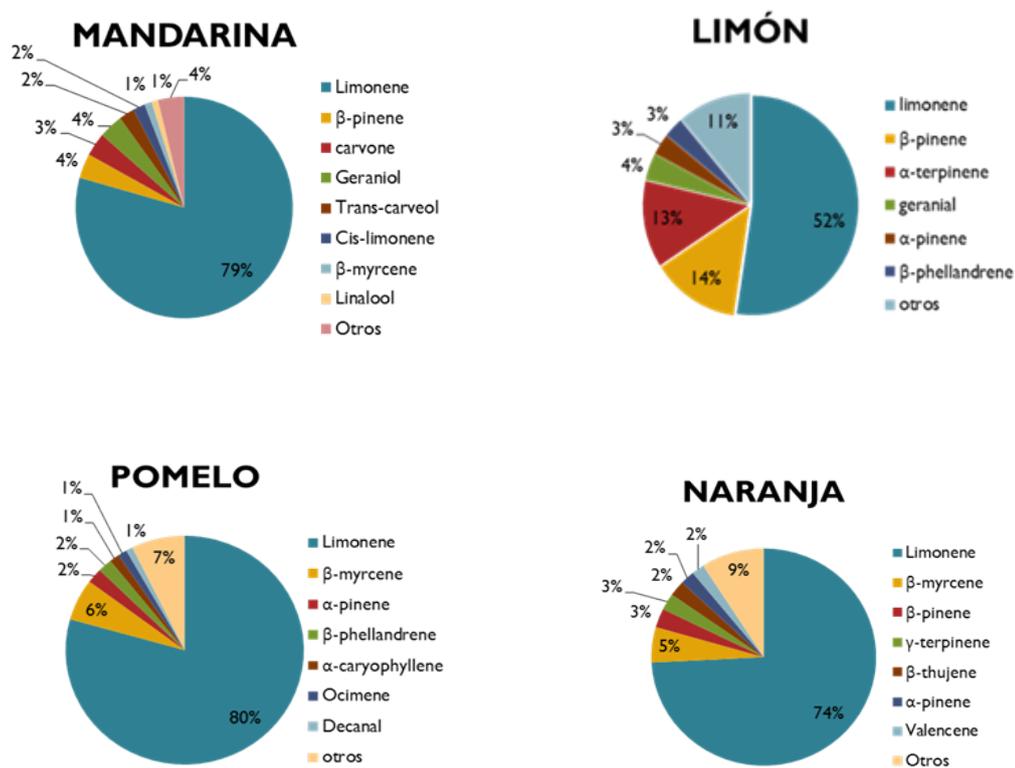


Figura 8.2. Composición de los aceites esenciales de cítricos extraídos mediante *steam explosion*.

Tabla 8.5. Parámetros de la cinética de evaporación de aceites esenciales comerciales (Sigma-Aldrich) y de los aceites extraídos mediante *steam explosion*.

| | In K0 | Ea (KJ/mol) | Entalpia de vaporización(J/g) | T _{Onset} (°C) | T _{Enset} (°C) |
|---|--------------|---------------|----------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Mandarina comercial | 8,07 ± 0,98 | 56,77 ± 2,21 | 217,94 ± 0,106 | 168,56 ± 4,97 | 187,06 ± 1,77 |
| Mandarina <i>steam explosion</i> | 13,34 ± 0,78 | 60,33 ± 2,22 | 149,4 ± 6,62 | 103,38 ± 7,56 | 118,69 ± 6,37 |
| Limón comercial | 7,35 ± 0,17 | 50,21 ± 0,82 | 251,93 ± 8,23 | 148,08 ± 11,69 | 185,38 ± 4,70 |
| Limón <i>steam explosion</i> | 13,32 ± 1,04 | 60,56 ± 3,11 | 187,60 ± 54,11 | 156,29 ± 2,30 | 190,24 ± 0,67 |
| Naranja comercial | 7,80 ± 0,42 | 51,80 ± 1,63 | 171,99 ± 17,78 | 169,06 ± 6,15 | 186,27 ± 0,58 |
| Naranja <i>steam explosion</i> | 7,92 ± 1,10 | 52,75 ± 3,88 | 184,55 ± 47,32 | 171,44 ± 0,90 | 185,70 ± 0,14 |
| Pomelo comercial | 5,67 ± 2,71 | 40,44 ± 12,87 | 143,66 ± 24,10 | 161,57 ± 7,58 | 189,96 ± 2,07 |
| Pomelo <i>steam explosion</i> | 8,23 ± 0,73 | 46,49 ± 3,20 | 156,92 ± 9,36 | 159,36 ± 4,30 | 191,14 ± 3,20 |

T onset = Temperatura de comienzo de la evaporación; T enset = Temperatura de final de evaporación

8.2. Presencia de flavonoides en las cortezas de cítricos.

Existen diversos estudios donde se pone de manifiesto la actividad antimicrobiana de los flavonoides presentes en las cortezas de cítricos (Mandalari et al, 2007; Cushnie et al., 2005; González-Molina et al., 2010). Mandalari et al. (2007) observaron que la naringina inhibía el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y mostraron la existencia de efectos sinérgicos y antagónicos entre los flavonoides presentes en cortezas de bergamota frente a gran cantidad de microorganismos. Salas et al. (2011) observaron la reducción en la velocidad de crecimiento de mohos y levaduras con la presencia de compuestos como naringina, prunina, hesperidina, y neohesperidina.

Los trabajos de Vanamala et al. (2010) ponen de manifiesto que las pieles de naranja tienen gran cantidad de flavonoides, fundamentalmente hesperidina, narirutina y poncirina. También observaron que los flavonoides presentes en pieles de pomelo son fundamentalmente naringina, narirutina y poncirina.

Igual et al. (2011) también encontraron que los flavonoides mayoritarios en las pieles de pomelo son narirutina, quercetina, naringenina y naringina (y constituyen alrededor del 90% del total de flavonoides presentes), y que cuando se someten estas cortezas a un tratamiento térmico produce una disminución en la concentración total de flavonoides.

Con el fin de profundizar sobre todos los agentes antimicrobianos presentes en las cortezas de cítricos (pretratadas o no), además de la determinación de la composición en aceites esenciales, se realizó la identificación de los flavonoides de estas pieles y se observó cuáles de estos se encontraban en mayor proporción.

En la Tabla 8.6 se muestran los flavonoides presentes en las cortezas de cítricos pretratadas con *steam explosion*. Se observa que existe cierta variabilidad en cuanto a la presencia de estos compuestos en función del tipo de cítrico. En este caso, en las pieles de mandarina pretratadas se encuentran fundamentalmente los compuestos narirutina, hesperidina y dydimina. Los flavonoides mayoritarios de las cortezas de limón fueron eriocitrina y hesperidina y en las cortezas de naranja fueron hesperidina, narirutina y dydimina. Por último, las cortezas de pomelo pretratadas aparecen compuestas principalmente por naringina y didymina.

Tabla 8.6. Principales flavonoides presentes en cortezas de cítricos pretratadas mediante *steam explosion*.

| FLAVONOIDE | TIEMPO RETENCIÓN (min) | MANDARINA % Área relativa | LIMÓN % Área relativa | NARANJA % Área relativa | POMELO % Área relativa |
|---------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| DIDYMINA | 27,90 | 15,5 | 3,89 | 14,07 | 25,88 |
| ERIOCITRINA | 32,00 | NP | 54,9 | NP | 4,06 |
| NARIRUTINA | 36,93 | 40,9 | 0,93 | 15,1 | 0,792 |
| NARINGINA | 37,90 | NP | NP | NP | 68,4 |
| RUTINA | 38,00 | NP | 1,28 | NP | NP |
| HESPERIDINA | 40,34 | 39,6 | 38,44 | 70,5 | NP |
| ISORHOIFOLINA | 42,19 | 0,93 | 0,167 | NP | 0,081 |
| DIOSMINA | 43,20 | 0,99 | 0,329 | 0,275 | 0,775 |
| TANGERITINA | 50,08 | 1,94 | NP | NP | NP |

NP: no presenta.

Por otro lado, se realizaron ensayos para evaluar la actividad antimicrobiana de los flavonoides rutina, hesperidina, neohesperidina y naringina sobre el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*. Las Figuras 8.3, 8.4, 8.5 y 8.6 muestran las curvas de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* como variación de la absorbancia del caldo de cultivo Sabouraud inoculado con este microorganismo y en presencia de distintos flavonoides.

Según se observa en la Figura 8.3 la rutina tiene un claro efecto antimicrobiano, en mayor o menor medida, para todas las concentraciones estudiadas. En el caso de concentraciones de 2,5 y 0,75% y después de 20 horas de incubación a 37°C, se tuvo inhibición total del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*.

Para el resto de casos, se tiene cierto efecto bacteriostático y bactericida de la rutina en concentraciones de 1,5%, 0,5% y 0,25%. En estas concentraciones se produce

un alargamiento de la fase de latencia del microorganismo y se obtiene un recuento final de células viables inferior al obtenido sin la adición de rutina.

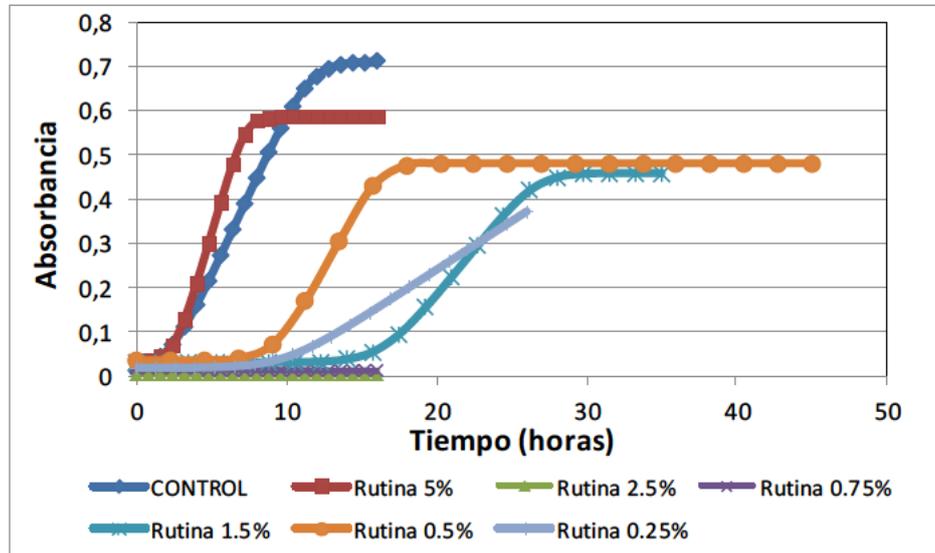


Figura 8.3. Curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* en caldo Sabouraud en presencia de rutina en distintas concentraciones, modelizadas según Baranyi.

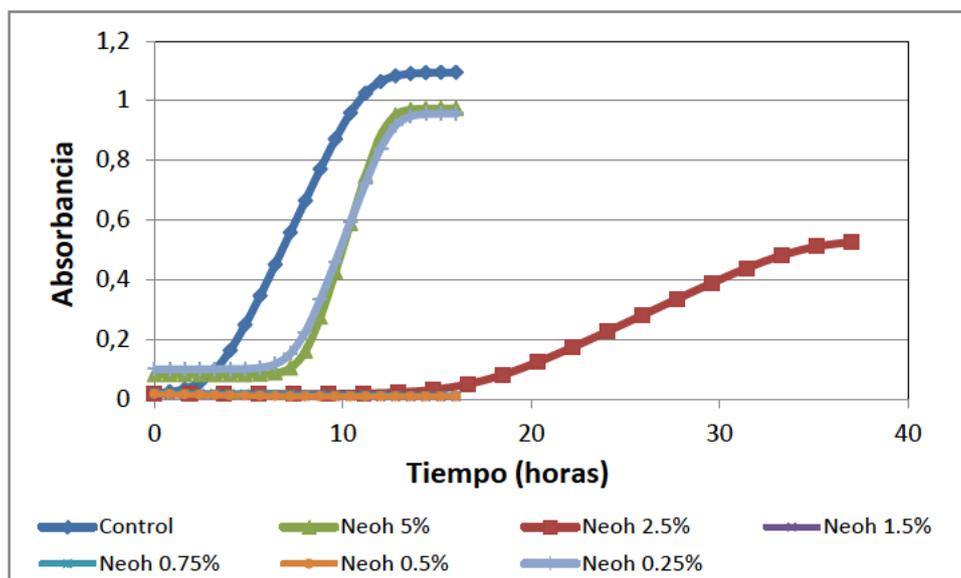


Figura 8.4. Curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* en caldo Sabouraud en presencia de neohesperidina en distintas concentraciones, modelizadas según Baranyi.

Los ensayos realizados con neohesperidina mostraron (Figura 8.4) una inhibición total del crecimiento de *S. cerevisiae* en concentraciones de este flavonoide de 1,5%, 0,75%, y 0,5%. Curvas muy similares se obtuvieron cuando las concentraciones de neohesperidina fueron 5% y 0,25%.

Según se muestra en la Figura 8.5, uno de los flavonoides más importantes en la composición de las cortezas de cítricos como es la hesperidina, tiene un potente efecto inhibidor sobre *S. cerevisiae*. Tan solo cuando la concentración de este compuesto fue del 5% hubo crecimiento de la levadura. Para el resto de concentraciones la absorbancia se mantuvo en valor nulo durante 20 horas de incubación del microorganismo a 37°C.

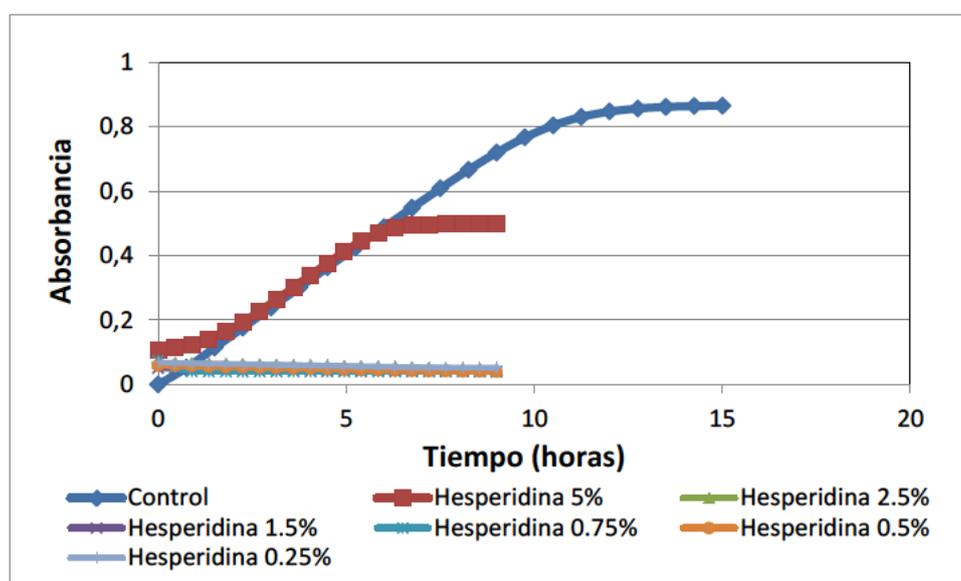


Figura 8.5. Curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* en caldo Sabouraud en presencia de hesperidina en distintas concentraciones modelizadas según Baranyi

En cuanto a los ensayos realizados con naringina, este flavonoide muestra un claro efecto antimicrobiano frente a *S. cerevisiae* para todas las concentraciones estudiadas. Cuando la concentración fue del 5% la inhibición del crecimiento no fue total como para el resto de concentraciones, pero sí inferior al de la curva control sin antimicrobiano.

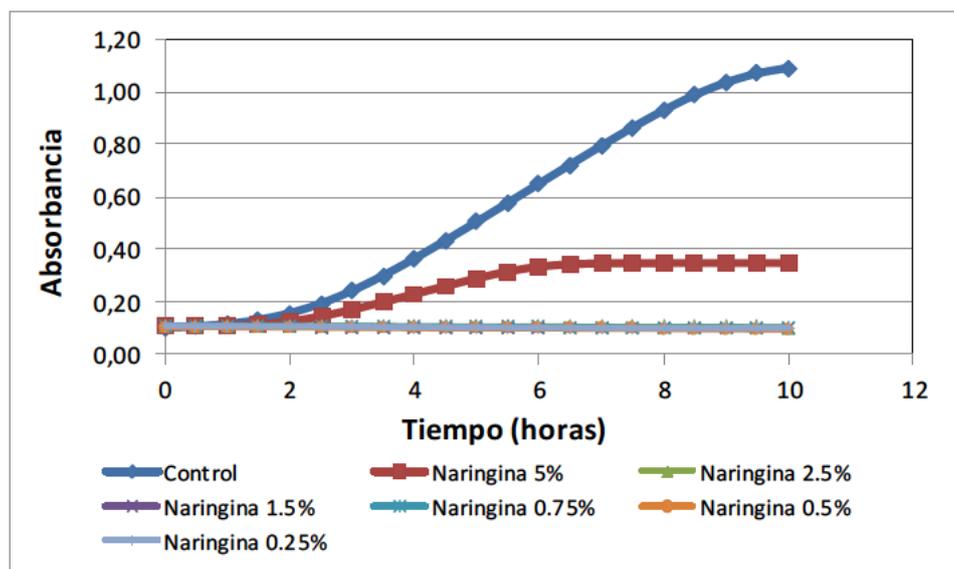


Figura 8.6. Curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* en caldo Sabouraud en presencia de naringina en distintas concentraciones modelizadas según Baranyi.

Curiosamente, para todos los flavonoides estudiados a excepción de la naringina, las curvas control en donde no se ha añadido ningún compuesto antimicrobiano y la obtenida cuando se añade la máxima concentración de este, tienen una estructura similar. En estos casos, la adición de concentraciones del 5% de estos flavonoides, no produce la inhibición del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*.

Este hecho, muy común según el modo de acción de multitud de compuestos antimicrobianos, se conoce como Efecto Eagle o “*Paradoxical effect*” (Eagle y Musselman, 1948). Existen diversos estudios sobre el efecto inhibitor de determinados compuestos en el crecimiento de levaduras, donde se observa una menor actividad antimicrobiana cuando la concentración de estos compuestos supera cierto valor (Fleischhacker et al., 2008; Analy et al., 2007; Wiederhold, 2007).

8.3. Conclusiones

La caracterización llevada a cabo en los aceites esenciales de los cítricos estudiados pone de manifiesto que la composición y el comportamiento térmico es similar al que presentan los aceites comerciales correspondientes.

Se ha puesto de manifiesto que se produce inhibición del crecimiento de *S. cerevisiae* en caldo de cultivo Sabouraud con concentraciones de aceite esencial de cítricos superiores a 0,025% (v/v). Por encima de esta concentración, el aceite ejerce un efecto bactericida y bacteriostático alargando la fase de latencia de la curva de crecimiento de la levadura.

El componente mayoritario de los aceites esenciales extraídos de cortezas de cítricos mediante el tratamiento de *steam explosion* fue el limoneno, el cual supone el 52,4%, 80,1%, 74,2% y 79,35% del total de los constituyentes de los aceites esenciales de limón, pomelo, naranja y mandarina, respectivamente.

Los flavonoides presentes en cortezas de cítricos dependen fundamentalmente de la materia de procedencia (del tipo de subproducto cítrico). En las cortezas de cítricos sometidas a *steam explosion*, se pueden encontrar fundamentalmente hesperidina, dydimina, naringina y narirutina. De entre estos compuestos, se ha visto que la hesperidina y la naringina tienen un gran poder inhibitorio de *Saccharomyces cerevisiae*, en concentraciones inferiores al 5% (w:v).

CAPÍTULO 9

Análisis comparativo del rendimiento en bioetanol y coproductos para los distintos subproductos cítricos

Parte del texto de este Capítulo ha sido publicado en los trabajos:

- Boluda-Aguilar, M., Belisario-Sánchez, Y.Y., López-Gómez, A (2010). Modified *steam explosion* process for pre-treatment of citrus peel wastes. En: FITO, P., TOLDRA, F. (Eds.), *Food Innova 2010*. ISBN 978-84-693-5010-2, Valencia, España.
- Boluda-Aguilar M, López-Gómez A (2013). Production of bioethanol by fermentation of lemon (Citrus limon L.) peel wastes pretreated with *steam explosion*. *Industrial Crops and Products*, 41, 188-197.
- Boluda-Aguilar M, García-Vidal L, González-Castañeda FP, López-Gómez A (2010). Mandarin peel wastes pretreatment with *steam explosion* for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 101: 3506–3513.

9.1. Composición y estructura de las cortezas de cítricos frescas y pretratadas con *steam explosion* y su influencia sobre el rendimiento en azúcares tras la hidrólisis.

No cabe duda que el efecto de la hidrólisis sobre el material lignocelulósico depende fundamentalmente de la estructura y composición de esta biomasa. Estas características son ampliamente variables y dependen fundamentalmente de aspectos genéticos, ambientales (incluyendo las prácticas de cultivo) y de la interacción entre ambos.

La cristalinidad y grado de polimerización de la celulosa, el área de contacto con los enzimas hidrolíticos, el grado de protección de la lignina y la hemicelulosa y el grado de acetilación de la hemicelulosa son los principales factores que afectan a la velocidad de degradación enzimática de este material. Cuanto mayor es la cristalinidad de la celulosa, menor es la eficiencia de la hidrólisis. La disolución de las moléculas de lignina durante algunos de los pretratamientos aplicados a esta biomasa, puede tener un efecto inhibitor sobre las enzimas celulasa y glucosidasa (Balat, 2011; Taherzadeh y Karimi, 2008).

En la Tabla 9.1 se muestra la composición química de las cortezas de cítricos, en estado fresco y tras el pretratamiento de *steam explosion*. Las cortezas de limón, tanto frescas como pretratadas tienen altos porcentajes de celulosa y hemicelulosa, con respecto al resto de cítricos. Las cortezas de pomelo y naranja poseen grandes cantidades de lignina (alrededor del 15-17%), tanto si están pretratadas como si no, siendo de destacar que la naranja, a su vez, contiene un alto contenido de celulosa.

Se ha estudiado la relación entre el contenido en lignina y la producción de azúcares tras la hidrólisis enzimática de pieles de cítricos (Figura 9.1). Los resultados obtenidos no muestran influencia del contenido en lignina sobre la producción de azúcares totales o fermentables tras la hidrólisis enzimática. Incluso observando la gráfica parece haber un aumento en el rendimiento conforme aumenta el contenido en lignina. Los resultados contradicen gran cantidad de estudios en donde se pone de

manifiesto el efecto negativo de la lignina sobre la producción de azúcares en la hidrólisis enzimática.

Mooney et al. (1998) observaron el efecto inhibitor de la lignina sobre la accesibilidad de los enzimas y sobre la actividad enzimática atribuido a su acción sobre el hinchazón de las fibras. Zhu et al. (2008) observaron que tanto el contenido en lignina como el grado de cristalinidad de la biomasa son las características más influyentes en la eficiencia de la hidrólisis enzimática. Además se comprobó que, para periodos de hidrólisis cortos, el contenido en lignina no era tan importante siempre que la cristalinidad fuese baja.

Kumar et al. (2012) comprobaron el efecto de la lignina sobre la accesibilidad de las fibras de celulosa de madera blanda pretratada y propuso el aumento de las dosis enzimáticas en la hidrólisis como la opción adecuada en la mejora del rendimiento en azúcares en la hidrólisis.

Tabla 9.1. Composición química de las cortezas de cítricos, frescas y tras el pretratamiento de *steam explosion*

| | Agua (% pf) | Pectina (% pf) | Hemicelulosa a (% pf) | Hemicelulosa b (% pf) | Celulosa (% pf) | Lignina (% pf) |
|--------------------------|-------------|----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------|----------------|
| MANDARINA | | | | | | |
| CPW mandarina fresca | 5 ± 0,14 | 13 ± 1,02 | 18 ± 1,04 | 0 ± 0,0 | 20 ± 0,15 | 9 ± 0,73 |
| CPW mandarina pretratada | 5,2 ± 0,25 | 14 ± 0,90 | 9,5 ± 0,98 | 9,7 ± 0,58 | 20 ± 0,36 | 9,4 ± 0,11 |
| LIMÓN | | | | | | |
| CPW limón fresca | 3,32 ± 0,31 | 8,82 ± 1,2 | 22,45 ± 2,8 | 0 ± 0,0 | 22,8 ± 1,71 | 8,29 ± 0,66 |
| CPW limón pretratada | 3,8 ± 0,17 | 10,5 ± 1,03 | 13,1 ± 1,77 | 7,37 ± 0,31 | 24,9 ± 2,32 | 9,5 ± 0,24 |
| POMELO | | | | | | |
| CPW pomelo fresca | 3,46 ± 0,08 | 16,1 ± 2,01 | 18,31 ± 1,41 | 0 ± 0,0 | 19,78 ± 2,04 | 15,42 ± 0,8 |
| CPW pomelo pretratada | 3,78 ± 0,14 | 17,39 ± 1,7 | 9,4 ± 1,55 | 8,74 ± 0,2 | 16,38 ± 1,99 | 15,54 ± 0,55 |
| NARANJA | | | | | | |
| CPW naranja fresca | 3,38 ± 0,31 | 12,28 ± 1,12 | 19,98 ± 1,38 | 0 ± 0,0 | 22,05 ± 2,89 | 16,24 ± 1,20 |
| CPW naranja pretratada | 2,13 ± 0,22 | 13,02 ± 1,38 | 9,24 ± 0,98 | 11,60 ± 0,87 | 23,52 ± 2,16 | 16,48 ± 1,37 |

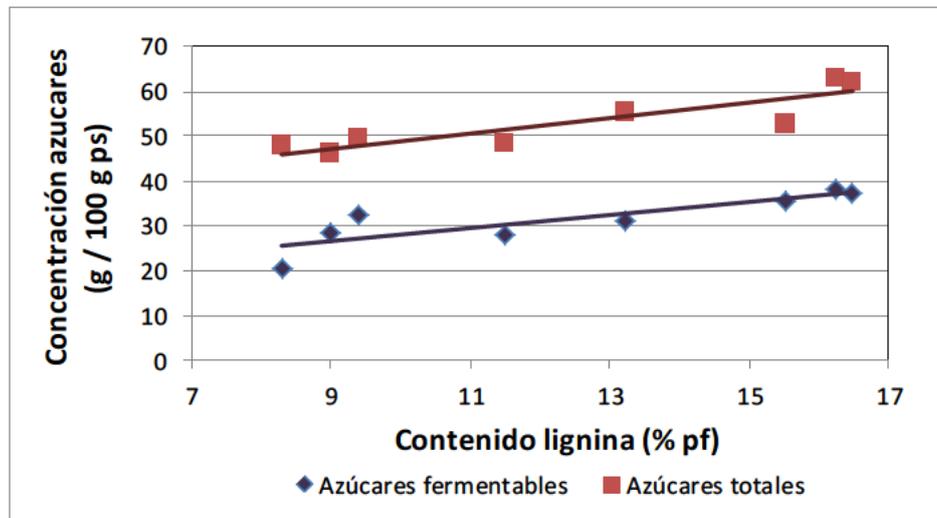


Figura 9.1. Influencia del contenido en lignina de las cortezas de cítricos sobre el rendimiento en azúcares tras 24 horas de hidrólisis enzimática con dosis REC.

A continuación se muestra la producción de azúcares a partir de cortezas de cítricos con o sin pretratamiento de *steam explosion*, tras 24 horas de hidrólisis enzimática (Figura 9.2. y Figura 9.3). Los resultados de rendimiento en azúcares a partir de cortezas no pretratadas se refieren al proceso de hidrólisis con dosis enzimática de referencia, mientras que los datos obtenidos con cortezas pretratadas se dieron con reducciones de la dosis REC. En el caso de cortezas de mandarina y limón, se tuvo mejores rendimientos con dosis enzimáticas 2 (de la Tabla 3.2) y en pomelo y naranja, con dosis 4.

El pretratamiento ha tenido un resultado favorable para la producción de azúcares tras 24 horas de hidrólisis, cuando los ensayos se realizaron con pieles de limón. Se tuvo un rendimiento muy superior (del orden de 35 g azúcares fermentables/100 g ps y 60 g azúcares totales/ 100 g ps) al obtenido a partir cortezas frescas de limón en la hidrólisis de pieles pretratadas y con dosis enzimáticas más del 70% inferiores a la dosis recomendada (REC).

En el caso de cortezas de mandarina y naranja, la cantidad de azúcares producidos fue la misma a partir de cortezas pretratadas y cortezas frescas. En la hidrólisis de las cortezas pretratadas se obtuvo el mismo rendimiento final en azúcares totales y fermentables que con cortezas frescas solo que con más del 70% menos de enzimas hidrolíticas.

Solo en el caso del pomelo, la cantidad de azúcares obtenida tras la hidrólisis fue superior cuando se llevó a cabo mediante cortezas de pomelo no pretratadas. Se tuvo una producción de casi 45 g azúcares fermentables / 100 g ps y de más de 60 g azúcares totales / 100 g ps en la hidrólisis de cortezas de pomelo frescas con dosis enzimática REC.

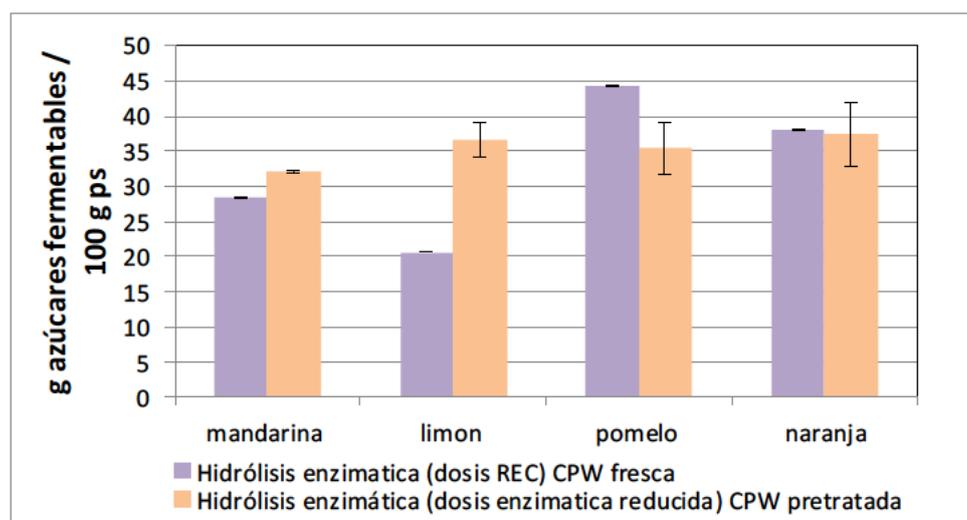


Figura 9.2. Producción de **azúcares fermentables** (g / 100 g piel seca) tras 24 horas de hidrólisis enzimática de cortezas de cítricos sometidas o no al pretratamiento de *steam explosion*.

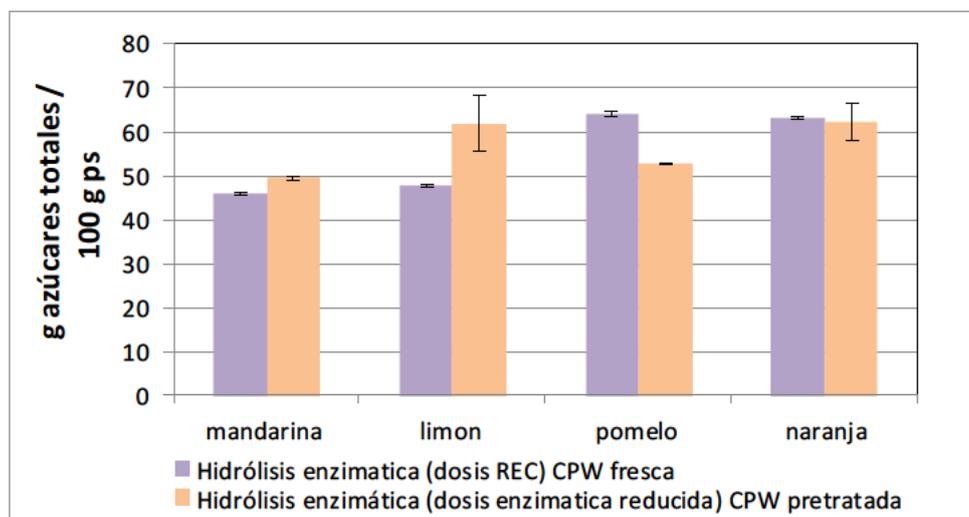


Figura 9.3. Producción de **azúcares totales** (g / 100 g piel seca) tras 24 horas de hidrólisis enzimática de cortezas de cítricos sometidas o no al pretratamiento de *steam explosion*.

9.2. Eficiencia en la producción de etanol a partir de cortezas de cítricos según distintas condiciones de proceso.

Se han realizado ensayos de producción de etanol a partir de cítricos con y sin pretratamiento de *steam explosion*, de hidrólisis y fermentación realizadas separadamente (SF) o de forma simultánea (SSF), siendo las diluciones de CPW: agua de 2:1 y 1:4.

✓ Dilución CPW:agua, 1:4 (w:w). Proceso SF y SSF

Los resultados de la Figura 9.4., muestran la producción etanol tras la hidrólisis y fermentación de cortezas de cítricos pretratadas con *steam explosion*, utilizando dosis enzimática 1 (Tabla 3.2) cuando se realizaron los procesos separadamente (SF) y dosis enzimática 2, cuando se trata del proceso simultáneo (SSF).

A excepción de las cortezas de naranja, en dónde la producción de etanol fue la misma tanto en el proceso SF como SSF, para el resto de cítricos el proceso simultaneo mejora notablemente el rendimiento en etanol. La máxima producción se tuvo a partir

de cortezas de limón y pomelo (63 y 68 L/ 1000 kg CPW, respectivamente). Los procesos de hidrólisis y fermentación de cortezas de naranja dieron lugar a una producción máxima de 40 L/ 1000 kg CPW.

La eficiencia en la producción de etanol obtenida en el caso de pieles de limón y pomelo pretratadas mediante el proceso SSF y utilizando dosis enzimáticas de más de un 70% inferiores a la dosis REC es además muy superior a la obtenida a partir de cortezas frescas. En ambos casos se consiguieron entre 10-15 L/ 1000 kg CPW más que cuando el proceso SSF se hizo con cortezas frescas y dosis enzimática REC.

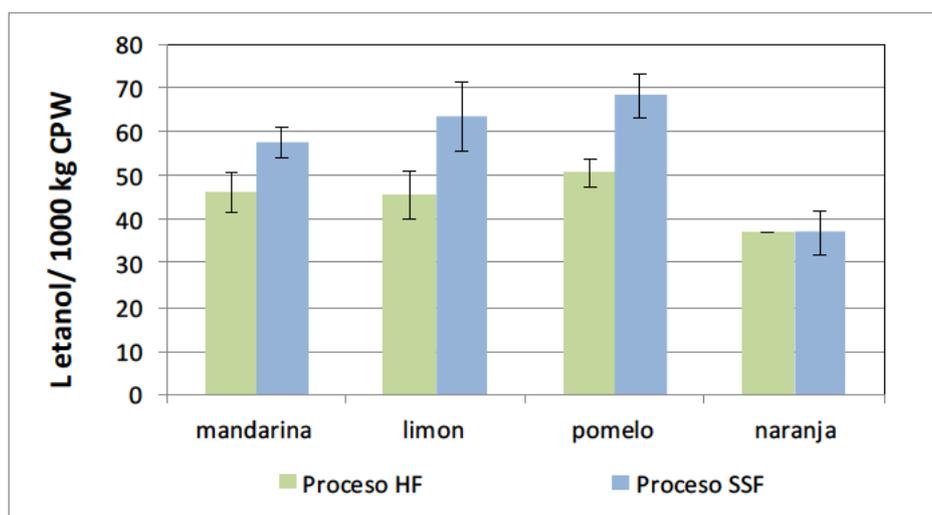


Figura 9.4. Producción de etanol (L/ 1000 kg CPW) tras el procesado SF y SSF de cítricos pretratados con *steam explosion* (con diluciones 1:4 v/v) y con reducciones enzimáticas de más del 70% de la dosis REC.

✓ **Dilución CPW: agua, 2:1 (w:w). Proceso SF y SSF**

Los resultados de la Figura 9.5 muestran la producciones máximas de etanol obtenidas tras el proceso SF, con dosis enzimática 3 de la Tabla 3.3 (1,7 mg pectina/ mg ps, 1,5 mg β -glucosidasa/ mg ps y 1,4 mg celulasa/ mg ps) y obtenidas tras el proceso SSF utilizando el coctel enzimático de 2,2 mg pectinasa/ mg ps, 1,95 mg β -glucosidasa/ mg ps y 1,82 mg celulasa/ mg ps.

Cuando la dilución de las cortezas en agua se hizo en proporción 2:1, la producción de etanol fue superior si los procesos de sacarificación y fermentación tienen lugar de forma simultánea, en el caso de las pieles de mandarina y limón. No sucede lo mismo para cortezas de naranja (la producción es la misma tanto en SF como SSF), ni para cortezas de pomelo, donde el rendimiento en etanol es mayor en el proceso SF.

Cuando se realizó proceso SF con diluciones CPW:agua de 2:1, se vio un efecto positivo sobre la producción de etanol con respecto a los resultados obtenidos con diluciones CPW:agua, 1:4. Para todos los cítricos estudiados hubo un rendimiento superior al que se obtiene en el proceso SF con diluciones CPW:agua de 1:4. La máxima producción se obtuvo a partir de cortezas de pomelo y fue de más de 60 L / 1000 kg CPW.

Sin embargo, cuando se realizó el proceso simultáneo con diluciones CPW:agua de 2:1, la eficiencia en la producción de etanol fue ligeramente mejor solo para el caso de las cortezas de mandarina y limón. En el caso de las cortezas de naranja y pomelo, el rendimiento fue el mismo para diluciones CPW:agua 2:1 como 1:4, w:w.

Por otro lado, nuestros resultados y otros estudios realizados (Alfani et al., 2000, Wilkins et al., 2007c) ponen de manifiesto que el proceso simultáneo permite alcanzar el máximo rendimiento en etanol en el menor tiempo posible. En todos los casos y para todos los cítricos estudiados, el rendimiento máximo en etanol se consiguió de entre uno y dos días antes en el proceso SSF con respecto al que se necesita para SF. Este hecho, unido a la ventaja que supone el disponer de un único recipiente para realizar la hidrólisis y fermentación, hacen que este proceso resulte económicamente más rentable que SF.

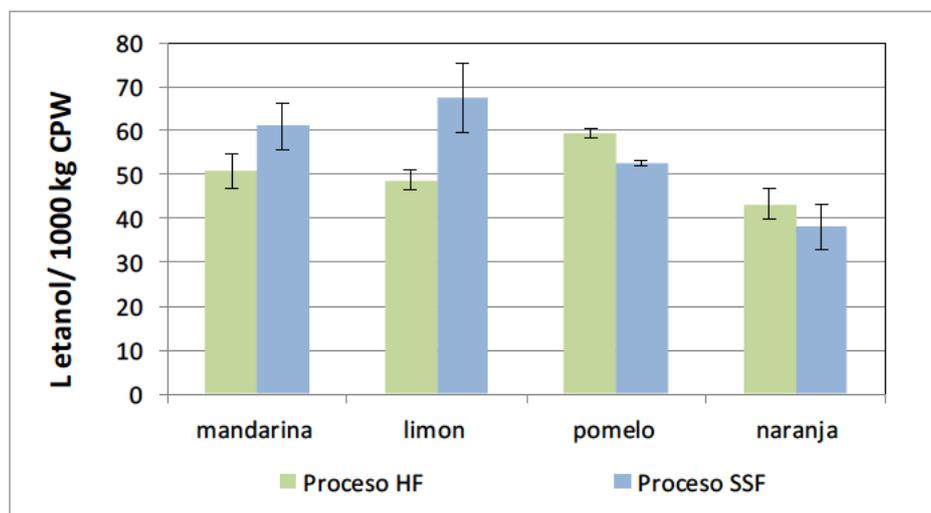


Figura 9.5. Producción de etanol (L/ 1000 kg CPW) tras el procesado SF y SSF de cítricos pretratados con *steam explosion* (con diluciones 2:1 v/v) y con dosis enzimática inferiores a la dosis de referencia.

Los rendimientos de etanol obtenidos mediante cortezas de cítricos son inferiores a los obtenidos por los cultivos utilizados actualmente, pero son lo suficientemente representativos como para considerarlos como biomasa para la producción de etanol. Entre las producciones de etanol que se obtienen con otros materiales destaca; el trigo (304 L/ 1000 kg), la cáscara de arroz (165 L/1000 kg), el maíz (228 L/1000 kg) y la cebada (157,8 L/1000 kg) (Kumar et al., 2009).

En cuanto a la rentabilidad final de los procesos de producción de etanol a partir de cortezas de cítricos, es preciso considerar entre otros factores, la producción de coproductos como son el ácido galacturónico y el residuo sobrante tras la fermentación (Citrus pulp pellets).

Según las Tablas 9.2 y 9.3, tanto para diluciones CPW:agua de 1:4 como 2:1, cuando se hizo proceso SF, el rendimiento en CPP fue superior al obtenido mediante SSF, para todos los cítricos estudiados. En el caso de diluciones 2:1, el rendimiento de CPP para el proceso SF fue de más del doble. Los mejores rendimientos se produjeron a

partir de cortezas de cítricos pretratadas, cuando se realiza proceso SF y la dilución CPW:agua fue 2:1 (90-130 kg CPP/ 1000 kg CPW).

Por otro lado, la producción de ácido galacturónico se ve favorecida cuando se realiza diluciones CPW:agua de 2:1, tanto para el proceso SF como SSF. En el caso del proceso simultaneo, la producción es ligeramente superior al proceso SF. Los mejores rendimientos se tuvieron mediante cortezas de limón y mandarina con rendimientos de hasta 80 y 85 kg GA/ 1000 kg CPW, respectivamente.

Tabla 9.2. Producción de ácido galaturónico y citrus pulp pellets (CPP) (kg/ 1000 kg CPW) tras el procesado SF y SSF, con diluciones de 1:4 (v:v).

| | Proceso SF | | Proceso SSF | |
|------------------|------------|-------|-------------|-------|
| | CPP | GA | CPP | GA |
| Mandarina | 35-55 | 20-30 | 30-35 | 15-20 |
| Limón | 45-60 | 35-40 | 20-25 | 20-27 |
| Pomelo | 35-45 | 20-30 | 20-25 | 20-25 |
| Naranja | 30-42 | 15-30 | 30-40 | 20-25 |

Tabla 9.3. Producción de ácido galaturónico y citrus pulp pellets (CPP) (kg/ 1000 kg CPW) tras el procesado SF y SSF, con diluciones de 2:1 (v:v).

| | Proceso SF | | Proceso SSF | |
|------------------|------------|-------|-------------|-------|
| | CPP | GA | CPP | GA |
| Mandarina | 70-80 | 55-60 | 25-40 | 75-80 |
| Limón | 90-130 | 45-50 | 30-35 | 70-85 |
| Pomelo | 40-60 | 37-40 | 15-30 | 55-65 |
| Naranja | 60-80 | 55-60 | 35-45 | 50-65 |

9.3. Recuperación de los aceites esenciales de cítricos mediante el pretratamiento de *steam explosion* y su concentración mínima inhibitoria frente al crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*.

Como ya se ha comentado, durante el pretratamiento de *steam explosion* se recupera prácticamente el total de los aceites esenciales presentes en las cortezas de cítricos. Estos aceites, ricos en multitud de compuestos de gran interés para industrias

cosméticas, farmacéuticas, etc, resultan ser un co-producto del proceso de producción de bioetanol a partir de cortezas de cítricos.

Se hicieron pruebas de pretratamiento de estas cortezas bien de forma directa (tratamiento en seco) o diluyéndolas con agua en proporción 2:1, w:w. Se realizaron ensayos con distintos tipos de calentamiento y formas de descompresión (frente a vacío o frente a presión ambiental) y también distintos valores de presión y temperatura.

Al final se concluyó que el tratamiento más eficaz, en la hidrólisis de los azúcares complejos de esta biomasa y en la liberación de los aceites esenciales, fue a 6 bar de presión, durante 5 minutos y realizando descompresión frente a presión atmosférica.

Para los distintos cítricos, la cantidad de aceites esenciales extraídos mediante este pretratamiento se muestra en la Figura 9.6. En el caso de las cortezas de mandarina y pomelo, se tuvo un rendimiento de entre 3 y 4 L CEOs/ Tn corteza, mientras que para naranja se tuvo un valor ligeramente superior (entre 4-5 L CEOs/ Tn corteza). Para el caso del limón, se tienen mejores resultados, alcanzándose producciones de aceites esenciales de entre 5-6 L/Tn de corteza.

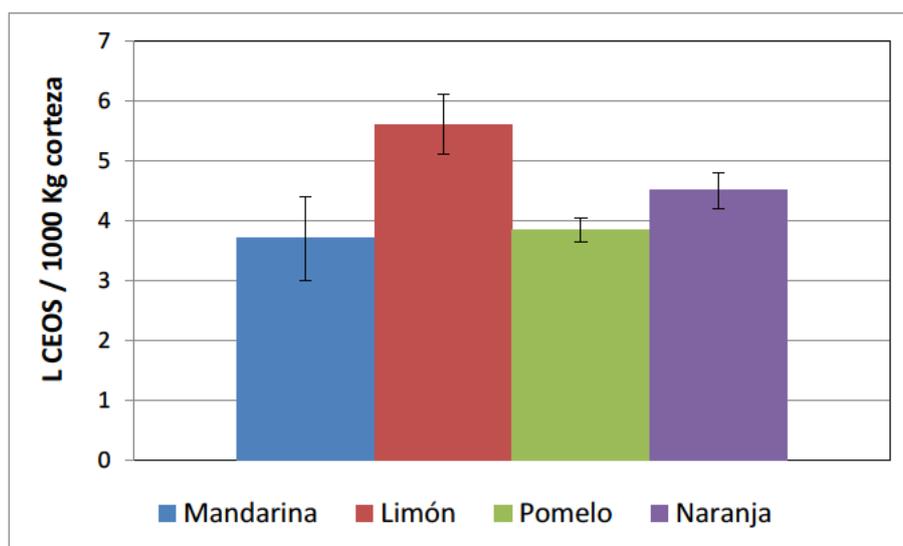


Figura 9.6. Rendimiento en aceites esenciales de cítricos (L/ 1000 kg corteza) tras el tratamiento de *steam explosion*.

Considerando que tras el pretratamiento no todos los aceites esenciales son eliminados de la corteza, se realizaron pruebas para determinar la concentración mínima inhibitoria a partir de la cual no se tiene producción de etanol.

Según se muestra en la Tabla 9.4, la concentración de los aceites esenciales que inhibe la fermentación alcohólica de cortezas de cítricos es distinta según se trate de pieles de naranja, pomelo, mandarina o limón. Las concentraciones por encima de las cuales no hay producción de etanol para cortezas de mandarina, limón, pomelo y naranja son de 0,16, 0,2, 0,05 y 0,05 v/w, respectivamente.

En el caso de los aceites esenciales de pomelo (compuestos en un 80% por aceite esencial de limoneno), la concentración mínima inhibitoria es inferior a la del resto de aceites de cítricos. Además se ha visto que los mayores rendimientos en etanol, obtenidos a partir de cortezas de pomelo pretratadas, se tienen cuando la concentración de aceite esencial se encuentra en valores muy bajos (entorno al 0,006%).

Por el contrario en el caso del limón, en donde la concentración de limoneno es inferior al resto de cítricos (52%), la concentración mínima necesaria para la inhibición de la fermentación es superior al resto (0,20%). En este caso el efecto antimicrobiano que ejercen los aceites esenciales de limón sobre la fermentación resulta inferior al resto de cítricos.

Tabla 9.4. Concentración mínima inhibitoria de los distintos aceites esenciales de cítricos en fermentación alcohólica de pieles de cítricos sometidas a proceso SF

| Enzimas | Concentración mínima inhibitoria EOs (%v/w) | Concentración óptima EOs (%v/w) |
|----------------|--|--|
| MANDARINA | 0,16 | 0,065 |
| LIMÓN | 0,20 | 0,05 |
| POMELO | 0,05 | 0,006 |
| NARANJA | 0,06 | 0,028 |

9.4. Conclusiones

La composición química de las cortezas de cítricos, sometidas o no a tratamiento previo de *steam explosion*, depende fundamentalmente del material de procedencia. Mientras que en las cortezas de limón se encuentran cantidades significativas de celulosa y hemicelulosa, las cortezas de naranja y pomelo se caracterizan por su alto contenido en lignina.

No se ha observado ninguna influencia del contenido en lignina de las cortezas de cítricos sobre la producción de azúcares totales o fermentables mediante hidrólisis enzimática.

El pretratamiento de *steam explosion* mejora el rendimiento en azúcares fermentables y totales en la hidrólisis enzimática de cortezas de limón, naranja y mandarina, pero no en cortezas de pomelo.

Este pretratamiento permite obtener una producción de azúcares igual (en el caso de pieles de mandarina y naranja) o superior (pieles de limón) a la obtenida a partir de cortezas sin pretratar, utilizando un 70% menos de enzimas hidrolíticas.

Cuando la hidrólisis y fermentación tiene lugar con diluciones CPW:agua, 1:4 (w:w), el proceso SSF mejora el rendimiento en etanol con respecto al proceso SF para todos los cítricos, a excepción de la naranja. Sin embargo, esta mayor producción de etanol, en caso de proceso SSF, se da a expensas de una menor producción de CPP.

La dosis enzimática utilizada en la hidrólisis de las cortezas de cítricos no influye en la producción de CPP y ácido galacturónico. Sin embargo, el que los procesos de hidrólisis y fermentación tengan lugar de forma simultánea o no condicionan la producción final de estos co-productos.

Cuando la hidrólisis y fermentación tiene lugar de forma separada, para una misma dosis enzimática, el rendimiento en etanol es de aproximadamente el doble cuando la dilución de estas pieles en agua está en proporción CPW:agua de 2:1, v/v.

Los ensayos SSF realizados con diluciones CPW:agua de 2:1 v/v, muestran una mejora en el rendimiento de etanol con respecto a las pruebas realizadas con diluciones CPW:agua de 1:4, en el caso de cortezas de limón y de pomelo.

La cantidad de aceites esenciales obtenidos mediante el tratamiento *de steam explosion* depende únicamente de la materia prima con la que se trabaje. En nuestro caso, la mayor producción se tuvo para cortezas de limón, alcanzando valores de 5-6 L/Tn de corteza.

PARTE IV

CONCLUSIONES GENERALES Y BIBLIOGRAFÍA

CAPÍTULO 10

Conclusiones

Conclusiones generales

- El pretratamiento de *steam explosion* en condiciones húmedas, con dilución agua: biomasa de 1:2 w:w, aplicación de presión de entre 5 y 6 bares y descompresión brusca frente a condiciones de presión atmosférica en un tanque unido a un condensador refrigerado con agua fría a 2°C, fue el más eficiente en la recuperación de los aceites esenciales presentes en la corteza de cítricos, fraccionamiento de la hemicelulosa, y liberación y separación de fibras de celulosa.
- Mediante el tratamiento de *steam explosion* en las condiciones detalladas anteriormente, se consigue una recuperación de más del 90% de los aceites esenciales presentes en los subproductos cítricos de extracción de zumos de mandarina, limón, pomelo, y naranja. Esto supone un rendimiento de 4 a 6 L de aceites esenciales / 1000 kg de subproductos cítricos, en función del tipo de subproducto cítrico tratado.
- El pretratamiento de *steam explosion* produce una mejora del rendimiento en azúcares totales y fermentables en la hidrólisis enzimática, utilizando dosis enzimáticas un 70% inferiores a la dosis recomendada por otros autores, en el caso de subproductos cítricos de limón y mandarina. En el caso de los subproductos cítricos de naranja y pomelo, el pretratamiento permite obtener igual concentración en azúcares totales y fermentables que con cortezas no pretratadas, pero se consigue una reducción del 70% de la dosis enzimática recomendada por otros autores en la producción de hidrolizados a partir de los subproductos cítricos.
- A excepción de las cortezas de naranja, el proceso SSF mejora el rendimiento en etanol (que puede llegar a ser hasta de 80 L de etanol / 1000 kg de subproductos cítricos frescos) con respecto al proceso SF, independientemente de la dosis

enzimática utilizada en la hidrólisis (en limón y mandarina se consiguen estos rendimientos con reducciones de hasta el 90% de la dosis enzimática recomendada, REC). Sin embargo, esta mayor producción de etanol en el caso del proceso SSF se produce a expensas de una menor producción de CPP (que llega a ser superior a 80 kg de CPP / 1000 kg de subproductos cítricos frescos).

- Cuando se realiza la hidrólisis y fermentación por separado (proceso SF), el rendimiento en etanol es aproximadamente el doble cuando las cortezas se diluyen en agua en proporción CWP pretratada: agua de 2:1 (v:v). En el caso de utilizar el proceso SSF, el rendimiento en etanol se mejora en el caso de subproductos cítricos de pomelo diluidos en agua en proporción 1:4 (v:v), y resulta indiferente para el resto de cítricos.
- La producción de ácido galacturónico (que puede llegar a ser hasta de 41 kg de GA / 1000 kg de subproductos cítricos) mediante la hidrólisis de los subproductos cítricos no se ve influenciada por el tratamiento con *steam explosion*, sino que depende fundamentalmente de la dosis de enzimas utilizadas y del tiempo de desarrollo de la hidrólisis enzimática.
- La caracterización llevada a cabo en los aceites esenciales de los cítricos estudiados pone de manifiesto que la composición y el comportamiento térmico es similar al que presentan los aceites comerciales correspondientes.
- Se ha puesto de manifiesto que se produce inhibición del crecimiento de *S. cerevisiae* en caldo de cultivo Sabouraud con concentraciones de aceite esencial de cítricos superiores a 0,025% (v/v). Por encima de esta concentración, el aceite ejerce un efecto bactericida y bacteriostático alargando la fase de latencia de la curva de crecimiento de la levadura.

- El componente mayoritario de los aceites esenciales extraídos de cortezas de cítricos mediante el tratamiento de *steam explosion* fue el limoneno, el cual supone el 52,4%, 80,1%, 74,2% y 79,35% del total de los constituyentes de los aceites esenciales de limón, pomelo, naranja y mandarina, respectivamente.
- Los flavonoides presentes en los subproductos cítricos dependen fundamentalmente del tipo de subproducto cítrico. En los subproductos cítricos sometidos a *steam explosion*, se pueden encontrar fundamentalmente hesperidina, dydimina, naringina y narirutina. De entre estos compuestos, se ha visto que la hesperidina y la naringina tienen un gran poder inhibidor de *Saccharomyces cerevisiae*, en concentraciones inferiores al 5% (w:v).

CAPÍTULO 11

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Adeleke, A.J., Odunfa, S.A., Olanbiwonninu, A., Owoseni, M.C. 2012. Production of Cellulase and Pectinase from Orange Peels by Fungi. *Nature and Science*, 10, 5, 107-112.
- Aguiar, L., Márquez-Montesinos, F., Gonzalo, A., Sánchez, J.L., Aranzo, J. 2008. Influence of temperature and particle size on fixed bed pyrolysis of orange peel residues. *Journal of analytical and applied pyrolysis*, 83(1), 124-130.
- Ahmad, A.L., Mat Yasin, N.H., Derek, C.J.C., Lim, J.K. 2011. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(1), 584-593.
- Ajanovic, A. 2011. Biofuels versus food production: Does biofuels production increase food prices?. *Energy*, 36, 2070-2076.
- Anagnostopoulou, M.A., Panagiotis, K., Kokkalou, E., Assimopoulou, A.N., Papageorgiou, V.P. 2005. Analysis of antioxidant compounds in sweet orange peel by HPLC-diode array detection-electrospray ionization mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 19, 138-148.
- Alfani, F., Gallifouco, A., Saporosi, A., Spera, A., Cantarella, M. 2000. Comparasion of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25, 184-192.
- Alves-Silva, J.M., Dias dos Santos, S.M., Pintado, M.E., Pérez-Alvarez, J.A., Fernández-López, J., Viuda-Martos, M. 2013. Chemical composition and in vitro antimicrobial, antifungal and antioxidant properties of essential oils obtained from some herbs widely used in Portugal. *Food Control*, 32(2), 371-378.
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Negro, M.J. 2010. Pretreatment for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource Technology*, 101(13), 4851-4861.
- Balat, M., Balat, H., Öz, C. 2008. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*, 34(5), 551-573.
- Balat, M., Balat, H. 2009. Recent trends in global production and utilization of bioethanol fuel. *Applied Energy*, 86 (11), 2273-2282.

- Balat, M. 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. *Energy Conversion and Management*, 52, 2, 858-875.
- Bampidis, V.A., Robinson, P.H. 2006. Citrus by-products as ruminant feeds: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 128, 175–217.
- Baranyi, J., Roberts, T.A., McClure, P. 1993. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiology*, 10(1), 43-59.
- Belletti, N., Ndagijimana, M., Sisto, C., Guerzoni, M.E., Lanciotti, R., Gardini, F. 2004. Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essences on *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6932-6938.
- Belisario-Sánchez, Y.Y., Taboada-Rodríguez, A., Marín-Iniesta, F., López-Gómez, A. 2009. Dealcoholized wines by spinning cone column distillation: phenolic compounds and antioxidant activity measured by the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15), 6770-6778.
- Beltrán, F., Pérez-López, A.J., López-Nicolas, J.M., Carbonell-Barrachina, A.A. 2008. Effects of mandarin cultivar on quality of mandarin juice. *Food Science Technology International*, 14(4), 307-313.
- Benelli, P., Riehl, C.A.S., Smânia, Jr., Smânia, E.F.A., Ferreira, S.R.S. 2010. Bioactive extracts of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pomace obtained by SFE and low pressure techniques: Mathematical modeling and extract composition. *The journal of Supercritical Fluids*, 55, 132-141.
- Bergeron, C., Carrier, D.J., Ramaswamy, S. 2012. Potential Value-Added Co-products from Citrus Fruit Processing. En: *Biorefinery Co-Products: Phytochemicals, Primary Metabolites and Value-Added Biomass Processing*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. doi: 10.1002/9780470976692.ch8
- Blottnitz, H.V., Curran, M.A. 2007. A review of assessments conducted on bio-ethanol as a transportation fuel from a net energy, greenhouse gas, and environmental life cycle perspective. *Journal of Cleaner Production*, 15, 607-619.
- Bobleter, O. 1994. Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. *Progress in Polymer Science*, 19, 797-841.
- Braddock, R.J. 1999. *Handbook of Citrus By-products Processing Technology*. John Wiley and Sons, New York.

- Burnes, E., Wichelns, D., Hagen, J.W. 2005. Economic and policy implications of public support for ethanol production in California's San Joaquin Valley. *Energy Policy*, 33, 1155–1167.
- Caccioni, D.R.L., Guizzardi, M., Biondi, D.M., Agatino, R., Ruberto, G. 1998. Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *International Journal of Food Microbiology*, 43, 1-2, 73-79.
- Cantos, E., García-Viguera, C., Pascual-Teresa, S., Tomás-Barberán, F.A. 2000. Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolic of cv. Napoleon table grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4606-4612.
- Caparra, P., Foti, F., Scerra, M., Sinatra, M.C., Scerra, V. 2007. Solar-dried citrus pulp as an alternative energy source in lamb diets: effects on growth and carcass and meat quality. *Small Ruminant Research*, 68, 303-311.
- Cardona, C.A. y Sánchez. 2007. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology*, 98, 2415-2457.
- Chang, V.S., Holtzaple, M.T. 2000. Fundamental factors affecting enzymatic reactivity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84-86, 5-37.
- Chen, B., Chen, Z. 2009. Sorption of naphthalene and 1-naphthol by biochars of orange peels with different pyrolytic temperatures. *Chemosphere*, 76, 127–133.
- Choi, I.S., Kim, J.H., Wi, S.G., Kim, K.H., Bae, H.J. 2013. Bioethanol production from mandarin (*Citrus unshiu*) peel waste using popping pretreatment. *Applied Energy*. 102, 204–210.
- Chutia, M., Deka Bhuyan, P., Pathak, M.G., Sarma, T.C., Boruah, P. 2009. Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *LWT- Food Science and Technology*, 42, 777-780.
- Cushnie, T.P. y Lamb, A.J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 343-356.
- Damien, A. 2010. La fermentación alcohólica. En: Damien, A. (Ed). La biomasa, fundamentos, tecnología y aplicaciones, AMV Ediciones, Mundi-Prensa, pp-161-173.

- De Gregorio, A., Mandalari, G., Arena, N., Nucita, F., Tripodo, M.M., Lo Curto, R.B. 2002. SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps. *Bioresource Technology*, 83, 89-94.
- Delmer, D.P., Amor, Y. 1995. Cellulose biosynthesis. *Plant Cell*, 7, 987-1000.
- Dodic, S., Popov, S., Dodic, J. Rankovic, J., Zavargo, Z., Mucibabic, R.J. 2009. Bioethanol production from thick juice as intermediate of sugar beet processing. *Biomass and Bioenergy*, 33, 822-827.
- Duff, S.J.B. y Murray, W.D. 1996. Bioconversion of forest products industry waste cellulosic to fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology*, 55, 1-33.
- Eagle, H., Musselman, A.D. 1948. The rate of bactericidal action of *Penicillin* in vitro as a function of its concentration, and its paradoxically reduced activity at high concentrations against certain organisms. *The Journal of Experimental Medicine*, 88(1), 99-131.
- Edwards, M. C., Doran-Peterson, J. 2012. Pectin-rich biomass as feedstock for fuel ethanol production. *Applied microbiology and biotechnology*, 95, 3, 565-575.
- Einhorn-Stoll, U., Zunzek, H., Dongowski, G. 2007. Thermal analysis of chemically and mechanically modified pectins. *Food Hydrocolloid*, 21, 1101-1112.
- Einhorn-Stoll, U., Kunzek, H. 2009. Thermoanalytical characterization of processing-dependent structural changes and state transitions of citrus pectin. *Food hydrocolloids*, 23(1), 40-52.
- Espina, L., Somolinos, M., Lorán, S., Conchello, P., García, D., Pagán, R. 2011. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity alone or in combined processes. *Food Control*, 22, 896-902.
- Ferhat, M.A., Meklati, B.Y., Chemat, F. 2007. Comparison of different isolation methods of essential oil from citrus fruits: cold pressing, hydrodistillation and microwave “dry” distillation. *Flavour and Fragrance Journal*, 22, 494-504.
- García-Barneto, J., Ariza-Carmona, J., Martín-Alfonso, J.E., Jiménez-Alcaide, L. 2009. Use of autocatalytic kinetics to obtain composition of lignocellulosic materials. *Bioresource Technology*, 100, 3963-3973.
- Ghosh, P., Ghose, T.K. 2003. Bioethanol in India: recent past and emerging future. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 85, 1-27.

- González, F.P., Ruiz, J.M., Rodríguez, C.B., Belisario, Y.Y., López-Gómez, A. 2008. Producción de bioetanol y CPP a partir de subproductos de la extracción de zumos cítricos. *Actas del IV Congreso Español de Ingeniería de Alimentos – II Congreso Iberoamericano sobre Seguridad Alimentaria*. Universidad Politécnica de Cataluña. Barcelona.
- González-Molina, E., Domínguez-Perles, R., Moreno, D.A., García-Viguera, C. 2010. Natural bioactive compounds of *Citrus limon* for food and health. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(2), 327-345.
- Grohmann, K., Baldwin, E.A., Buslig, B.S., Ingram, L.O. 1994a. Fermentation of galacturonic acid and other sugars in orange peel hydrolysates by the ethanologenic strain of *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 16, 281-286.
- Grohmann, K., Baldwin, E.A., Buslig, B.S. 1994b. Production of ethanol from enzymatically hydrolyzed orange peel by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 45(46), 315-327.
- Grohmann, K., Cameron, R.G., Buslig, B.S. 1995a. Fermentation of sugars in orange peel hydrolysates to ethanol by recombinant *Escherichia coli* K011. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 51(52), 423-435.
- Grohmann, K., Cameron, R.G., Buslig, B.S., 1995b. Fractionation and pre-treatment of orange peel by dilute acid hydrolysis. *Bioresource Technology*, 54, 129-141.
- Grohmann, K., Cameron, R.G., Buslig, B.S. 1996. Fermentation of orange peel hydrolysates by ethanologenic *Escherichia coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 57 (58), 383-388.
- Grohman, K., Cameron, R., Kim, Y., Widmer, W., Luzio, G. 2013. Extraction and recovery of pectic fragments from citrus processing waste for co-production with ethanol. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 88, 3, 395–407.
- Hahn-Hagerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M.F., Liden, G., Zacchi, G. 2006. Bioethanol-the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*, 24, 549-556.
- Hari-Krishna, S., Chowdary, G.V. 2000. Optimization of simultaneous saccharification and fermentation for the production of ethanol from lignocellulosic biomass. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 48, 1971-1976.

- Hazra, A., Alexander, K., Dollimore, D., Riga, A. 2004. Characterization of some essential oils and their key components. Thermoanalytical techniques. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 75, 317-330.
- Hendriks, A.T.W.M., Zeeman, G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100, 10-18.
- Huisjes, E.H., de Hulster, E., van Dam, J.C., Pronk, J.T., van Maris, A.J. 2012. Galacturonic Acid Inhibits the Growth of *Saccharomyces cerevisiae* on Galactose, Xylose, and Arabinose. *Applied and environmental microbiology*, 78(15), 5052-5059.
- Igual, M., García-Martínez, M.M., Camacho, M., Martínez-Navarrete, N. 2011. Changes in flavonoid content of grapefruit juice caused by thermal treatment and storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12, 153-162.
- Justessen, U., Knuthesen, P., Leth, T. 1998. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 799, 101-110.
- Kang, S.W., Park, Y.S., Lee, J.S., Hong, S.I. y Kim, S.W. 2004. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 91, 153-156.
- Kaur Sandhu, S., Singh Oberoi, H., Singh Dhaliwal, S., Babbar, N., Kaur, U., Nanda, D., Kumar, D. 2012. Ethanol production from Kinnow mandarin (*Citrus reticulata*) peels via simultaneous saccharification and fermentation using crude enzyme produced by *Aspergillus oryzae* and the thermotolerant *Pichia kudriavzevii* strain. *Annals of Microbiology*, 62, 2, 655-666.
- Kleijn, A., González, F.P., Rodríguez, C.B., García, L., López-Gómez, A. 2009. Modified steam explosion process for pre-treatment of citrus peel wastes for ethanol production. *International Fuel Ethanol Workshop & Expo*, June 15-18 2009 Denver (Colorado) USA.
- Klinke, H.B., Thomsen, A.B., Ahring, B.K. 2004. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66, 10-26.

- Kristensen, J.B., Thygesen, L.G., Felby, C., Jorgensen, H., Elder, T. 2008. Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production. *Biotechnology and Biofuels*, 1, 5-14.
- Kumar, S., Singh, S.P., Mishra, I.M., Adhikari, D.K. 2009. Recent advances in production of bioethanol from lignocellulosic biomass. *Chemical Engineering Technology*, 32 (4), 517-526.
- Kumar, L., Arantes, V., Chandra, R., Saddler, J. 2012. The lignin present in steam pretreated softwood binds enzymes and limits cellulose accessibility. *Bioresource Technology*, 103, 201-208.
- Kurakake, M., Ide, N., Komaki, T. 2007. Biological pretreatment with two bacterial strains for enzymatic hydrolysis of office paper. *Current Microbiology*, 54(6), 424-428.
- Laser, M., Schulman, D., Allen, S.G., Lichwa, J., Antal Jr., M.J., Lynd, L.R. 2002. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresource Technology*, 81, 33-44.
- Laufenberg, G., Kunz, B., Nystroem, M. 2003. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Bioresource Technology*, 87, 167-198.
- Linde, M., Galbe, M., Zacchi, G. 2007. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated barley straw at low enzyme loadings and low yeast. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1100-1107.
- López-Gómez, A. 2007. Producción de bioetanol a partir de subproductos cítricos. *Argem Informa*, 28-17.
- López-Gómez, A. 2008. Primeros resultados del proyecto Citranol para desarrollar una planta de bioetanol a través de subproductos cítricos. *Argem Informa*, 31: 11.
- López-Gómez, A., Ros-Chumillas, M., Belisario-Sánchez, Y.Y. 2009. Packaging and the shelf life of orange juice. En: Robertson, G.L. (Ed), *Food Packaging and Shelf Life. A Practical Guide*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 179-198.
- Lu, Y., Wang, Y., Xu, G., Chu, J., Zhuang, Y., Zhang, S. 2010. Influence of high solid concentration on enzymatic hydrolysis and fermentation of steam-exploded corn stover biomass. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 160, 360-369.
- Lynd, L.R., Wyman, C.E., Gerngross, T.U. 1999. *Biocommodity engineering*, 15, 777-793.

- Mamma, D., Kourtoglou, E., Christakopoulos, P. 2008. Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. *Bioresource Technology*, 99, 2373-2383.
- Mandalari, G., Bennett, R.N., Bisignano, G., Trombetta, D., Saija, A., Faulds, C.B., Gasson, M.J., Narbad, A. 2007. Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia Risso*) peel, a byproduct of the essential oil industry. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2056-2064.
- Margeot, A., Hahn-Hagerdal, B., Edlund, M., Slade, R., Monot, F. 2009. New improvements for lignocellulosic ethanol. *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 372-380.
- Marín, F.R., Soler-Rivas, C., Benavente-García, O., Castillo, J., Pérez-Alvarez, J.A. 2007. By-products from different citrus processes as a source of customized functional fibres. *Food Chemistry*, 100, 736-741.
- Martins, P., Sbaite, P., Benites, C., Maciel, M. 2011. Thermal characterization of orange, lemongrass, and basil essential oils. *Chemical Engineering Transactions*, 24, 463-468.
- Masmoudi, M., Besbes, S., Ben Thabet, I., Blecker, C., Attia, H. 2010. Pectin extraction from lemon by-product with acidified date juice: rheological properties and microstructure of pure and mixed pectin gels. *Food Science and Technology International*, 16(2), 105-114.
- Mielenz, J.R., Bardsley, J.S., Wymana, C.E. 2009. Fermentation of soybean hulls to ethanol while preserving protein value. *Bioresource Technology*, 100, 3532-3539.
- MITC, 2010. Ministerio de Industria, Turismo y Comercio. *La energía en España 2010*, Gobierno de España. Madrid.
- Molnár, E., Eszterle, M., Kiss, K., Nemestóthy, N., Fekete, J., Bélafi-Bakó, K. 2009. Utilization of electrodialysis for galacturonic acid recovery. *Desalation*, 241, 81-85.
- Mooney, C.A., Mansfield, S.D., Touhy, M.G., Saddler, J.N. 1998. The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods. *Bioresource Technology*, 64, 113-119.

- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapfle, M., Ladisch, M. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *BioresourceTechnology*, 96, 673-686.
- Negro, M.J, Manzanares, P., Ballesteros, I., Oliva, J.M., Cabañas, A., Ballesteros, M. 2003. Hydrothermal pretreatment conditions to enhance ethanol production from poplar biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 105-108, 87-100.
- Oberoi, H.S., Vadlani, P.V., Madl, R.L., Saida, L., Abeykoon, J.P. 2010. Ethanol production from orange peels: two stage hydrolysis and fermentation studies using optimized parameters through experimental design. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3422-3429.
- Oliva, J.M., Sáez, F., Ballesteros, I., González, A., Negro, M.J., Manzanares, P., Ballesteros, M. 2003. Effect of lignocellulosic degradation compounds from steam explosion pretreatment on ethanol fermentation by thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 105, 1-3, 141-153.
- Oliva, J.M., Ballesteros, I., Negro, M.J., Manzanares, P., Cabañas, A., Ballesteros, M. 2004. Effect of binary combinations of selected toxic compounds on growth and fermentation of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology Progress*, 20, 715-720.
- Olofsson, K., Bertilsson, M., Lidén, G. 2008. A short review on SSF, an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels*, 1(7), 1-14.
- Orts, W.J., Holtman, K.M., Seiber, J.N. 2008. Agricultural Chemistry and Bioenergy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3892-3899.
- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B. 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 74, 25-33.
- Palonen, H., Thomsen, A.B., Tenkanen, M., Schmidt, A.S., Viikari, L. 2004. Evaluation of wet oxidation pretreatment for enzymatic hydrolysis of softwood. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 117, 1-17.
- Pourbafrani, M., Talebnia, F., Niklasson, C., Taherzadeh, M.J. 2007. Protective effect of encapsulation in fermentation of limonene-contained media and orange peel hydrolyzate. *International Journal of Molecular Sciences*, 8, 777-787.

- Prado, M., Ballesteros, I., González, A., Oliva, J.M., Ballesteros, I., Negro, M.J. 2006. Effect of inhibitors released during steam-explosion pretreatment of barley straw on enzymatic hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 129, 1-3.
- Ramos, L.P. 2003. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Quimica Nova*, 26(6), 863-871.
- Rankin, M., Mojovic, L., N., Nikolic, S., Vukasinovic, M., Nedovic, V. 2009. Bioethanol production by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* cells. *African Journal of Biotechnology*, 8(3), 464-471.
- Rezzoug, S.A., Louka, N. 2009. Thermomechanical process intensification for oil extraction from orange peels. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 530-536.
- Ruiz, E., Cara, C., Manzanares, P., Ballesteros, M., Castro, E. 2008. Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. *Enzyme and Microbial Technology*, 42, 160-166.
- Salas, M.P., Céliz, G., Geronazzo, H., Daz, M., Resnik, S.L. 2011. Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species. *Food Chemistry*, 124, 1411-1415.
- Sánchez, O.J., Cardona, C.A. 2008. Review of trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*, 99, 5270-5295.
- Scott, W.C., Veldhuis, M.K. 1966. Rapid estimation of recoverable oil in citrus juices by bromate titration. *Journal of AOAC International*, 49, 628-633.
- Shahbazi, A., Li, Y., Mims, M.R. 2005. Application of sequential aqueous steam treatments to the fractionation of softwood. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121-124, 973-987.
- Shi, P., He, Q., Song, Y., Qu, H., Cheng, Y. 2007. Characterization and identification of isomeric flavonoid O-diglycosides from genus Citrus in negative electrospray ionization by ion trap mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 598, 110-118.
- Stewart, D.A., Widmer, W.W., Grohmann, K., Wilkins, M.R. 2006. Ethanol production from citrus processing waste. *US Patent 2006 / 0177916 A1*.
- Sukumaran, R.K., Pandey, A. 2009. Ethanol from Biomass. In: Biswas, S., Basak, P.R., Kaushik, N. (Eds). *Bioprocess and Bioproducts, Emerging Trends*. TIFAC, New Delhi, pp. 13-36.

- Sukumaran, R.K., Surender, V.J., Sindhu, R., Binod, P., Janu, K.U., Sajna, K.V., Rajasree, K.P., Pandey, A. 2010. Lignocellulosic ethanol in India: Prospects, challenges and feedstock availability. *Bioresource Technology*, 101, 4826-4833.
- Sun, X.F., Xu, F., Sun, R.C., Geng, Z.C., Fowler, P., Baird, M.S. 2005. Characteristics of degraded hemicellulosic polymers obtained from steam exploded wheat straw. *Carbohydrate Polymers*, 60(1), 15-26.
- Talebnia, F., Pourbafrani, M., Lundin, M., Taherzadeh, M.J. 2008. Optimization study of citrus wastes saccharification by dilute-acid hydrolysis. *Bioresources*, 3(1), 108-122.
- Taherzadeh, M., Karimi, K. 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 9, 1621-1651.
- Tengerdy, R.P., Szakacs, G. 2003. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13, 169-179.
- Thompson, D.N., Chen, H.C., Grethlein, H.E. 1992. Comparison of pretreatment methods on the basis of available surface area. *Bioresource Technology*, 39, 155-163.
- Tripodo, M.M., Lanuzza, F., Micali, G., Coppolino, R., Nucita, F. 2004. Citrus waste recovery: a new environmentally friendly procedure to obtain animal feed. *Bioresource Technology*, 91, 111-115.
- Tserennadmid, R., Takó, M., Galgoczy, L., Papp, T., Pesti, M., Vagvolgyi, C., Almassy, K., Krisch, J. 2011. Anti yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 480-486.
- Uribe, S., Ramirez, J., Peña, A. 1985. Effects of β -pinene on yeast membrane functions. *Journal of Bacteriology*, 161, 1195-1200.
- USDA, 2008. *World markets and trade: orange juice*. United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service, Office of Global Analysis, April 2008.
- Uysal, B., Sozmen, F., Aktas, O., Oksal, B.S., Odabas Kose, E. 2011. Essential oil composition and antibacterial activity of the grapefruit (*Citrus Paradisi* L.) peel essential oils obtained by solvent-free microwave extraction: comparison with

- hydrodistillation. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 1455-1461.
- Vanamala, J., Reddivari, L., Yoo, K.S., Pike, L.M., Patil, B.S. 2006. Variation in the content of bioactive flavonoids in different brands of orange and grapefruit juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 157-166.
- Ververis, C., Georghiou, K., Danielidis, D., Hatzinikolaou, D.G., Santas, P., Santas, R., Corleti, V. 2007. Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements. *Bioresource Technology*, 98, 296-301.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Perez-Alvarez, J. 2008. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon L.*), mandarin (*Citrus reticulata L.*), grapefruit (*Citrus paradise L.*) and orange (*Citrus sinensis L.*) essential oils. *Food Control*, 19, 1130-1138.
- Wang, K., Jiang, J-X., Xu, F., Sun, R-C. 2009. Influence of steaming explosion time on the physico-chemical properties of cellulose from *Lespedeza stalks (Lespedeza crybotrya)*. *Bioresource Technology*, 100, 5288-5294.
- White, T., Hindle, C. 2000. Genetic constructs and genetically modified microbes for enhanced production of beta-glucosidase. *US Pat. 6015703* (to logen Corporation, Ottawa, CA), 18 January, 2000.
- Widmer, W.W., Narciso, J.A., Grohmann K., Wilkins, M.R. 2009. Simultaneous saccharification and fermentation of orange processing waste to ethanol using *Kluyveromyces marxianus*. *Biological Engineering*, 2,17-29.
- Widmer W., Zhou W., Grohmann K. 2010. Pretreatment effects on orange processing waste for making ethanol by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology* 101, 14, 5242-5249.
- Wingren, A., Galbe, M., Zacchi, G. 2003. Technoeconomic evaluation of producing ethanol from softwood: Comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnology Progress*, 19(4), 1109-1117.
- Wilkins, M.R., Widmer, W.W., Cameron, R.G., Grohmann, K. 2005. Effect of seasonal variation on enzymatic hydrolysis of Valencia orange peel. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 118, 419-22.
- Wilkins, M.R., Suryawati, L., Chrz, D., Maness, N.O. 2007a. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* in the presence of

- orange peel oil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 1161-1168.
- Wilkins, M.R, Widmer, W.W., Grohmann, K., Cameron, R.G. 2007b. Hydrolysis of grapefruit peel waste with cellulase and pectinase enzymes. *Bioresource Technology*, 98, 1596–1601.
- Wilkins, M.R., Widmer, W.W., Grohmann, K. 2007c. Simultaneous saccharification and fermentation of citrus peel waste by *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol. *Process Biochemistry*, 42, 1614-1619.
- Wilkins, M.R. 2009. Effect of orange peel oil on ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Biomass and Bioenergy*, 33, 538-541.
- Wooley, R., Ruth, M., Glassner, D., Sheejan, J. 2008. Process design and costing of bioethanol technology: a tool for determining the status and direction of research and development. *Biotechnology Progress*, 15, 794-803.
- Yang, H., Yan, R., Chen, H., Lee, D.H., Zheng, C. 2007. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel*, 86, 1781-1788.
- Yu, Z., Zhang, B., Yu, F., Xu, G., Song, A. 2012. A real explosion: The requirement of steam explosion pretreatment. *Bioresource Technology*, 121, 335–341.
- Zhang, Y., Zhu, Y., Zhu, Y., Li, Y. 2009. The importance of engineering physiological functionality into microbe. *Trends in Biotechnology*, 27, 12, 664-672.
- Zhou W., Widmer W., Grohmann K. 2007. Economic analysis of ethanol production from citrus peel waste. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 120, 310–315.
- Zhou W., Widmer W., Grohmann K. 2008. Developments in ethanol production from citrus peel waste. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 121, 307–310.
- Zhu, L., O’Dwyer, J.P., Chang, V.S., Granda, C.B., Holtzaple, M.T. 2008. Structural features affecting biomass enzymatic digestibility. *Bioresource Technology*, 99, 9, 3817–3828.

PUBLICACIONES



Mandarin peel wastes pretreatment with steam explosion for bioethanol production

María Boluda-Aguilar, Lidia García-Vidal, Fayiny del Pilar González-Castañeda, Antonio López-Gómez *

Food Engineering and Agricultural Equipment Department, Technical University of Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48 E-30203 Cartagena, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 October 2009

Received in revised form 15 December 2009

Accepted 16 December 2009

Available online 21 January 2010

Keywords:

Enzymatic hydrolysis

Steam explosion

Bioethanol

Mandarin citrus peel wastes

ABSTRACT

The mandarin (*Citrus reticulata* L.) citrus peel wastes (MCPW) were studied for bioethanol production, obtaining also as co products: α limonene, galacturonic acid, and citrus pulp pellets (CPP). The steam explosion pretreatment was analysed at pilot plant level to decrease the hydrolytic enzymes requirements and to separate and recover the α limonene. The effect of steam explosion on MCPW lignocellulosic composition was analyzed by means thermogravimetric analysis. The α limonene contents and their influence on ethanol production have been also studied, while concentration of sugars, galacturonic acid and ethanol have been analysed to measure the saccharification and fermentation (HF and SSF) processes efficiency obtained by MCPW steam explosion pretreatment. Ethanol contents of 50–60 L/1000 kg raw MCPW can be obtained and CPP yields can be regulated by means the control of enzymes dose and the steam explosion pretreatment which can significantly reduce the enzymes requirements.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

From data of USDA (2008) world orange juice production during marketing year 2007/2008 in selected major producing countries is estimated at 2.3 million metric tons (65 degrees Brix), so the worldwide industrial citrus peel wastes may be estimated in more than 15×10^6 t. Citrus peel wastes are partly used for cattle feed either fresh or after ensilage or dehydration (Talebna et al., 2008), but considerable quantity of citrus pulp in the fresh state is lost as a result of the difficulty of rapidly disposing a large quantity of the wastes in a fairly short period of time, then a huge amount of it is still discarded to nature, causing several environmental problems (Caparra et al., 2007). So, the disposal of these citrus wastes poses a serious problem for citrus industries around the world, but due to territorial production concentration, it is specially important in USA (generating 3.2 million metric tons of citrus processing waste in the 2005–2006 growing season, mainly in the State of Florida) (Wilkins, 2009), Brazil (mainly in the Region of Sao Paulo, generating more than twice the amount of Florida), and Mediterranean countries (with more than 1.5 million metric tons between Spain, Italy, Greece, Egypt, Turkey and Morocco) (López Gómez et al., 2009; Caparra et al., 2007; Ververis et al., 2007; Mamma et al., 2008). In Spain, the average production of citrus peel wastes per year is near 500,000 t, being approximately the 30% from mandarin citrus juice squeezing. The citrus juice from mandarin is produced mainly in Spain and China (with an estimate worldwide mandarin citrus juice production of 1.5 million tonnes)

but its cultivation is spreading to the typical areas of citrus production around the world (Beltrán et al., 2008).

Mandarin peel wastes are a potential feedstock for production of bioethanol due to their high carbohydrate content similar to other studied feedstocks (see Table 1) (Marin et al., 2007; Mielenz et al., 2009). However, and despite the importance of mandarin peel wastes volume, any published research work has studied the possibility of its use in ethanol production, although there are studies about other uses: for essential oils recovery (Viuda Martos et al., 2008; Chutia et al., 2009), as fermentation substrate for production of multienzyme preparations (Mamma et al., 2008), for pectin extraction (Cho et al., 2003; Kurita et al., 2008) or as a source of customized functional fibres (Marin et al., 2007).

The use of orange and grapefruit peel wastes for obtaining ethanol have been studied (Grohmann et al., 1994, 1995a,b; Wilkins et al., 2005, 2007a,b,c; Talebna et al., 2008; Wilkins, 2009). But, pretreatments such as dilute acid and steam explosion, prior to enzymatic hydrolysis and fermentation, have been studied only for orange peel wastes (Grohmann et al., 1995b; Wilkins et al., 2007c; Talebna et al., 2008). Also the presence and production of inhibitors (α limonene, furfural, hydroxymethylfurfural, HMF) and their removal have been studied only for orange peel wastes hydrolyzates (Wilkins et al., 2007a,c; Wilkins, 2009; Pourbafrani et al., 2007; Talebna et al., 2008). But, the relation between steam explosion pretreatment and residual content of α limonene in exploded citrus peel wastes have been not enough studied, as only the work of Rezzoug and Louka (2009) is found, analyzing the thermomechanical process intensification for oil extraction from orange peels. In fact, the citrus peel wastes (CPW) studied by Wilkins et al. (2007c) contained 0.8–1.6% (v/w) of α limonene,

* Corresponding author. Tel.: +34 968 325516; fax: +34 968 325433.
E-mail address: antonio.lopez@upct.es (A. López-Gómez).

Table 1
Chemical composition of different lignocellulosic feedstocks.

| Biomass | Ash (% of DW) | Sugars (% of DW) | Fat (% of DW) | Protein (% of DW) | Pectin (% of DW) | Lignin (% of DW) | Cellulose (% of DW) | Hemicellulose (% of DW) |
|----------------------------|---------------|------------------|---------------|-------------------|------------------|------------------|---------------------|-------------------------|
| Mandarin Peel ^a | 5.0(3.0) | 10.1(21.6) | 1.6(nd) | 7.5(nd) | 16.0(14.2) | 8.6(8.9) | 22.5(20.8) | 6.0(17.2) |
| Orange Peel ^b | 2.6 | 9.6 | 4.0 | 9.1 | 23.0 | 7.5 | 37.1 | 11.0 |
| Soybean hulls ^c | 1.0–5.8 | nd | nd | 9.0–14.0 | 6.0–15.0 | 1.0–4.0 | 29.0–51.0 | 10.0–20.0 |
| Corn stover ^d | 4.0–8.0 | nd | nd | 4.0–9.0 | 0 | 16.0–23.0 | 31.0–41.0 | 20.0–34.0 |
| Wheat straw ^e | 1.0–10.0 | nd | nd | 2.0–6.0 | 0 | 5.0–19.0 | 32.0–49.0 | 23.0–39.0 |

^{a,b}From Marin et al. (2007) for citrus peels from Spanish citrus juice factories. The values for mandarin peel in (X) from analysis of the authors of this paper.

^{c,d,e}From Mielenz et al. (2009); nd = no data.

and after pretreatment with live steam in a continuous tube reactor (jet cooker) at 150–160 °C for approximately 2–4 min (with flashing to a cyclone). The α -limonene content of steam exploded CPW was 0.08% (v/w) (with dry matter content of 18.58% w/w). But, minimum inhibitory orange peel oil concentrations for ethanol production by yeasts at 37 °C is 0.05% (Wilkins, 2009). In any case, pilot scale and commercial scale testing of methods that could be used to reduce orange peel oil are needed prior to commercialization of ethanol production from citrus peel waste (Wilkins, 2009).

By other hand, it is necessary to be in mind that pretreatment of lignocellulosic biomass aims at rendering cellulose accessible to the action of hydrolytic enzymes by altering the lignocellulosic cell wall, but it also could produce cellulose decrystallization, partial cellulose depolymerization, hemicellulose and/or lignin solubilization, and the modification of the lignin structure, because of performance of pretreatment technology is dependent on the biomass used (Margeot et al., 2009). These processes can be studied by thermal analysis, as the thermal degradability is affected by the chemical composition of the material because different components of lignocellulosic materials have different thermal behaviours (Sun et al., 2005; Aguiar et al., 2008; Chen and Chen, 2009; Wang et al., 2009).

From all above, in this paper the enzymatic hydrolysis of mandarin citrus peel wastes pretreated with steam explosion for bio ethanol production is studied, paying special attention to limonene recovery by means this pretreatment and its influence on composition changes in the mandarin citrus peel, and ethanol yield by posterior fermentation of hydrolysates.

2. Methods

2.1. Mandarin citrus peel wastes and steam explosion process

Mandarin (*Citrus reticulata* L.) citrus peel waste (MCPW), with a dry matter content of $20.86 \pm 0.48\%$ (wet basis), were get directly from citrus juice factories of Murcia Region (South East of Spain), during citrus harvest of 2008/2009, and stored frozen (–20 °C) until use. After thawing the samples were cut to <7 mm size particles, before steam explosion pretreatment, in a cutter machine, and then they were introduced to a pressure reactor (HRS Spiratube, model T Sensation) with capacity of 12 L (at the pilot plant of the Technical University of Cartagena, Spain). This reactor, with body cylindrical and horizontal, is provided with internal transversal heating plates (with indirect steam or oil as thermal fluid) of scraped surface. Scrapers are used to gently stirring the biomass during heating time. This reactor permits the injection of external steam directly in the biomass within the reactor, though the biomass heating and the pressure increase within reactor can be achieved without steam injection and only by means the indirect heating plates.

In the steam explosion pilot plant, after reaction time (thermo hydrolysis) all the steam (to 6 bar abs) can be vented to a vacuum

vessel (to 100 mbar), with a capacity of 5 L, or to other 20 L atmosphere vessel (with tangential entry) to quickly reduce the pressure in the reactor, thus causing the water vapour in the biomass to rapidly decompress, and obtaining a disruption of cell walls. This steam explosion tests were made in dry (without adding water to the fresh biomass, with a dry matter concentration of approximately 20%) and wet conditions (with a water: biomass ratio of 1:2 w/w, normally 1250 g of water and 2500 g of fresh biomass, equivalent to a dry matter concentration of approximately 14%). The steam exploded MCPW in dry conditions had a residual content of α -limonene greater than 0.09% (v/v), while in wet conditions this residual content was lower than 0.05% (v/v). Also these steam explosion tests were made venting from a pressure of 4–6 bar (abs) to a vacuum (to 100 mbar) vessel and to an atmosphere vessel connected to a condenser (using cold water at 2 °C), and no significant differences were found concerning to the residual content of α -limonene in steam exploded MCPW, achieving a α -limonene recovery around 90%. These results are according to Rezzoug and Louka (2009) which studied the thermomechanical process intensification for oil extraction from orange peels, which involves subjecting orange peel for a short time to steam pressure, followed by an instantaneous decompression to a vacuum at 50 mbar, and the optimum reaction conditions selected were steam processing pressure of 6.6 bar and processing time of 3.68 min, obtaining a experimental recovery yield of orange peel oil close to 99%.

So, all results from steam exploded MCPW shown in this paper was obtained in wet conditions (after this pretreatment the biomass is better handled than in dry conditions), with reaction time of 5 min using steam at 160 °C, and venting from 6 bar (abs) to an atmosphere vessel connected to a condenser. This pretreated biomass (with a final dry matter content of 14.70%, wet basis) and the condensed obtained, were collected separately and carried to laboratory where limonene concentration, dry matter content, and sugars content were determinate. These samples were stored in refrigeration (2 °C) until hydrolysis and fermentation was done.

2.2. Laboratory bioreactors

Two 5 L autoclavable bioreactors provided with a control system Bio Controller ADI 1030 (Applikon, Schiedam, The Netherlands) were used to simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of pretreated MCPW. Both of them have control of temperature, pH and stirring intensity; and have a small opening with GyroVent PTT 0.2 μ m filter permitting the release of CO₂ from fermentation.

2.3. Enzymatic hydrolysis and fermentation

2.3.1. Enzymes

Three commercial enzymes, pectinase (Pectinex Ultra SP), cellulase (Celluclast 1.5 L) and β glucosidase (Novozym 188), were

provided by Novozymes A/S (Bagsvaerd, Denmark). Pectinase and cellulase activities was determined according to Wilkins et al. (2007b). The activities of pectinase and cellulase were measured as 238 international units (IU)/mg protein, and 0.124 filter paper units (FPU)/mg protein, respectively. The activity of β glucosidase was reported as 2.6 IU/mg solid by the supplier.

The hydrolysis and fermentation of the pretreated MCPW were done at two scales: in 250 mL glass bottles and in 5 L bioreactor.

2.3.2. Hydrolysis and fermentation in 250 mL glass bottles

MCPW samples were taken directly from the juice industry and, without making steam explosion pretreatment, were placed in 250 mL glass bottles. In order to see the effect of α limonene concentration during fermentation different dilutions were done, MCPW:water in 1:8, 1:4, 1:2, and 1:1 w/w ratios. Hydrolysis and posterior fermentation (HF process) was performed. The reference enzymatic cocktail (REC) added was 5 mg pectinase/g peel dry matter, 2.1 mg β glucosidase/g peel dry matter, and 2 mg cellulase/g peel dry matter. These loadings were used because they yielded the most glucose during the previously hydrolyses carried out on MCPW without steam explosion pretreatment, according to Wilkins et al. (2007b). The hydrolysis was done for 24 h at 45 °C and, after hydrolysis was completed, hydrolysates were placed in an oven at 105 °C for 15 min to inactivate enzymes, and then the alcoholic fermentation was performed at 37 °C (Wilkins et al., 2007b).

The MCPW pretreated with steam explosion was, firstly, HF processed, adding 25 g of pretreated CPW and 100 mL of water (MCPW:water in a 1:4 w/w ratio) in each 250 mL glass bottle (with a dry matter concentration of approximately 3%); the enzymatic hydrolyses (adding reduced doses of pectinase, cellulase and β glucosidase at concentrations shown in Table 2, to study the effect of reduced enzymatic doses and steam explosion pretreatment on ethanol yield, starting from loading 5 including 1.7 mg pectinase –30% of corresponding REC dose, 1.5 mg β glucosidase –70% of corresponding REC dose, and 1.4 mg cellulase –70% of corresponding REC dose, per g of peel dry matter) were carried out for 24 h at 45 °C and, after hydrolysis was completed, hydrolysates were placed in an oven at 105 °C for 15 min to inactivate enzymes, and then the alcoholic fermentation was carried out at 37 °C (Wilkins et al., 2007b); these tests were repeated placing 100 g of pretreated MCPW and 50 mL of water in each 250 mL glass bottle (with a dry matter concentration of approximately 10%); in this case, the enzymatic loads tested are indicated on corresponding figure in results heading. Secondly, SSF process was carried out (according to Wilkins et al., 2007c), using different enzyme concentrations, as it is shown in corresponding table in results heading; in this case, the enzymes were added three hours before fermentation, and the SSF temperature was 37 °C.

2.3.3. Hydrolysis and fermentation in 5 L bioreactors

In all bioreactor experiments the SSF process was followed. 2.5 kg of the pretreated MCPW was diluted with water (MCPW:water in a 2:1 v/v ratio, equivalent to a dry matter concentration of approximately 10%), introduced in the bioreactor with the enzymatic cocktail, and after 3 h the yeast was incorporated. The

enzymes were used in the next proportions (identified as REAC dose): 2.21 mg pectinase/g peel dry matter (approximately 45% of the corresponding REC dose), 1.95 mg β glucosidase/g peel dry matter (approximately 90% of the corresponding REC dose), and 1.82 mg cellulase/g peel dry matter (approximately 90% of the corresponding REC dose). The SSF process was carried out at 37 °C.

2.3.4. Yeasts

The fermentation, in both SSF and HF, was performed with *Saccharomyces cerevisiae* yeast CECT 1329 (from the collection of Technical University of Valencia, Spain). It was activated in 1 mL of sterile water and next several cultures in Sabouraud agar (20 g/L glucose, 5 g/L yeast extract and 20 g/L agar) were done. A *Saccharomyces cerevisiae* inoculum (10 mL for 250 mL glass bottles and 400 mL for 5 L bioreactor) was prepared in Sabouraud broth. It was incubated aerobically, with agitation (50 rpm), for 24 h at 25 °C (optimum temperature) (Wilkins et al., 2007b). At the moment of use, the inoculum concentration was 10⁹ CFU/mL. All glass bottles were placed in a warm water stirred bath at 37 °C for 4 days, with the bottle caps partially open to allow the release of carbon dioxide produced during alcoholic fermentation. To add the 400 mL of inoculum in bioreactor an automatic peristaltic pump was used.

The fraction of viable cells before and during fermentation was estimated by the “colony forming units” method (CFU) (Pourbafrani et al., 2007).

2.4. Galacturonic acid (GA) and sugars analysis

During and after fermentation, 10 mL of fermented must were centrifuged at 4000 rpm and 4 °C for 8 min. Next, the supernatant was filtered with 45 μ m Nylon filter. The sample in this way prepared was used to determine sugars, GA, and ethanol. The sugars (glucose, fructose, galactose, arabinose, sucrose, rhamnose and xylose) were analyzed by ionic chromatography, in a 871 Advanced Bioscan Ionic Chromatograph (IC) provided with pulsed amperometric detector and a column Metrosep Carb 1 150 (6.1013.010) 4.6 \times 250 mm and 5.0 μ m particle size; the flow was 0.9 mL/min, temperature 32 °C and 10 μ L the injection volume. It was used NaOH 80 mM as mobile phase.

Galacturonic acid was analyzed by ionic chromatography, in a 861 Advanced Compact IC provided with a thermostated conductivity detector and a column Metrosep Organic Acids 250/7.8 7.8 \times 250 mm and 5.0 μ m particle size. The flow was 0.4 mL/min and temperature 20 °C. It was used H₂SO₄ 0.33 mmol acetone (90:10) v/v as mobile phase.

2.5. α Limonene analysis

α limonene content of the MCPW before and after pretreatment was determined by the Scott method (Scott and Veldhuis, 1966).

2.6. Ethanol analysis

It was taken 10 mL of centrifuged and filtered fermented broth and analyzed in gas chromatography. Ethanol was quantified in a

Table 2
Enzyme loadings (in mg protein/g peel dry matter) considered in the enzymatic hydrolysis of pretreated MCPW, at 250 mL glass bottle scale.

| Enzymes | Loading 1 | Loading 2 | Loading 3 | Loading 4 | Loading 5 |
|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------|
| Pectinex | 1.60 | 1.60 | 1.60 | 1.60 | 1.70 |
| Novozym 188 | 0.15(10%R _N) | 0.45(30%R _N) | 0.75(50%R _N) | 1.05(70%R _N) | 1.50(R _N) |
| Celluclast | 0.15(10%R _C) | 0.40(30%R _C) | 0.70(50%R _C) | 1.00(70%R _C) | 1.40(R _C) |

R_N = reference value of the Novozym 188 loading; R_C = reference value of the Celluclast loading.

gas chromatograph Agilent 6890 with FID detector, and a column DB Wax ETR of 30 m × 0.25 mm; with a flow rate of 1.1 mL/min; and injecting 0.8 μL of sample (Belisario Sánchez et al., 2009).

2.7. Total dry matter content determination

The total dry matter content of ground MCPW, before and after steam explosion, and of CPP obtained after fermentation, was determined by drying at 70 °C for 20 h followed by drying in a vacuum oven at 70 °C for 1 h (Wilkins et al., 2007c).

2.8. Thermogravimetric analysis

The content of pectin, hemicellulose, cellulose, lignin and ash in raw mandarin peels, steam exploded mandarin peels, and in the finally obtained CPP after fermentation have been studied by thermogravimetric analysis (TGA), which was conducted on a TGA/DSC HT thermogravimetric analyzer (Mettler Toledo GmbH, Schwerzenbach, Switzerland) with a flowing atmosphere of 50 mL/min. All of the TG measurements were blank curve corrected, and alumina pans of 70 μL capacity, without lid, were used. These studies were carried out with a program temperature that consisted of two steps: first dynamic step ranged from 30 to 900 °C at a heating rate of 10 °C/min in nitrogen, and second isothermal step lasted 10 min at 900 °C in oxygen. This last step was performed in order to evaluate char and ash content. Approximately 10 mg of sample mass was used in every experiment. Derivative thermogravimetric (DTG) curves were analyzed by derivative weight loss (Chen and Chen, 2009).

2.9. Statistical analysis

Data were analyzed using the STATGRAPHICS Plus statistical package. Analysis of variance was conducted on the analytical variables to determine the main effects of the steam explosion process and enzyme doses added. Duncan's multiple range tests was used to separate the means ($p < 0.05$) of the analytical data.

3. Results and discussion

3.1. Influence of the steam explosion pretreatment on citrus peel composition

The main objective of this study on steam explosion pretreatment of the MCPW biomass were to analyse the disruption of cell walls, and the enzymes accessibility to the polysaccharides, measured by the sugars and ethanol yields during SSF of the biomass. But, also it is very interesting to analyse the influence of this pretreatment on the α -limonene removal from this MCPW biomass, as this compound is an inhibitor of the SSF process, and it is an interesting co product that must be recovered (Wilkins et al., 2007c; Wilkins, 2009).

Analysing scanning electron microscopy images (not shown in this paper) it is possible to observe the microstructure differences between the raw mandarin citrus peel without steam explosion pretreatment and the steam exploded mandarin citrus peel (from ground and steam exploded MCPW). The oil glandules are totally exploded favouring the releasing of α -limonene that is carried by the steam to the condenser for recovering. The steam explosion pretreatment causes partially separate fibres, but probably it is also

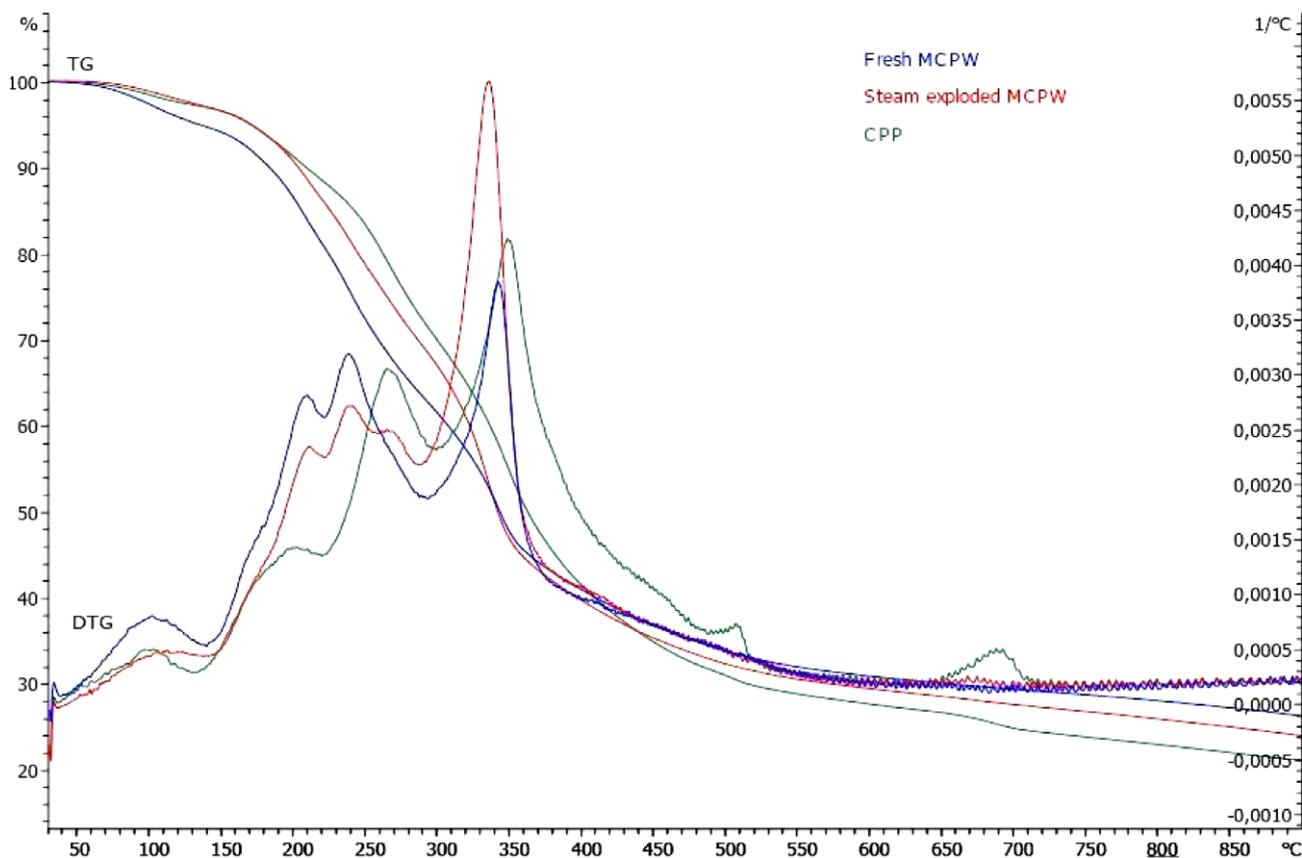


Fig. 1. TG–DTG curves for the raw and steam exploded MCPW, and the final CPP obtained after fermentation.

produced a hemicellulose removal and lignine re localisation, which are important factors in increasing the enzymatic digestibility of MCPW biomass. But, it is necessary to assess from economic point of view the interest of this steam explosion pretreatment, as it influences on hydrolytic enzymes requirements because this is one of the main cost items in the bioethanol production from MCPW (Wilkins et al., 2007c).

The pyrolysis characteristics are described via TG DTG curves for the raw and steam exploded MCPW, and the final CPP obtained after fermentation, shown in Fig. 1. As described by Chen and Chen (2009), weight loss happens under a wide range of temperature with large mass loss at 150–400 °C, and in the DTG curve, there are four maximal weight loss peaks. The temperature for the maximal weight loss (T_{max}) at 95 °C is attributed to the free water loss (~5.0 wt%). The decomposition peaks at the T_{max} of 196 °C (13 wt%), 231 °C (18 wt%) and 335 °C (20 wt%) are assigned to pectin, hemicellulose and cellulose in raw MCPW without pretreatment, respectively (Chen and Chen, 2009), which are lower than those of pure pectin (210–270 °C, Einhorn Stoll and Kunzek, 2009), hemicellulose (268 °C) and cellulose (355 °C) (Yang et al., 2007).

According to Aguiar et al. (2008), decomposition of cellulose is complete under around 360 °C, hemicellulose decomposes between 200 and 260 °C, most of the decomposition happens under 180 °C, lignin between 280 and 500 °C, and decomposition of citrus pectin is also complete under 400 °C.

From the typical TG/DTG curves (see Fig. 1) obtained from steam exploded MCPW it can be observed that decomposition of two hemicellulosic polymer fractions takes place at 228 and 245 °C, respectively. According to Sun et al. (2005) this phenomenon implied that the hemicellulosic fraction degraded (approximately the 50 wt% of total hemicellulosic fraction) during the steam pretreatment, had a higher thermal stability than that undegraded fraction. The reason for this higher thermal stability of the

hemicellulosic polymers degraded was probably due to the generation of condensation substances between the hemicellulose degradation products, leading to a more recalcitrant residue that requires higher temperature ranges for complete decomposition (Sun et al., 2005). As obtained by Zhang et al. (2008), under the studied steam explosion conditions, degradation of cellulose and lignin does not appear significant if comparing TG/DTG curves between raw MCPW and steam exploded MCPW, but keeping the cellulose is ideal in this case. From the TG/DTG curves can be also obtained the approximate composition of CPP: moisture (3 wt%), pectin (9 wt%), hemicellulose (16 wt%), cellulose (27 wt%), lignin (13 wt%), and ash (4 wt%).

3.2. Influence of steam explosion pretreatment on the sugars yield obtained by enzymatic hydrolysis

The hydrolysis of raw MCPW samples, without steam explosion pretreatment, with different water dilutions and the reference enzymatic cocktail (REC), produces the sugar yields shown in Table 3. The different water dilution of MCPW origins no significant differences in sugars content obtained by enzymatic hydrolysis. The content of fermentable sugars after hydrolysis for 24 h is between 22.64 ± 4.04 and 28.48 ± 3.21 g sugars/100 g peel dry matter, and total sugars content is between 39.43 ± 5.79 and 46.01 ± 0.82 g sugars/100 g peel dry matter.

In Table 4 it is shown the sugars yields after 24 h of enzymatic hydrolysis of steam exploded MCPW (at water dilution of 1:4 w/v, 25 g of pretreated MCPW in 100 mL water), using the enzymatic cocktail loading 1, 2, 3 and 4 from Table 2. In this case the fermentable sugars yields were between 28.34 ± 2.23 and 32.38 ± 0.91 g/100 g peel dry matter, and for total sugars between 46.65 ± 2.69 and 49.22 ± 1.35 g sugars/100 g peel dry matter. These values are higher to these ones obtained by enzymatic hydrolysis of MCPW without pretreatment with steam explosion but with the

Table 3
Sugars obtained after 24 h of enzymatic hydrolysis of fresh MCPW without steam explosion pretreatment, and using HF processing and different water dilutions, at 250 mL glass bottle scale.

| Water dilution (MCPW:water, w/v) | Gal ^c | Rham ^c | Ara ^c | Gluc ^c | Gal ^c | Xyl ^c | Fruc ^c | Sucr ^c | Fs ^c | TS ^c | D-limonene (% v/v) |
|----------------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------|
| 1:8 | 11.45(0.48) ^a | 0.24(0.17) ^a | 2.63(0.01) ^a | 12.36(0.34) ^a | 2.84(0.07) ^a | 0.68(0.03) ^a | 12.13(4.18) ^a | 0.27(0.18) ^a | 24.77(2.87) ^a | 42.28(3.46) ^a | 0.0361 |
| 1:4 | 10.86(1.33) ^a | 0.20(0.01) ^a | 2.59(0.48) ^a | 13.38(0.48) ^a | 2.25(0.40) ^a | 0.63(0.12) ^a | 14.94(3.47) ^a | 0.15(0.01) ^a | 28.48(3.21) ^a | 45.04(3.22) ^a | 0.065 |
| 1:2 | 12.45(1.10) ^a | 0.21(0.07) ^a | 2.19(0.50) ^a | 11.13(0.33) ^a | 1.50(0.10) ^a | 0.42(0.02) ^a | 11.23(1.81) ^a | 0.27(0.23) ^a | 22.64(4.04) ^a | 39.43(5.79) ^a | 0.108 |
| 1:1 | 12.87(0.01) ^a | 0.28(0.04) ^a | 2.88(0.04) ^a | 13.41(0.43) ^a | 1.74(0.00) ^a | 0.54(0.00) ^a | 14.06(0.42) ^a | 0.21(0.00) ^a | 27.69(0.85) ^a | 46.01(0.82) ^a | 0.163 |

The enzymatic cocktail used was the REC dose (for each enzyme: in mg protein/g peel dry matter): pectinase, 5 mg, β -glucosidase, 2 mg, and cellulase, 2.1 mg.

^aMeans reported with standard deviation in parentheses.

^bMeans separated by ANOVA, least significant difference ($p < 0.05$).

^cSugars obtained after hydrolysis: GA – galacturonic acid, Rham – rhamnose, Ara – arabinose, Gluc – glucose, Gal – galactose, Xyl – xylose, Fruc – fructose, Sucr – sucrose, FS – fermentable sugars, TS – total sugars, in g/100 g peel dry matter.

Table 4
Sugars yields after 24 h of enzymatic hydrolysis of steam exploded MCPW (with MCPW: water in a 1:4 v/v ratio), and using HF processing and different enzymatic loading (from Table 2), at 250 mL glass bottle scale.

| Enzymatic loading | Gal ^b | Rham ^b | ARA ^b | Gluc ^b | Gal ^b | Xyl ^b | Fruc ^b | Sucr ^b | Fs ^c | TS ^d | L Ethanol/1000 kg fresh MCPW |
|-------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------------|
| Loading 1 | 9.48(0.89) ^a | 0.44(0.07) ^a | 4.30(0.46) ^a | 12.73(1.30) ^a | 3.40(0.35) ^a | 0.70(0.07) ^a | 12.85(1.3) ^a | 2.75(0.36) ^a | 28.34(2.23) ^a | 46.65(2.69) ^a | 46.1(4.40) ^a |
| Loading 2 | 11.68(0.27) ^a | 0.2(0.05) ^a | 2.49(0.08) ^a | 14.8(0.05) ^a | 2.49(0.04) ^a | 0.52(0.02) ^a | 16.96(0.06) ^a | 0.35(0.03) ^a | 32.17(0.10) ^a | 49.56(0.44) ^a | 41.13(0.50) ^a |
| Loading 3 | 11.42(0.18) ^a | 0.2(0.05) ^a | 2.15(0.12) ^a | 14.98(0.79) ^a | 2.56(0.07) ^a | 0.49(0.03) ^a | 16.18(0.18) ^a | 1.2(0.06) ^a | 32.38(0.91) ^a | 49.22(1.35) ^a | 35.52(2.64) ^a |
| Loading 4 | 9.97(0.94) ^a | 0.16(0.03) ^a | 2.18(0.72) ^a | 15.34(2.23) ^a | 2.64(0.43) ^a | 0.547(0.12) ^a | 10.62(5.15) ^a | 2.69(0.82) ^a | 30.13(0.02) ^a | 44.16(1.00) ^a | 32.25(1.98) ^a |

^aMeans reported with standard deviation in parentheses.

^bSugars obtained after hydrolysis; GA—galacturonic acid, Rham—rhamnose, Ara—arabinose, Gluc—glucose, Gal—galactose, Xyl—xylose, Fruc—fructose, Sucr—sucrose.

^cFS – fermentable sugars.

^dTS-total sugars, in g /100 g peel dry matter.

maximum enzymes loading (the REC, see Table 3). In addition, these sugar yields are similar to those reported by Wilkins et al. (2007b) for grapefruit peel not submitted to pretreatment and hydrolyzed with the higher enzymatic cocktail (the REC). In this case, the fermentable sugars content was 38.55 g/100 g peel dry matter (15.09 ± 1.45 g fructose, 22.14 ± 0.41 g glucose and 1.32 ± 0.28 g sucrose per 100 g peel dry matter).

In this Table 4 it is also observed that different loading of cellulase and β glucosidase leads to not significant differences in sugars yields.

The sugar yields after 3 h of enzymatic hydrolysis (in a SSF process and using the REAC dose) of steam explosion pretreated MCPW in 5 L bioreactor scale with water dilution of the dry matter of this biomass (with MCPW: water in a 2:1 v/v ratio), were 46.88 g of fermentable sugars and 61.7 g of total sugars/100 g peel dry matter. As indicated above, it is confirmed that these sugar yields are similar to those reported by Wilkins et al. (2007b) and Talebnia et al. (2008) for citrus peel wastes not submitted to pretreatment and hydrolyzed with the higher enzymatic cocktail (the REC dose).

3.3. Influence of steam explosion pretreatment on ethanol and co products yields

The MCPW samples, before steam explosion pretreatment, had an initial content of α limonene of 0.3–0.4 (% v/v), and after this pretreatment the content was 0.02–0.05 (% v/v). In HF and SSF processing of steam exploded MCPW the α limonene content was always lower than the inhibitory minimum concentration (0.05% v/v) that can affect to fermentation kinetics and development (Wilkins, 2009). In fact, the yeast accounting during steam exploded MCPW fermentation was always greater than 10^7 CFU/mL, with kinetics similar to this one obtained by Pourbafrani et al. (2007) for a 0.054% (v/v) α limonene content. So, none inhibition effects were observed (due to furfural, HMF or α limonene) (Talebnia et al., 2008; Wilkins, 2009) for steam exploded MCPW fermentation.

The ethanol results shown in Table 4 were obtained using HF processing at 250 mL glass bottle scale, and 24 h enzymatic hydrolysis. From these results it can be deduced that ethanol production is not influenced by the enzymatic loading during steam exploded MCPW saccharification, if the enzymatic loading is equal or lower than loading 4. Using the loading 5 (from Table 2) it is obtained significant differences in ethanol production if comparing to enzymatic loading 1, 2, 3 and 4 (Table 4 and Fig. 2). In this case, 58.55 L ethanol/1000 kg raw MCPW was obtained.

Using the lowest enzyme loading 1 it is obtained an ethanol production of 46.1 ± 4.4 L/1000 kg raw MCPW (Table 4), which is greater than ethanol yield obtained by Wilkins et al. (2007b) on grapefruit citrus peel waste (CPW) (36 L/1000 kg raw CPW), and using a greater enzymes loading. Other interesting result (see Fig. 2) is that when enzymatic loadings 1 and 5 are used the ethanol production is significantly greater and also the CPP production is significantly higher (achieving to 80 kg CPP dry matter/1000 kg raw MCPW, which is much greater if compared to 35 kg CPP dry matter/1000 kg raw MCPW, obtained with the rest of loadings 2, 3 and 4).

The galacturonic acid (GA) is other co product, which can be used as tensoactive agent, acidic agent and for production of vitamin C and its value could justify the economical cost of its recovery using technologies such as the one studied by Molnár et al. (2009). In Fig. 3 it is possible to see the influence of enzymes loading on GA production (using HF process, and 24 h of enzymatic hydrolysis). The higher is the enzyme loading the higher the GA production. With the lower enzyme loading 1 (Table 2) a GA production of 20 kg/1000 kg of fresh MCPW was obtained.

The different enzymes loading leads to no significant differences in ethanol production with HF processing of steam exploded MCPW (Fig. 4). The maximum ethanol levels are similar for the three loading tested: 50.9 ± 3.38 L/1000 kg raw MCPW with the higher enzymes concentration, and 46.67 ± 0.72 L/1000 kg raw MCPW with 70% reduction in enzymes loading (loading 1) (Fig. 4).

When SSF process was carried out ethanol production was 59.26 ± 3.56 L/1000 kg raw MCPW without reduction in enzymes

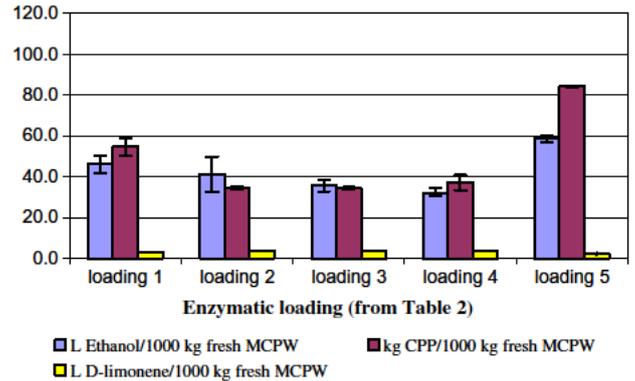


Fig. 2. Ethanol and co-products obtained from HF processing of MCPW (with MCPW: water in a 1:4 v/v ratio) using different concentrations of enzymes Pectinex, Celluclast and Novozyme. CPP: citrus pulp pellets.

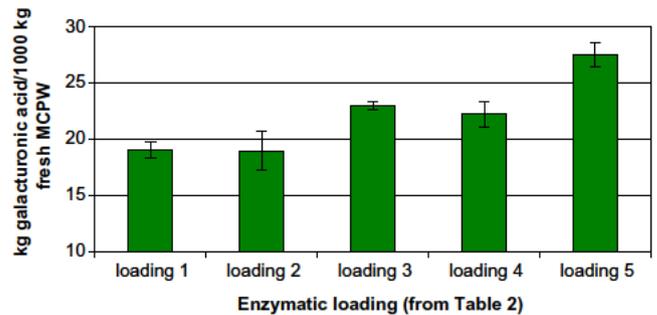


Fig. 3. Galacturonic acid production (kg/1000 kg fresh MCPW) after enzymatic hydrolysis with different enzymes loading for steam exploded MCPW (with MCPW: water in a 1:4 v/v ratio).

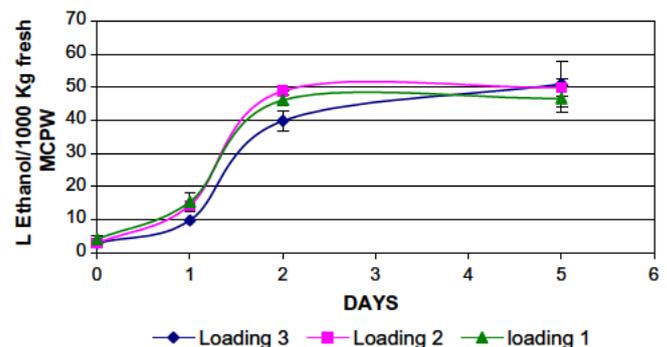


Fig. 4. Ethanol production curves (in L/1000 kg fresh MCPW) obtained from HF processing of steam exploded MCPW (with MCPW: water in a 2:1 v/v ratio) using different enzymatic loadings, and the 250 mL glass bottle scale. Note: The dose of enzymes (in mg protein/g peel dry matter) for each loading is the following (in the order Pectinex/Novozym 188/Celluclast) = Loading 1 (0.51/0.45/0.42), Loading 2 (1.19/1.05/0.98), and Loading 3 (1.7/1.5/1.4). The Loading 2 is the 70% of Loading 3 (for the three enzymes), and Loading 1 is the 30% of Loading 3 (for the three enzymes).

loading (loading 5 from Table 2) and 54.63 ± 4.15 L/1000 kg raw MCPW with 90% reduction in β glucosidase and cellulase enzymes loading (loading 1 from Table 5).

These values are higher than ethanol yield obtained by HF process with the same enzymes loading (46.1 ± 4.40 L/1000 kg raw MCPW). In this case, CPP production was 35.33 kg/1000 kg raw MCPW so SSF process allows greater production of ethanol but at the expense of the CPP yield.

The CPP from MCPW and CPW, as the soybean hulls, contain significant levels of carbohydrate that could be hydrolyzed and converted into ethanol. However, the carbohydrate types and distribution are somewhat unique, as the soybean hulls, compared to carbohydrates from other non food plant sources, called lignocellulosic biomass, as shown in Table 1. Unlike other plant materials, MCPW and CPW, as soybean hulls, typically have approximately 10% protein, with significant amounts of pectin and low amounts of lignin (Bampidis and Robinson, 2006). As in the case of soybean hulls, the cellulose fiber in MCPW could be removed by hydrolysis (including the steam explosion pretreatment, and light enzymatic pretreatment) and fermentation to ethanol, yielding a CPP with higher protein and lower fiber content potentially available for the whole animal feed market (Mielenz et al., 2009).

The steam explosion pretreatment tested in this work has shown a good efficiency, as it has allowed a greater production of ethanol and other co products (CPP, α limonene and GA) than obtained with other pretreatments tested by other authors (Wilkins et al., 2007b,c), and using a lower loadings for cellulase and β glucosidase enzymes.

3.4. Experiments at bioreactor scale. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF)

The MCPW samples from Murcia Region (Spain) juices factories presented a dry matter content of $20.86 \pm 0.48\%$ (wet basis), and their α limonene content after steam explosion pretreatment was 0.02 – 0.05% (v/v).

The Fig. 5 shows the ethanol results obtained at 5 L bioreactor and 250 mL glass bottle scales, from SSF processing (at 37°C) of steam exploded MCPW, with a water dilution (MCPW: water in a 2:1 v/v ratio). It is observed that the maximum ethanol produced is around 60 L/1000 kg fresh MCPW in the case of bioreactors, but at 250 mL glass bottle scale the maximum production is of 50 L/1000 kg fresh MCPW, after 5 days of SSF processing. In these conditions of SSF processing, the CPP production was of 25 – 28 kg CPP dry matter/1000 kg fresh MCPW at bioreactor scale, and around 40 kg CPP dry matter/1000 kg fresh MCPW at glass bottle scale. It is interesting to compare these results, obtained with the SSF process, with these ones obtained with HF process, because of the amount of CPP finally obtained is reduced to near the half if the SSF process is used. This can be due to the inhibitory effect of the glucose on the enzymatic saccharification in the HF process, and the dissolution of the dry matter can be lower.

Table 5

Ethanol yields in the SSF processing of pretreated MCPW using different enzymatic loadings, at 250 mL glass bottle scale.

| Enzymatic loading | L Ethanol/1000 kg fresh MCPW |
|-------------------|------------------------------|
| Loading 1 | $54.63(4.15)^a$ |
| Loading 2 | $57.59(6.49)^a$ |
| Loading 3 | $59.26(3.56)^a$ |

^aMeans reported with standard deviation in parentheses. The dose of enzymes (in mg protein/g peel dry matter) for each loading is the following (in the order Pectinex/Novozym 188/Celluclast) = Loading 1 (1.6/0.15/0.15), Loading 2 (1.6/0.45/0.40), and Loading 3 (1.7/1.5/1.4). The loading 2 is the 30% of Loading 3 (without reduction in Pectinex), and Loading 1 is the 10% of Loading 3 (without reduction in Pectinex).

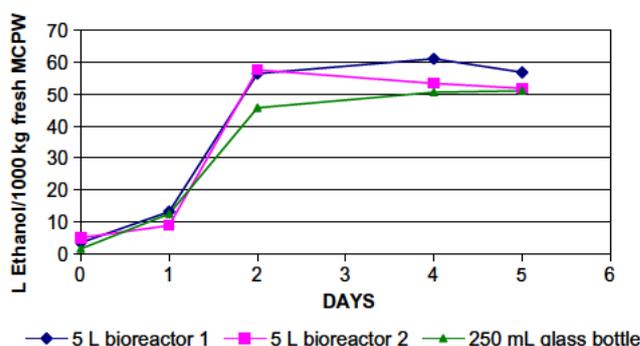


Fig. 5. Ethanol production curves (in L/1000 kg fresh MCPW) obtained in 5 L bioreactor and 250 mL glass bottle scale, using steam exploded MCPW and SSF processing (with MCPW: water in a 2:1 v/v ratio). The enzymatic cocktail used was (for each enzyme: in mg protein/g peel dry matter): 2.21 mg pectinase, 1.95 mg β -glucosidase, and 1.82 mg cellulase.

3.5. Influence of α limonene content on sugars and ethanol production

The α limonene is an essential oil with antimicrobial activity, and causes inhibition of the fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. It seems that this essential oil causes the disruption of the yeast cell wall and alteration of the transfer chain of H^+ and K^+ in the glycolysis (Viuda Martos et al., 2008; Chutia et al., 2009; Pourbafrani et al., 2007; Wilkins, 2009).

The Fig. 6 shows the ethanol production as a function on α limonene concentration in MCPW broth before fermentation. Inhibition of ethanol production was observed at concentrations greater than or equal to 0.1% (v/w), which is similar to values reported previously for orange CPW (Grohmann et al., 1995a). Other previous studies have observed inhibition of microbial growth at concentrations between 0.05 and 0.15% (v/w) (Grohmann et al., 1994; Wilkins et al., 2007c; Wilkins 2009). If α limonene concentration is greater than 0.16% (v/w) the fermentation is totally inhibited and there is not ethanol production. For lower concentrations it is observed an optimum concentration of 0.065% (v/w) for which the greatest ethanol production is obtained. This result is according to Wilkins et al. (2007c) which reported a maximum level of ethanol yield when α limonene concentrations was 0.08% (v/w), in CPW with SSF processing.

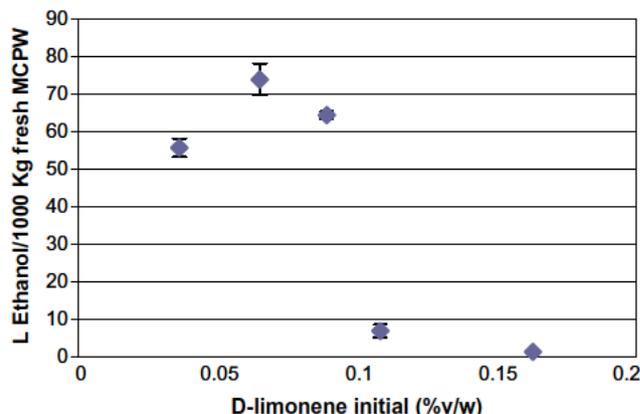


Fig. 6. Ethanol production (in L/1000 kg fresh MCPW) in HF processing of non steam exploded MCPW with different α -limonene concentrations in the fermentation broth.

4. Conclusions

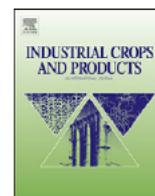
The steam explosion pretreatment produces the rupture of the cell walls of fresh MCPW facilitating the access of enzymes to poly saccharides and the removal of α limonene. This essential oils removal allows no inhibition of the subsequent fermentation of pretreated MCPW and its recovery as co product. If comparing HF processing of steam exploded MCPW and non pretreated MCPW it is obtained that sugars yield was higher in steam exploded MCPW, even if higher enzyme loading was used in non pretreated MCPW. When SSF processing of steam exploded MCPW was carried out (even with low enzymatic loading), ethanol production was 50–60 L/1000 kg raw MCPW. Therefore, steam explosion pretreatment could be an alternative to reduce the enzymatic loading necessary in SSF processing of MCPW for ethanol production. By other hand, in this work it has also been possible to extrapolate the tests performed at laboratory scale to a more large scale (bioreactor scale) to obtain ethanol yields of 60 L/1000 kg raw MCPW using the steam explosion pretreatment.

Acknowledgements

The authors want to show their gratitude to the company HRS Spiratube, SL, and the General Directorate of Research of the Murcia Region Government (Spain), which have financed this work through the research project SUE TA 07/02 0012. This research work has been carried out using scientific equipment of the Institute of Plant Biotechnology and the Agro food Experimental Station of the Technical University of Cartagena (Spain).

References

- Aguilar, L., Márquez-Montesinos, F., Gonzalo, A., Sánchez, J.L., Arauzo, J., 2008. Influence of temperature and particle size on the fixed bed pyrolysis of orange peel residues. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 83, 124–130.
- Bampidis, V.A., Robinson, P.H., 2006. Citrus by-products as ruminant feeds: a review. *Animal Feed Sci. Technol.* 128, 175–217.
- Belisario-Sánchez, Y.Y., Taboada-Rodríguez, A., Marín-Iniesta, F., López-Gómez, A., 2009. Dealcoholized wines by spinning cone column distillation: phenolic compounds and antioxidant activity measured by the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl method. *J. Agric. Food Chem.* 57 (15), 6770–6778.
- Beltrán, F., Pérez-López, A.J., López-Nicolás, J.M., Carbonell-Barrachina, A.A., 2008. Effects of mandarin cultivar on quality of mandarin juice. *Food Sci. Technol.* 14 (4), 307–313.
- Caparra, P., Foti, F., Scerra, M., Sinatra, M.C., Scerra, V., 2007. Solar-dried citrus pulp as an alternative energy source in lamb diets: effects on growth and carcass and meat quality. *Small Rumin. Res.* 68, 303–311.
- Chen, B., Chen, Z., 2009. Sorption of naphthalene and 1-naphthol by biochars of orange peels with different pyrolytic temperatures. *Chemosphere* 76, 127–133.
- Cho, C.W., Lee, D.Y., Kim, C.W., 2003. Concentration and purification of soluble pectin from mandarin peels using crossflow microfiltration system. *Carbohydr. Polym.* 54, 21–26.
- Chutia, M., Deka Bhuyan, P., Pathak, M.G., Sarma, T.C., Boruah, P., 2009. Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *LWT – Food Sci. Technol.* 42, 777–780.
- Einhorn-Stoll, U., Kunzek, H., 2009. Thermoanalytical characterisation of processing-dependent structural changes and state transitions of citrus pectin. *Food Hydrocolloids* 23 (1), 40–52.
- Grohmann, K., Baldwin, E.A., Buslig, B.S., 1994. Production of ethanol from enzymatically hydrolyzed orange peel by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 45–46, 315–327.
- Grohmann, K., Cameron, R.G., Buslig, B.S., 1995a. Fermentation of sugars in orange peel hydrolysates to ethanol by recombinant *Escherichia coli* K011. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 51, 423–435.
- Grohmann, K., Cameron, R.G., Buslig, B.S., 1995b. Fractionation and pretreatment of orange peel by dilute acid hydrolysis. *Bioresour. Technol.* 54, 129–141.
- Kurita, O., Fujiwara, T., Yamazaki, E., 2008. Characterization of the pectin extracted from citrus peel in the presence of citric acid. *Carbohydr. Polym.* 74, 725–730.
- López-Gómez, A., Ros-Chumillas, M., Belisario-Sánchez, Y.Y., 2009. Packaging and the shelf life of orange juice. In: Robertson, G.L. (Ed.), *Food Packaging and Shelf Life. A Practical Guide*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 179–198.
- Mamma, D., Kourtoglou, E., Christakopoulos, P., 2008. Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. *Bioresour. Technol.* 99, 2373–2383.
- Margeot, A., Hahn-Hagerdal, B., Edlund, M., Slade, R., Monot, F., 2009. New improvements for lignocellulosic ethanol. *Curr. Opin. Biotech.* 20, 372–380.
- Marin, F.R., Soler-Rivas, C., Benavente-García, O., Castillo, J., Pérez-Alvarez, J.A., 2007. By-products from different citrus processes as a source of customized functional fibres. *Food Chem.* 100, 736–741.
- Mielenz, J.R., Bardsley, J.S., Wymana, C.E., 2009. Fermentation of soybean hulls to ethanol while preserving protein value. *Bioresour. Technol.* 100, 3532–3539.
- Molnár, E., Eszterle, M., Kiss, K., Nemestóthy, N., Fekete, J., Bélafi-Bakó, K., 2009. Utilization of electro dialysis for galacturonic acid recovery. *Desalination* 241, 81–85.
- Pourbafrani, M., Talebnia, F., Niklasson, C., Taherzadeh, M.J., 2007. Protective effect of encapsulation in fermentation of limonene-contained media and orange peel hydrolyzate. *Int. J. Mol. Sci.* 8, 777–787.
- Rezzoug, S.A., Louka, N., 2009. Thermomechanical process intensification for oil extraction from orange peels. *Innovat. Food Sci. Emerg. Technol.* 10, 530–536.
- Scott, W.C., Veldhuis, M.K., 1966. Rapid estimation of recoverable oil in citrus juices by bromate titration. *J. AOAC Int.* 49, 628–633.
- Sun, X.F., Xu, F., Sun, R.C., Geng, Z.C., Fowler, P., Baird, M.S., 2005. Characteristics of degraded hemicellulosic polymers obtained from steam exploded wheat straw. *Carbohydr. Polym.* 60 (1), 15–26.
- Talebnia, F., Pourbafrani, M., Lundin, M., Taherzadeh, M.J., 2008. Optimization study of citrus wastes saccharification by dilute-acid hydrolysis. *Bioresources* 3 (1), 108–122.
- USDA, 2008. World markets and trade: orange Juice. United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service, Office of Global Analysis, April 2008.
- Ververis, C., Georghiou, K., Danielidis, D., Hatzinikolaou, D.G., Santas, P., Santas, R., Corleti, V., 2007. Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements. *Bioresour. Technol.* 98, 296–301.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J., Perez-Alvarez, J., 2008. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control* 19, 1130–1138.
- Wang, K., Jiang, J.X., Xua, F., Sun, R.C., 2009. Influence of steaming pressure on steam explosion pretreatment of *Lespedeza* stalks (*Lespedeza crytobotrya*): Part 1. Characteristics of degraded cellulose. *Polym. Degrad. Stab.* 94, 1379–1388.
- Wilkins, M.R., Widmer, W.W., Cameron, R.G., Grohmann, K., 2005. Effect of seasonal variation on enzymatic hydrolysis of Valencia orange peel. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 118, 419–422.
- Wilkins, M.R., Suryawati, L., Chrz, D., Maness, N.O., 2007a. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* in the presence of orange peel oil. *World J. Microb. Biotech.* 23, 1161–1168.
- Wilkins, M.R., Widmer, W.W., Grohmann, K., Cameron, R.G., 2007b. Hydrolysis of grapefruit peel waste with cellulase and pectinase enzymes. *Bioresour. Technol.* 98, 1596–1601.
- Wilkins, M.R., Widmer, W.W., Grohmann, K., 2007c. Simultaneous saccharification and fermentation of citrus peel waste by *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol. *Process Biochem.* 42, 1614–1619.
- Wilkins, M.R., 2009. Effect of orange peel oil on ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Biomass Bioenergy* 33, 538–541.
- Yang, H., Yan, R., Chen, H., Lee, D.H., Zheng, C., 2007. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel* 86, 1781–1788.
- Zhang, L.H., Li, D., Wang, L.J., Wang, T.P., Zhang, L., Chena, X.D., Mao, Z.H., 2008. Effect of steam explosion on biodegradation of lignin in wheat straw. *Bioresour. Technol.* 99 (17), 8512–8515.



Production of bioethanol by fermentation of lemon (*Citrus limon* L.) peel wastes pretreated with steam explosion

María Boluda-Aguilar, Antonio López-Gómez*

Food Engineering and Agricultural Equipment Department, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48 E-30203 Cartagena, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 January 2012

Received in revised form 3 April 2012

Accepted 14 April 2012

Keywords:

Lemon peel wastes

Steam explosion

Bioethanol

Galacturonic acid

Essential oils

ABSTRACT

The application of steam explosion and enzymatic hydrolysis pretreatments on lemon (*Citrus limon* L.) citrus peel wastes was studied to obtain bioethanol, galacturonic acid and other co-products, such as D-limonene and citrus pulp pellets. Steam explosion pretreatment and recovery of lemon citrus essential oils was carried out at pilot plant scale. The effect of steam explosion on lignocellulosic composition of lemon peel wastes was studied by thermogravimetric analysis. The antimicrobial activity of lemon essential oil on *Saccharomyces cerevisiae* and its influence on ethanol production during fermentation were also studied. The steam-exploded lemon peel wastes were processed by sequential and simultaneous hydrolysis and fermentation. Concentrations of sugars, galacturonic acid and ethanol were analyzed to measure the efficiency of these processes. Significant antimicrobial activity of lemon essential oils has been observed on *S. cerevisiae* at concentrations above 0.025%. The steam explosion pretreatment has shown an interesting effect on lemon peel wastes processing for obtaining ethanol and galacturonic acid. This pretreatment reduces the residual content of essential oils below 0.025% and significantly decreases the hydrolytic enzyme requirements. Ethanol production in excess of 60 L/1000 kg fresh lemon peel biomass can be obtained.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Citrus is one of the most abundant crops in the world, with annual production of approximately 102 million metric tonnes in 2007 (González-Molina et al., 2010; Pérez-Pérez et al., 2005). Lemon (*C. limon* L.) is the third most important cultivated citrus species after orange and mandarin, with a world production of 4,200,000 metric tonnes. The countries with the most important lemon productions for processing are Argentina (1,000,000 tonnes), Italy (304,000 tonnes), Spain (300,000 tonnes), USA (230,000 tonnes), and Mexico (296,000 tonnes). The world total amounted to over 2,130,000 tonnes of processed lemon in 2007, of which 57% (approximately 1,200,000 tonnes) corresponds to peel wastes (González-Molina et al., 2010).

Lemon citrus peel wastes, like other citrus peel wastes (CPW), may be used for cattle feed either fresh or after ensilage or dehydration (Talebna et al., 2008). However, a large amount of lemon CPW

is lost since a cost efficient process for its treatment is not available (Boluda-Aguilar et al., 2010).

Lemon CPW is a pectin-rich agro waste and can be utilized for the manufacture of galacturonic acid (Molnár et al., 2009, 2010). It is also a potential feedstock for production of bioethanol due to its high carbohydrate content, which is similar to that of other studied feedstocks (see Table 1) (Marín et al., 2007; Mielenz et al., 2009; Boluda-Aguilar et al., 2010). However, despite the large volume of lemon CPW, no published research work has studied the possibility of its use in ethanol and galacturonic acid production. Nevertheless, there are studies about other uses: as fermentation substrate for production of multienzyme preparation (Mamma et al., 2008); for pectin extraction (Masmoudi et al., 2010); or as a source of many natural compounds such as single-cell protein, citric acid, vitamins, flavonoids, carotenoids, minerals, dietary fibre, and citrus essential oils (CEOs) (De Gregorio et al., 2002; Marín et al., 2007; Ferhat et al., 2007; González-Molina et al., 2010).

The use of orange, mandarin and grapefruit CPW to obtain ethanol has been studied by different authors (Grohmann et al., 1994, 1995a,b; Wilkins et al., 2007a,b,c; Talebna et al., 2008; Wilkins, 2009; Boluda-Aguilar et al., 2010). However, pretreatments such as steam explosion prior to enzymatic hydrolysis and fermentation have only been studied for orange and mandarin CPW (Boluda-Aguilar et al., 2010; Wilkins et al., 2007c; Widmer et al., 2010).

Abbreviations: CPW, citrus peel wastes; CEOs, citrus essential oils; REC, reference concentration of enzymatic cocktail; HF, hydrolysis and fermentation; SSF, simultaneous saccharification and fermentation; CPP, citrus pulp pellets; GA, galacturonic acid.

* Corresponding author. Tel.: +34 968 325516; fax: +34 968 325433.

E-mail address: antonio.lopez@upct.es (A. López-Gómez).

Table 1
Chemical composition (% DM) of different lignocellulosic feedstocks.

| | Ash | Sugar | Fat | Protein | Pectin | Lignin | Cellulose | Hemicellulose |
|------------------------------|-----------|-------|------|----------|--------------|------------|--------------|---------------|
| Mandarin peel ^a | 5.0 (3.0) | 10.1 | 1.6 | 7.5 | 16.0 (14.2) | 8.6 (8.9) | 22.5 (20.8) | 6.0 (17.2) |
| Lemon peel ^a | 2.5 (4.1) | 6.5 | 1.50 | 7.0 | 13.0 (9.0) | 7.6 (8.3) | 23.1 (22.8) | 8.1 (22.4) |
| Orange peel ^a | 2.6 (3.8) | 9.6 | 4.0 | 9.1 | 23.0 (12.29) | 7.5 (8.4) | 37.1 (22.0) | 11.0 (19.9) |
| Grapefruit peel ^a | 8.1 (3.3) | 8.1 | 0.5 | 12.5 | 8.5 (16.1) | 11.6 (8.2) | 26.57 (19.8) | 5.60 (18.3) |
| Soybean hulls ^b | 1.0–2.8 | nd | nd | 9.0–14.0 | 6.0–15.0 | 1.0–4.0 | 29.0–51.0 | 10.0–20.0 |
| Corn stover ^b | 4.0–8.0 | nd | nd | 4.0–9.0 | 0 | 16.0–23.0 | 31.0–41.0 | 20.0–34.0 |
| Wheat straw ^b | 1.0–10.0 | nd | nd | 2.0–6.0 | 0 | 5.0–19.0 | 32.0–49.0 | 23.0–39.0 |

nd: no data. Values in brackets as determined in this study (using the TG–DTG technique as described in García-Barneto et al. (2009)).

^a From Marín et al. (2007).

^b From Mielenz et al. (2009).

The inhibiting effect of residual contents of CEOs on fermentation has only been studied for orange and mandarin CPW hydrolysates (Wilkins et al., 2007a,c; Wilkins, 2009; Pourbafrani et al., 2007; Talebnia et al., 2008; Widmer et al., 2010; Boluda-Aguilar et al., 2010). Yet these studies are insufficient, since an important antimicrobial activity of lemon CEOs has been ascribed to their higher concentration of specific molecules such as β -pinene, *p*-cymene, and citral isomers, as compared to other CEOs (Belletti et al., 2004, 2008; Char et al., 2010). In fact, the relation between steam explosion pretreatment and residual content of CEOs in exploded CPW has not been thoroughly studied. Only the works of Rezzoug and Louka (2009), Widmer et al. (2010) and Boluda-Aguilar et al. (2010) have analyzed the thermomechanical process for essential oils extraction from orange and mandarin CPW. Boluda-Aguilar et al. (2010) used steam explosion for pretreatment of mandarin CPW, obtaining a residual content of mandarin CEOs lower than 0.05% (v/w). This is the minimum inhibitory concentration of orange CEOs for ethanol production by yeasts at 37 °C (Wilkins, 2009). Despite this, laboratory and pilot-scale testing of methods which could be used to reduce lemon CEOs are needed, in order to optimize ethanol production from lemon CPW (Boluda-Aguilar et al., 2010; Pourbafrani et al., 2007).

As indicated in Boluda-Aguilar et al. (2010) and Widmer et al. (2010), steam explosion pretreatment of lignocellulosic biomass can produce cellulose decrystallization; partial cellulose depolymerization; hemicellulose and/or lignin solubilization; and the modification of the lignin structure. The performance of pretreatment technology is dependent on the biomass used (Margeot et al., 2009). The effect of these pretreatments can also be studied by thermal analysis because the chemical composition of the lignocellulosic material affects its degradability and thermal behaviour (Boluda-Aguilar et al., 2010; Sun et al., 2005; Aguiar et al., 2008; Chen and Chen, 2009).

For all of the above, the steam explosion and enzymatic hydrolysis pretreatments and fermentation of exploded lemon CPW were studied in this paper to optimize the production of bioethanol, galacturonic acid and other co-products. The inhibiting activity of residual lemon CEOs on *Saccharomyces cerevisiae* was especially studied, as well as the composition changes of lemon CPW during pretreatments and fermentation.

2. Materials and methods

2.1. Pretreatment of lemon CPW by steam explosion

Lemon (*C. limon* L.) CPW with a dry matter content of $20.98 \pm 1.2\%$ (wet basis) was collected directly from citrus juice factories in the Region of Murcia (South-East of Spain), during the citrus harvest of 2008/2009, and stored at -20 °C until use. After thawing, samples were cut into <7 mm size particles, in a cutter, and then introduced into a pressure reactor (HRS Spiratube, model T-Sensation 12 L capacity) for steam explosion pretreatment.

This reactor and similar steam explosion pretreatments carried out on mandarin CPW are described by Boluda-Aguilar et al. (2010). After thermohydrolysis, all the steam (up to 6 bar abs) was vented to quickly reduce the pressure in the reactor, thus causing water vapour in the biomass to rapidly decompress, disrupting cell walls. In accordance with the findings of Boluda-Aguilar et al. (2010), the steam explosion tests were carried out in wet conditions (with a water:biomass ratio of 1:2 w/w, equivalent to a dry matter concentration of approximately 14%), with a reaction time of 5 min using steam at 160 °C, and venting from 6 bar (abs) to an atmosphere vessel connected to a condenser. This pretreated biomass (with a final dry matter content of approximately 15% wet basis) and the condensate obtained, were collected separately and transferred to laboratory for analysis. These samples were stored at 2 °C until hydrolysis and fermentation were carried out.

2.2. Enzymatic hydrolysis and fermentation

The hydrolysis and fermentation of steam-exploded lemon CPW was carried out in two different ways. In the first process (HF process) the hydrolysis was carried out for 24 h at 45 °C with shaking at 150 rpm. Then, hydrolysates were placed in an oven at 105 °C for 15 min to inactivate enzymes (hydrolysis stopped before fermentation start) and then alcoholic fermentation was performed at 37 °C (Wilkins et al., 2007b). In the second case (SSF process) hydrolysis and fermentation took place simultaneously.

Three commercial enzymes, pectinase (Pectinex Ultra SP), cellulase (Celluclast 1.5 L) and β -glucosidase (Novozym 188), were provided by Novozymes A/S (Bagsvaerd, Denmark). Pectinase and cellulase activities were determined (following Wilkins et al., 2007b) as 238 international units (IU)/mg protein, and 0.124 filter paper units (FPU)/mg protein, respectively. The activity of β -glucosidase was reported as 2.6 IU/mg solid by the supplier.

Fermentation, in both the SSF and HF processes, was performed with *S. cerevisiae* yeast CECT 1329 (from the collection of the Technical University of Valencia, Spain). It was activated in 1 mL of sterile water and plated to Sabouraud agar. A *S. cerevisiae* inoculum was prepared in Sabouraud broth incubated aerobically, with agitation (50 rpm), for 24 h at 25 °C (optimum temperature) (Wilkins et al., 2007b). At the moment of use, the inoculum concentration was 10^9 CFU/mL. The fraction of viable cells before and during fermentation was estimated by the “colony forming units” (CFU) method (Pourbafrani et al., 2007).

The hydrolysis and fermentation of the exploded lemon CPW was done at two scales: in 250 mL glass bottles and in a 5 L bioreactor.

2.2.1. Hydrolysis and fermentation in 250 mL glass bottles

Lemon CPW samples were taken directly from the juice industry and, without steam explosion pretreatment, were placed in 250 mL glass bottles. In order to see the effect of lemon CEOs concentration during fermentation, different ratios (lemon CPW:water in 1:8, 1:4,

1:2, and 1:1 w/w) were tested (the initial pH was between 3.0 and 3.5).

The HF process was performed using the REC dose adding 5 mg pectinase/g peel dry matter, 2.1 mg β -glucosidase/g peel dry matter, and 2 mg cellulase/g peel dry matter. These concentrations were used since during previous studies carried out on lemon CPW without steam explosion pretreatment they had yielded the highest level of fermentable sugars (Boluda-Aguilar et al., 2010; Wilkins et al., 2007b).

The lemon CPW pretreated with steam explosion was HF processed by adding 25 g of pretreated lemon CPW and 100 mL of water (1:4 w/w ratio) in 250 mL glass bottles (with a dry matter concentration of approximately 3%). Various concentrations of hydrolysis enzymes were used (Table 2) to study the effect of reduced enzymatic doses and steam explosion pretreatment on ethanol yield. After hydrolysis (24 h at 45 °C) was completed, hydrolysates were placed in an oven at 105 °C for 15 min to inactivate enzymes, and then the alcoholic fermentation was carried out at 37 °C (Wilkins et al., 2007b). These tests were repeated, but placing 100 g of pretreated lemon CPW and 50 mL of water (2:1 w/w lemon CPW:water) in each 250 mL glass bottle (with a dry matter concentration of approximately 10%), and using the enzymatic cocktail: 2.21 mg pectinase, 1.95 mg β -glucosidase, and 1.82 mg cellulase per g of peel dry matter. The SSF treatments were carried out according to Wilkins et al. (2007c), using concentrations 1, 2, and 5 (Table 2); in this case, the enzymes were added 3 h before fermentation, and the SSF process temperature was 37 °C.

2.2.2. Hydrolysis and SSF fermentation in 5 L bioreactors

Two 5 L autoclavable bioreactors controlled by a Bio Controller ADI 1030 (Applikon, Schiedam, The Netherlands) were used for the SSF processing of pretreated lemon CPW, controlling the temperature, pH, and stirring intensity. A small opening with a GyroVent PTT 0.2 μ m filter permitted the release of CO₂ from fermentation.

All SSF process experiments on bioreactor were done as follows: 2.5 kg of steam-exploded lemon CPW were diluted with water (initial pH was 3.5; and lemon CPW: water in a 2:1 v/v ratio, equivalent to a dry matter concentration of approximately 10%), in the bioreactor with the enzymatic cocktail, and the yeast was added three hours later. The enzymes were used in the following proportions: 2.21 mg pectinase/g peel dry matter (approximately 45% of the corresponding REC dose), 1.95 mg β -glucosidase/g peel dry matter (approximately 90% of the corresponding REC dose), and 1.82 mg cellulase/g peel dry matter (approximately 90% of the corresponding REC dose). The SSF process was carried out at 37 °C and the stirring speed was 200 rpm.

2.3. Analytical procedures

2.3.1. Scanning electron microscopy images

Scanning electron microscopy (SEM) images were used to gather information on the effect of the steam explosion pre-treatment on the ultrastructure and possible disruption of the cell wall (Kristensen et al., 2008). The steam-exploded and not exploded lemon CPW samples were dried in a Critical Point Dryer BAL-TEC CPD 030, using CO₂ for drying. Then the sample was gold metalized in a Polaron SC 7640 Sputter Coater, and was observed in a Hitachi S-3500N Scanning Electron Microscope provided with a detector of secondary electrons, using the BSE (back-scattered electrons) signal, a working distance (WD) of 15 mm, and a voltage of 15 kV.

2.3.2. Composition of lemon CEOs

The condensate (recovered from steam explosion treatment) was decanted to separate the lemon CEOs. 100 mg of this oil was dissolved in 25 mL of methanol and analyzed by gas chromatography to determine the components. GC-MS analyses were carried

out on an Agilent 6890 gas chromatograph (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) coupled to an Agilent 5975 mass selective detector. An Agilent HP-5MS capillary column (30 m, 0.25 mm i.d., 0.25 μ m) was used. The temperature program was 60 °C for 0.50 min, then 3 °C/min to 120 °C and finally 20 °C/min to 240 °C. Helium (1 mL/min) was the carrier gas and the injector and MS transfer line temperatures were set at 250 °C and 280 °C, respectively (Espina et al., 2011). The compounds were identified by use of the mass spectra libraries NIST 05a.L (National Institute of Standards and Technology) and Wiley 7n.1, and the results are obtained as gas chromatographic peak area percentage (Belletti et al., 2004).

In addition, CEOs content of the lemon CPW before and after pretreatments and fermentation was determined by the Scott method (Scott and Veldhuis, 1966). The Scott test is commonly used to measure the peel oil content of citrus juices. There are also several research works on waste citrus peel fermentation where the Scott method has been used (Grohmann et al., 1994, 1995a,b; Widmer et al., 2010; Boluda-Aguilar et al., 2010). This estimation of the CEOs in citrus juice and peel wastes based on D-limonene is accurate, since the oil from these fruits is more than 95% D-limonene (Braddock, 1999). In this paper, all results obtained by the Scott test are expressed as citrus essential oils (CEOs). The content of limonene has also been analyzed by gas chromatography, and has been found to account for 93% of all essential oils present in the lemon peels pretreated by steam explosion, and in the essential oils recovered from steam explosion.

2.3.3. Determination of minimum inhibitory concentrations (MIC) of lemon CEOs

Lemon CEOs recovered by steam explosion were submitted for evaluation of antimicrobial activity against *S. cerevisiae* yeast CECT 1329. Sabouraud with oxytetracycline agar and culture broth were used for growing the yeast. An overnight culture of *Saccharomyces* was diluted in fresh medium to achieve a final concentration of approximately 10⁸ CFU/mL. The antimicrobial activity of lemon CEOs was evaluated by determination of the minimum inhibitory concentration using the microdilution method in culture broth (Benelli et al., 2010). The oil was dissolved in DMSO (dimethyl sulphoxide) 25%, because DMSO does not offer inhibition to the microorganism growth. Then, serial dilutions of this essential oil were prepared and distributed (10 μ L) in microdilution plates. In each well, 85 μ L of sterile Sabouraud broth was added. For each test and for the growth control well, inoculums of 5 μ L of *S. cerevisiae* suspension (10⁶ CFU/mL) were added. All experiments were carried out at 37 °C for 30 h. Yeast growth was determined by optical density in Bioscreen C MBR and wideband.

Controls contained 90 μ L of sterile Sabouraud broth and 10 μ L of each oil dilution (in DMSO 25%). Experimental growth data were analyzed with the Baranyi model (Baranyi et al., 1993) using the DMFit software program.

2.3.4. Galacturonic acid, sugars and ethanol contents

Before, during and after fermentation, 10 mL of sample was centrifuged at 4000 rpm and 4 °C for 8 min, and the supernatant filtered with 45 μ m nylon filter. This supernatant was used to determine sugars, GA, and ethanol. The sugars (glucose, fructose, galactose, arabinose, sucrose, rhamnose, and xylose) and galacturonic acid (GA) were analyzed by ionic chromatography, as described by Boluda-Aguilar et al. (2010).

Ethanol was quantified by injecting 0.8 μ L of filtered supernatant into an Agilent 6890 gas chromatograph with FID detector, a DB Wax ETR column of 30 m \times 0.25 mm with a working flow rate of 1.1 mL/min (Belisario-Sánchez et al., 2009). The ethanol standard curve was determined for concentrations between 0.02 and 5% (v/v).

Table 2

Enzymatic concentration (mg protein/g peel dry matter) considered in the HF and SSF enzymatic hydrolysis of pretreated lemon CPW, at 250 mL glass bottle scale.

| Enzymes | Concentration 1 | Concentration 2 | Concentration 3 | Concentration 4 | Concentration 5 |
|-------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Pectinex | 1.60 | 1.60 | 1.60 | 1.60 | 1.70 (34% REC) |
| Novozym 188 | 0.15 | 0.45 | 0.75 | 1.05 | 1.50 (71% REC) |
| Celluclast | 0.15 | 0.40 | 0.70 | 1.00 | 1.40 (70% REC) |

REC dose: 5, 2.1, and 2 mg protein/g peel dry matter of pectinase, β -glucosidase and cellulase, respectively.

2.3.5. Total dry matter content

The total dry matter content of ground lemon CPW, before and after steam explosion, and of citrus pulp pellets (CPP) obtained after fermentation and filtration, was determined by drying at 70 °C for 20 h, followed by drying in a vacuum oven at 70 °C for 1 h (Wilkins et al., 2007c).

2.3.6. Thermogravimetric characterization of fresh lemon CPW, steam-exploded CPW, and CPP

The contents of pectin, hemicellulose, cellulose, lignin and ash in fresh lemon CPW, steam-exploded lemon CPW, and in the finally obtained CPP after fermentation and filtration were studied by thermogravimetric analysis (TGA), conducted on a TGA/DSC HT thermogravimetric analyzer (Mettler-Toledo GmbH, Schwerzenbach, Switzerland) with a flowing atmosphere of 50 mL/min. All of the TG measurements were blank curve corrected, and alumina pans of 70 μ l capacity, without lid, were used. These studies were carried out with a program temperature that consisted of two steps: first a dynamic step ranged from 30 to 900 °C at a heating rate of 10 °C/min in nitrogen, and a second isothermal step lasting 10 min at 900 °C in oxygen. This latter step was performed in order to evaluate char and ash content. Approximately 10 mg of sample mass was used in every experiment. Derivative thermogravimetric (DTG) curves were analyzed by derivative weight loss (Chen and Chen, 2009). The temperature for the maximal weight loss (T_{max}) at 53.6 °C is attributed to the free water loss. The decomposition peaks at the T_{max} of 206 °C, 250 °C and 326 °C are assigned to pectin, hemicelluloses and cellulose in citrus peels, respectively (Einhorn-Stoll et al., 2007). The weight percentage of each component in analyzed samples (fresh lemon CPW, steam-exploded lemon CPW, and CPP) is obtained as the mass loss produced during volatilization (García-Barneto et al., 2009).

2.4. Statistical analysis

Data (means of nine replicates) were analyzed using the STAT-GRAPHICS Plus statistical package. Analysis of variance (ANOVA) with significance defined as $P < 0.05$ was conducted on the analytical variables to determine the main effects of the steam explosion process and enzyme doses added.

3. Results and discussion

3.1. Influence of steam explosion pretreatment on ultrastructure and composition of lemon CPW

Comparison of scanning electron microscopy images (Photos 1 and 2) of untreated lemon CPW (without steam explosion pretreatment) and the steam-exploded lemon CPW shows differences in the ultrastructure. Untreated lemon CPW displays a regular and compact surface structure, with the fibres arranged uniformly and the cell walls are intact (Photo 1). However, images of exploded lemon CPW show the disrupted cell walls and the separation of individual fibres (Photo 2). The steam explosion pretreatment resulted in partially separated fibres, and as observed on mandarin CPW (Boluda-Aguilar et al., 2010), this pre-treatment also causes

essential oil glandule destruction, allowing the release of lemon CEOs, which are carried by the steam to the condenser for recovery.

The pyrolysis characteristics described via TG–DTG curves for fresh and steam-exploded lemon CPW, and for the final CPP obtained after fermentation, are shown in Fig. 1. Weight loss occurred over a wide range of temperatures, with large mass loss between 150–400 °C, and four maximal weight loss peaks in the DTG curve. The temperature for the maximal weight loss (T_{max}) at 90 °C is attributed to the free water loss (3 wt%). The decomposition peaks at T_{max} of 160 °C (9 wt%), 235 °C (22 wt%), and 328 °C (8.3 wt%) correspond to pectin, hemicellulose, and cellulose, respectively, in fresh lemon CPW without pretreatment (Chen and Chen, 2009). As observed by Boluda-Aguilar et al. (2010) these T_{max} are lower than those of pure pectin (210–270 °C) (Einhorn-Stoll and Kunzek, 2009), hemicellulose (268 °C), and cellulose (355 °C) (Yang et al., 2007).

In agreement with Aguiar et al. (2008) for orange peels, and with Boluda-Aguilar et al. (2010) for mandarin CPW, lemon CPW cellulose decomposition is complete below about 360 °C; hemicellulose decomposes between 200 and 260 °C; and lignin between

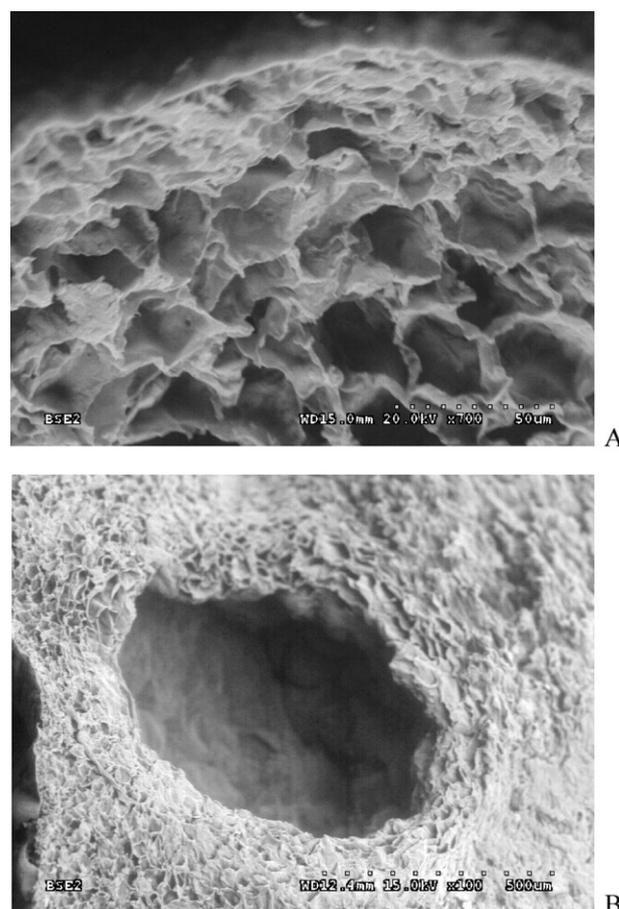


Photo 1. SEM images of fresh lemon citrus peel (from ground lemon CPW) without steam explosion pretreatment: the cell walls (image A) and the oil glandule (image B).

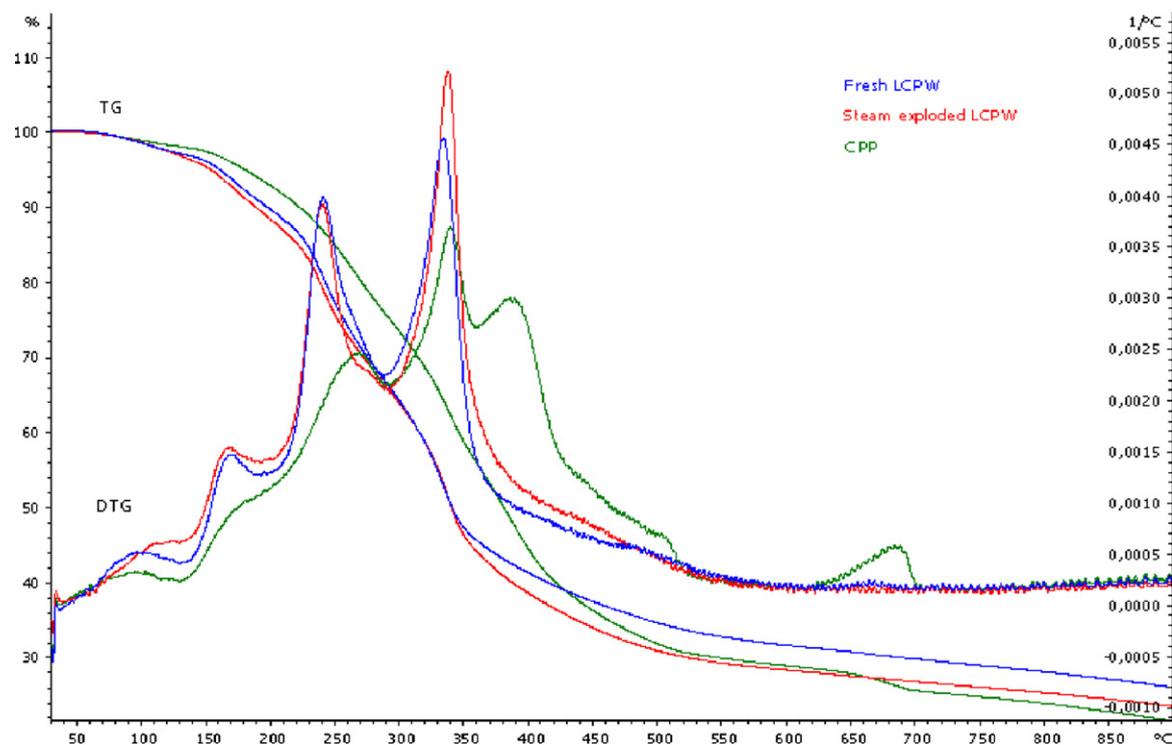
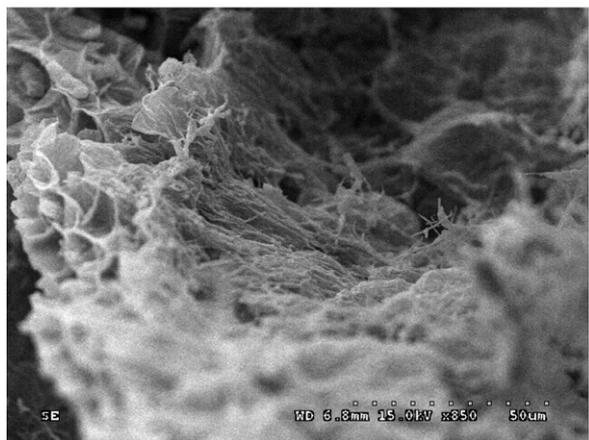


Fig. 1. TG–DTG curves for the fresh and steam-exploded lemon CPW, and the final CPP obtained after fermentation.



A



B

Photo 2. SEM images of lemon citrus peel (from ground lemon CPW) pretreated with steam explosion: the cell walls (image A) and the oil glandule (image B).

280 and 500 °C. Decomposition of citrus pectin is also complete under 400 °C.

As observed by Boluda-Aguilar et al. (2010), the TG–DTG curves obtained from steam-exploded lemon CPW (Fig. 1) show that decomposition of two hemicellulosic polymer fractions takes place at 234 and 255 °C. This phenomenon implies that the hemicellulosic fraction degraded (approximately 35 wt% of total hemicellulosic fraction) during the steam pretreatment has a higher thermal stability than the undegraded fraction. This may be attributed to the generation of condensation substances between the hemicellulose degradation products, resulting in a more recalcitrant residue that requires higher temperature ranges for complete decomposition (Sun et al., 2005). The hemicelluloses are highly branched polysaccharides that are hydrogen-bonded to the surface of cellulose microfibrils. Their branches help bind the microfibrils to one another and to other matrix components, particularly pectin (Heredia et al., 1995). When steam explosion pretreatment is carried out, reactions of autohydrolysis of hemicellulose and lignin occurred, and these compounds became soluble. Enzymatic hydrolysis of cellulose depends on several factors, such as the crystallinity of cellulose, the degree of polymerization, the moisture content, the surface area available for enzymes and the lignin content (Hendriks and Zeeman, 2009). However, research has proven that steam explosion enhances the cellulose degradation. In addition, it is known that a reduction in particle size and hence, an increase in the available surface, favours this hydrolysis (Hendriks and Zeeman, 2009). Thompson et al. (1992) concluded that the pore size of the substrate, as opposed to the size of the enzymes, is the main limiting factor in the hydrolysis of lignocellulosic material. The removal of hemicellulose increases the average pore size of the substrate and thus may promote hydrolysis of cellulose (Tahezadeh and Karimi, 2008). As obtained by Zhang et al. (2008) and Boluda-Aguilar et al. (2010), under the studied steam explosion conditions, the degradation of cellulose and lignin does not appear significant if comparing TG–DTG curves between fresh lemon CPW and steam-exploded lemon CPW. The approximate composition of the corresponding CPP from lemon CPW (obtained from the TG–DTG

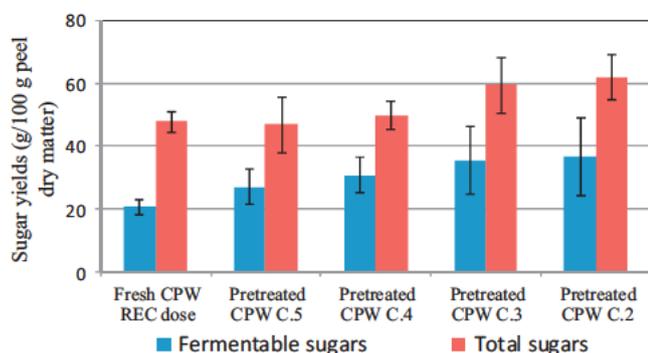


Fig. 2. Sugars yield after 24 h of enzymatic hydrolysis of fresh and steam-exploded lemon CPW (with lemon CPW: water in a 1:4 v/v ratio), and using HF processing and enzymatic concentrations (named as C.2, C.3, C.4, C.5) from Table 2, at 250 mL glass bottle scale. The enzymatic cocktail used was the REC dose (for each enzyme: in mg protein/g peel dry matter): pectinase, 5 mg; β -glucosidase, 2 mg; and cellulase, 2.1 mg. Values reported are mean ($n=9$) g/100 g peel dry matter with standard deviation.

curves) was: moisture (2.0 wt%), pectin (6.5 wt%), hemicellulose (16.0 wt%), cellulose (26.0 wt%), lignin (17.0 wt%), and ash (6.5 wt%). When comparing these results with the composition of fresh lemon CPW, significant differences can be seen: the content of both pectin and hemicellulose decreases, while that of lignin increases. Cellulose and hemicellulose remain as important components of the lemon CPP, which is of particular interest in animal feeding. Yet if the results obtained for the lemon CPP are compared to mandarin CPP (Boluda-Aguilar et al., 2010), then the lemon CPP is shown to have a lower content of residual pectin and a higher content of lignin and ash. However, it has a similar content of hemicellulose and cellulose, so if lemon CPP is considered to have a higher protein content than fresh lemon CPW, then the interest in using lemon CPP as animal feed can be deduced.

3.2. Influence of steam explosion pretreatment on the sugars yield obtained by enzymatic hydrolysis

As obtained by Boluda-Aguilar et al. (2010) for mandarin CPW without steam explosion pretreatment, the different lemon CPW: water ratios showed no significant differences in sugar content after HF processing at 250 mL glass bottle scale when using the REC dose for hydrolysis. The content of fermentable sugars after 24 h hydrolysis was between 19.17 ± 1.08 and 22.42 ± 1.17 g sugars/100 g peel dry matter, and total sugars content was between 43.92 ± 1.46 and 48.71 ± 1.91 g sugars/100 g peel dry matter.

Table 3 shows sugars yield after 24 h of enzymatic hydrolysis of steam-exploded lemon CPW (at water dilution of 1:4 w/v, 25 g of pretreated lemon CPW in 100 mL water), using the enzymatic cocktail concentrations 2–5 from Table 2. In this case the fermentable sugars yields were between 27.03 ± 5.76 and 36.68 ± 12.21 g/100 g peel dry matter, and for total sugars between 46.84 ± 8.84 and 61.94 ± 7.24 g sugars/100 g peel dry matter.

Fig. 2 shows the sugars yield after 24 h of enzymatic hydrolysis of fresh lemon CPW without steam explosion and steam-exploded lemon CPW (both with lemon CPW: water in a 1:4 v/v ratio) using HF processing and different enzymatic concentrations.

According to the results from Boluda-Aguilar et al. (2010), the content of sugars in hydrolysates of steam-exploded lemon CPW is higher than that obtained by enzymatic hydrolysis of lemon CPW without pre-treatment and using higher enzymatic concentration (the REC dose). In this case, 20.62 ± 2.3 g of fermentable sugars and 47.75 ± 3.39 g of total sugars were obtained (Fig. 2).

Table 3
Sugar yields after 24 h of enzymatic hydrolysis of steam-exploded lemon CPW (with lemon CPW: water in a 1:4 v/v ratio), and using HF processing and enzymatic concentrations from Table 2 at 250 mL glass bottle scale.

| Enzymatic concentration | Galacturonic acid | Rhamnose | Arabinose | Glucose | Galactose | Xylose | Fructose | Sucrose | Fermentable sugars | Total sugars |
|-------------------------|-------------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|---------------|--------------|---------------------------|---------------|
| Concentration 2 | 15.39 ± 0.15c | 0.44 ± 0.18b | 3.49 ± 0.91c | 23.64 ± 5.76c | 4.25 ± 0.75c | 1.69 ± 0.31b | 13.05 ± 6.46a | 0.00 ± 0.00a | 36.68 ± 12.21a | 61.94 ± 7.24a |
| Concentration 3 | 15.01 ± 0.31b | 0.46 ± 0.07b | 2.94 ± 1.32b | 22.96 ± 7.93c | 4.15 ± 1.29c | 1.46 ± 0.02b | 12.53 ± 7.81a | 0.00 ± 0.00a | 35.49 ± 10.74a | 59.51 ± 8.96a |
| Concentration 4 | 14.83 ± 0.09b | 0.28 ± 0.13a | 1.12 ± 0.14a | 19.12 ± 1.38b | 2.16 ± 0.71b | 0.59 ± 0.35c | 11.70 ± 0.97a | 0.00 ± 0.00a | 30.82 ± 5.58a | 49.81 ± 4.61b |
| Concentration 5 | 13.99 ± 0.76a | 0.29 ± 0.19a | 3.22 ± 1.13c | 15.13 ± 3.42a | 1.38 ± 0.53a | 0.93 ± 0.39a | 11.75 ± 2.30a | 0.15 ± 0.01a | 27.03 ± 5.76 ^a | 46.84 ± 8.84b |

Values reported are means ($n=9$) g/100 g peel dry matter with standard deviations. Means with the same letter do not differ significantly ($P \leq 0.05$).

Table 4

Ethanol yields (L ethanol/1000 kg fresh lemon CPW) in the HF and SSF processing of steam-exploded lemon CPW using different enzymatic concentrations, at 250 mL glass bottle scale.

| Enzymatic concentration | HF process | SSF process |
|-------------------------|----------------|---------------|
| Concentration 1 | 45.5 ± 5.4a | 63.54 ± 2.87a |
| Concentration 2 | 30.8 ± 2.7b | 63.4 ± 7.96a |
| Concentration 3 | 30.3 ± 5.4b | nd |
| Concentration 4 | 28.6 ± 10.9b,c | nd |
| Concentration 5 | 38.6 ± 4.9c | 63.10 ± 4.96a |

Means ($n=9$) reported with standard deviation. Means with the same letter do not differ significantly ($P \leq 0.05$). nd: no data.

Sugars yield after 24 h of enzymatic hydrolysis of steam-exploded lemon CPW was higher than that obtained by Boluda-Aguilar et al. (2010) for steam pretreated mandarin CPW (32.38 ± 0.91 g fermentable sugars/100 g peel dry matter and 49.22 ± 1.35 g total sugars/100 g peel dry matter). Therefore, lemon CPW is shown to be a good alternative as biomass for bioethanol production.

3.3. Influence of steam explosion pretreatment on ethanol, galacturonic acid and other co-products yields

The lemon CPW treated with steam explosion had a residual content of lemon CEOs lower than 0.05% (v/w). With this process, more than 90% of lemon CEOs total content of fresh lemon CPW was recovered. These results concur with the works of Boluda-Aguilar et al. (2010) on mandarin CPW, and Rezzoug and Louka (2009) on orange peels.

The lemon CPW samples, before steam explosion pretreatment, had an initial lemon CEOs content of 0.2–0.3 (% v/w). After pretreatment the content dropped to 0.015–0.05 (% v/v) in the lemon CPW must. In the HF and SSF processing of steam-exploded lemon CPW, the lemon CEOs content was always lower than the minimum inhibitory concentration (0.05% v/v) that can affect fermentation kinetics and development, as given by Wilkins (2009) and Boluda-Aguilar et al. (2010). The yeast counts during exploded lemon CPW fermentation were always greater than 10^7 CFU/mL, with kinetics similar to those obtained by Pourbafrani et al. (2007) and Boluda-Aguilar et al. (2010) for equivalent levels of residual lemon CEOs. As such, no inhibition effects were observed due to furfural, hydroxymethylfurfural or lemon CEOs (Talebnia et al., 2008; Wilkins, 2009) for steam-exploded lemon CPW fermentation.

Table 4 details ethanol yields in the HF and SSF processing of steam-exploded lemon CPW using different enzymatic concentrations. From these results it can be deduced that ethanol production is not influenced by the enzymatic concentration of steam-exploded lemon CPW. When the SSF process was carried out, ethanol production was 63.10 ± 4.96 L/1000 kg fresh lemon CPW at the maximum enzymatic concentration (concentration 5 from Table 2) and 63.54 ± 2.87 L/1000 kg fresh lemon CPW with reduced β -glucosidase and cellulase enzymatic concentrations (concentration 1 from Table 4). No significant differences are observed between yields from the different enzymatic concentrations.

These values are higher than the ethanol yield obtained by the HF process (45.5 ± 5.4 L/1000 kg fresh lemon CPW) and higher than the values obtained by Boluda-Aguilar et al. (2010) in the SSF processing of mandarin CPW (54.63 ± 4.15 L/1000 kg fresh mandarin CPW). According to Widmer et al. (2010) and Ghorbanpour Khamseh and Miccio (2011), simultaneous saccharification and fermentation appear to be a more promising process scheme, as additional time will be provided for the cellulose hydrolysis and the production of glucose.

Galacturonic acid and derivatives can be utilized in the food industry (as acidic agents), the chemical industry (as washing powder

Table 5

Co-products obtained from the HF processing of lemon CPW (with lemon CPW: water in a 1:4 w/w ratio) using different concentrations (see Table 2) of enzymes Pectinex, Celluclast and Novozyme.

| Enzymatic concentration | kg galacturonic acid/1000 kg fresh lemon CPW | kg CPP/1000 kg fresh lemon CPW |
|-------------------------|--|--------------------------------|
| Concentration 1 | 36.5 ± 0.8a | 45.5 ± 5.4a |
| Concentration 2 | 33.2 ± 3.4a | 60.3 ± 1.2b |
| Concentration 3 | 36.75 ± 0.7a | 45.4 ± 3.1a |
| Concentration 4 | 36.3 ± 0.2a | 55.7 ± 1.0c |
| Concentration 5 | 41.51 ± 2.14b | nd |

Means ($n=9$) reported with standard deviation. Means with the same letter do not differ significantly ($P \leq 0.05$). nd: no data.

agent and non-ionic or anionic biodegradable surfactants) and the pharmaceutical industry (for production of vitamin C). So GA is a co-product of economic interest and as indicated by Boluda-Aguilar et al. (2010) its value could justify the cost of its recovery using adequate technologies (Molnár et al., 2009, 2010).

In Table 5 the influence of enzymatic concentration on GA production (using the HF process, and 24 h of enzymatic hydrolysis) can be seen. At the highest enzymatic concentration (concentration 5), GA production was slightly higher than in other enzymatic concentrations (41.51 ± 2.14 kg/1000 kg of fresh lemon CPW). No significant differences in GA production were observed between enzymatic concentrations 1–4 (producing between 33.2 ± 3.4 and 36.7 ± 0.7 kg/1000 kg of fresh lemon CPW). Moreover, all enzymatic concentrations yielded more GA in lemon CPW than in mandarin CPW (Boluda-Aguilar et al., 2010).

The CPP from both lemon CPW and mandarin CPW contain significant levels of carbohydrate, which could be hydrolyzed and converted into ethanol. However, the carbohydrate types and their distribution are somewhat different, as with soybean hulls, when compared to carbohydrates from other non-food plant sources, called lignocellulosic biomass, which are shown in Table 1. Unlike other plant materials, lemon CPW and mandarin CPW typically have approximately 10% protein, with significant amounts of pectin and low amounts of lignin (Bampidis and Robinson, 2006). The cellulose fibre in lemon CPW could be removed by hydrolysis (including the steam explosion pretreatment, and light enzymatic pretreatment) and fermentation to ethanol, yielding a CPP with a higher protein and lower fibre content potentially available for the whole animal feed market (Mielenz et al., 2009).

In the SSF process, CPP production was 25.58 kg/1000 kg fresh lemon CPW, indicating a greater production of ethanol at the expense of CPP yield. This was also observed by Boluda-Aguilar et al. (2010) in mandarin CPW.

Table 5 shows that the CPP production is significantly higher when enzyme concentrations 2 and 4 are used achieving 60 kg CPP dry matter/1000 kg fresh lemon CPW, as opposed to around 45 kg CPP dry matter/1000 kg fresh lemon CPW when enzyme concentrations 1 and 3 are used. In Boluda-Aguilar et al. (2010), (80) kg CPP dry matter/1000 kg fresh mandarin CPW was obtained when concentrations 1 and 5 (from Table 2) were used.

Lemon CEOs recovered from steam explosion treatment are another co-product of this process, obtaining around 6 L D-limonene/1000 kg fresh lemon CPW. The results obtained by GC-MS showed that lemon CEOs recovered from steam explosion have 93% of D-limonene (as gas chromatographic peak area percentage), while the rest of the antimicrobial components of lemon CEOs shown by bibliography (such as α -pinene, *p*-cymene, and citral isomers) (Belletti et al., 2004) are in undetectable concentrations.

Fig. 3 shows the ethanol production from the HF processing of steam-exploded lemon CPW using different enzymatic concentrations and lemon CPW: water in a 2:1 w/w ratio. The

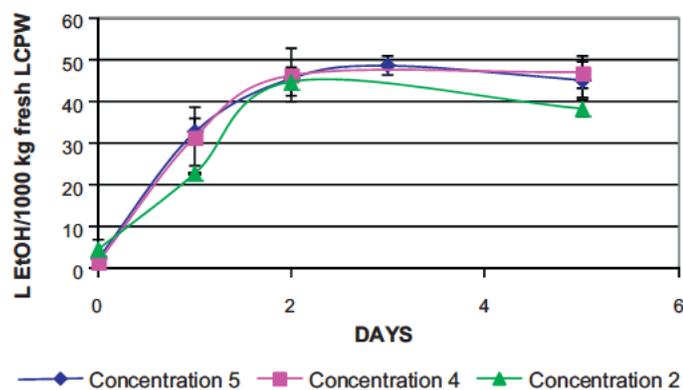


Fig. 3. Ethanol production curves (in L/1000 kg fresh lemon CPW) obtained from the HF processing of steam-exploded lemon CPW (with lemon CPW: water in a 2:1 w/w ratio) using different enzymatic concentrations, and 250 mL glass bottle scale.

enzymatic concentrations 2, 4, and 5 do not present significant differences in ethanol. The maximum ethanol levels after two days of fermentation are similar for the three concentrations tested: 48.75 ± 2.15 L/1000 kg fresh lemon CPW with the highest enzymatic concentration, 46.47 ± 6.46 L/1000 kg fresh lemon CPW with concentration 4, and 44.94 ± 3.23 L/1000 kg fresh lemon CPW when the lowest enzymatic concentration was used.

The steam explosion pretreatment tested in this work has shown promising results, allowing greater production of ethanol, GA and other co-products (CPP and D-limonene) in comparison to other pretreatments tested by other authors (Wilkins et al., 2007b; Wilkins, 2009; Widmer et al., 2010), and using lower concentrations of cellulase and β -glucosidase enzymes.

Furthermore, specifically steam-exploded lemon CPW, as opposed to other steam-exploded citrus peel wastes, has proved effective for the production of ethanol and co-products, and offers similar or better yields (Boluda-Aguilar et al., 2010; Widmer et al., 2010).

3.4. Influence of SSF processing on ethanol and co-products

Fig. 4 shows the ethanol results obtained at 5 L bioreactor and 250 mL glass bottle scales, from the SSF processing (at 37 °C) of steam-exploded lemon CPW, diluted 2:1 (v/v) with water. The maximum ethanol produced is 67.83 ± 7.87 L/1000 kg fresh lemon CPW in the case of bioreactors, but at 250 mL glass bottle scale the maximum production is of 63.54 ± 2.87 L/1000 kg fresh lemon CPW, after three days of SSF process.

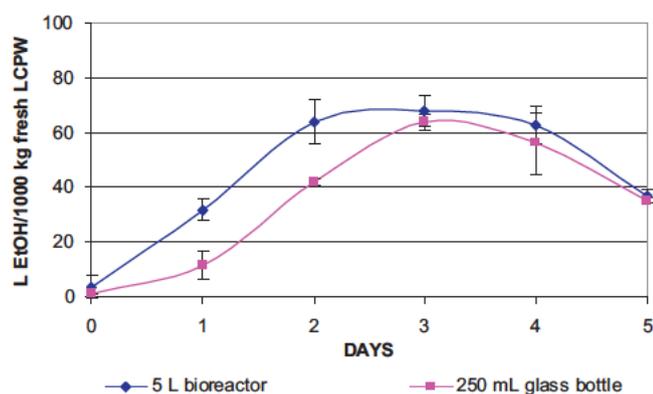


Fig. 4. Ethanol production curves (in L/1000 kg fresh lemon CPW) obtained in 5 L bioreactor and 250 mL glass bottle scale, using steam-exploded lemon CPW and SSF processing (with lemon CPW: water in a 2:1 w/w ratio). The enzymatic cocktail used was: 2.21 mg pectinase, 1.95 mg β -glucosidase, and 1.82 mg cellulase (mg protein/g peel dry matter).

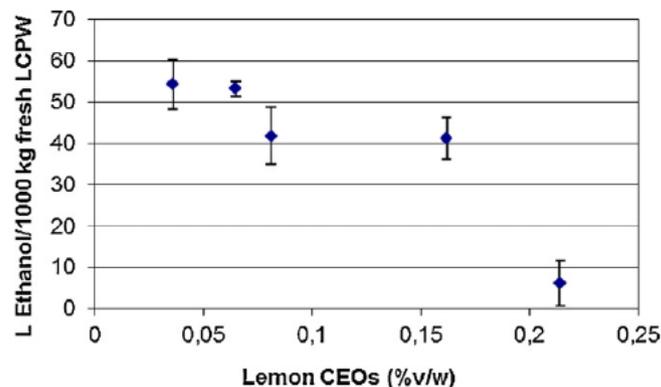


Fig. 5. Ethanol production (L/1000 kg fresh lemon CPW) in the HF processing of steam-exploded lemon CPW with different lemon CEOs concentrations in the fermentation broth.

Comparing these results with those obtained from mandarin CPW (Boluda-Aguilar et al., 2010), it can be seen that the results obtained at 5 L bioreactor from the SSF processing of steam-exploded lemon CPW are similar to those obtained from steam-exploded mandarin CPW (60 L/1000 kg fresh mandarin CPW). In both cases – lemon CPW and mandarin CPW – the ethanol yield is higher at bioreactor scale than at glass bottle scale.

In these conditions of SSF processing, the CPP production was of 33.50 ± 1.83 kg CPP dry matter/1000 kg fresh lemon CPW at bioreactor scale, and of 31.68 ± 0.50 kg CPP dry matter/1000 kg fresh lemon CPW at glass bottle scale. It is interesting to compare these results to those obtained with the HF process (55.7 ± 1.0 kg CPP dry matter/1000 kg fresh lemon CPW), because the amount of CPP finally obtained is lower if the SSF process is used. From the results in Boluda-Aguilar et al. (2010), the CPP production obtained is reduced to nearly half if the SSF process is used. This could be due to the inhibitory effect of the glucose on the enzymatic saccharification in the HF process.

3.5. Influence of lemon CEOs content on sugars and ethanol production

Fig. 5 shows the ethanol production as a function of lemon CEOs concentration in fermentation broth. Total inhibition was observed at concentrations greater than 0.2% (v/v), where the fermentation is practically inhibited and there is no ethanol production. Inhibition of ethanol production was observed at concentrations greater than or equal to 0.1% (v/v) in mandarin CPW (Boluda-Aguilar et al., 2010) and in orange CPW (Grohmann et al., 1995a).

The maximum ethanol yield is obtained for a lemon CEOs concentration lower (<0.05% v/v) than those observed by other authors in different CPW: 0.065% (v/v) for mandarin CPW (Boluda-Aguilar et al., 2010) and 0.08% (v/v) for orange CPW (Wilkins et al., 2007c). This finding is in accordance with the results from Viuda-Martos et al. (2008), who demonstrated that the antimicrobial activity is different for CEOs from lemon, orange, mandarin and grapefruit.

On the other hand, Fig. 6 shows the antimicrobial activity of lemon CEOs recovered from steam explosion. It represents the absorbance evolution over time in Sabouraud broth with *S. cerevisiae* in the presence of different concentrations of lemon CEOs. In general, the antimicrobial effect of lemon CEOs on *S. cerevisiae* is observed at concentrations above 0.025%. According to Fig. 6 and the parameters obtained by Baranyi model (not shown in this paper), the lag phase of the control and 0.025% Concentration curves was smaller than that of other concentrations. For the rest of the curves, the time of this phase was very similar. The higher the lemon CEOs concentration is, then the higher the growth rate

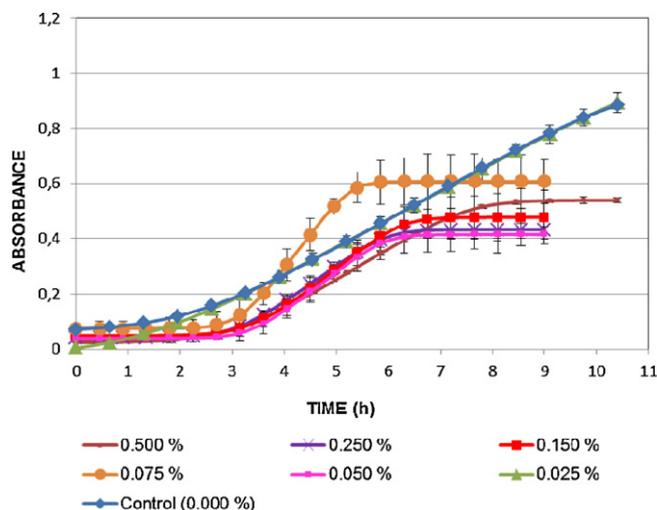


Fig. 6. Absorbance evolution over time in Sabouraud broth inoculated with *S. cerevisiae* in the presence of different concentrations (%) of lemon CEOs recovered from steam explosion treatment.

is, to a maximum of 0.075%. Above this concentration, the growth rate is lower.

4. Conclusions

This study demonstrates that lemon CPW is a potential feedstock for production of bioethanol and galacturonic acid. The SSF processing of steam-exploded lemon CPW, even with a low enzymatic concentration, produced more than 60 L ethanol/1000 kg fresh lemon CPW. These results have been obtained both at laboratory scale and at 5 L bioreactor scale.

Steam explosion pretreatment ruptures cell walls of fresh lemon CPW, facilitating the access of enzymes to polysaccharides and the removal of lemon CEOs. Using steam explosion pretreatment it was possible to recover D-limonene as a co-product whilst removing potential inhibition of fermentation of pretreated lemon CPW.

In addition, it has been shown that the minimum inhibitory concentration of lemon CEOs on yeast is lower than that obtained for orange and mandarin CEOs.

Acknowledgements

The authors would like to express their gratitude to the company HRS Spiratube SL, and to the General Directorate of Research of the Region of Murcia Government (Spain), which have financed this work through the research project SUE-TA 07/02-0012. This research work has been carried out using scientific equipment of the Institute of Plant Biotechnology and the Agro-food Experimental Station of the Universidad Politécnica de Cartagena (Spain).

References

Aguilar, L., Márquez-Montesinos, F., Gonzalo, A., Sánchez, J.L., Arauzo, J., 2008. Influence of temperature and particle size on the fixed bed pyrolysis of orange peel residues. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 83, 124–130.

Bampidis, V.A., Robinson, P.H., 2006. Citrus by-products as ruminant feeds: a review. *Animal Feed Science and Technology* 128, 175–217.

Baranyi, J., Roberts, T.A., McClure, P., 1993. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiology* 10, 43–59.

Belisario-Sánchez, Y.Y., Taboada-Rodríguez, A., Marín-Iniesta, F., López-Gómez, A., 2009. Dealcoholized wines by spinning cone column distillation: phenolic compounds and antioxidant activity measured by the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (15), 6770–6778.

Belletti, N., Ndagijimana, M., Sisto, C., Guerzoni, M.E., Lanciotti, R., Gardini, F., 2004. Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essences on *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 6932–6938.

Belletti, N., Lanciotti, R., Patrignani, F., Gardini, F., 2008. Antimicrobial efficacy of citron essential oil on spoilage and pathogenic microorganisms in fruit-based salads. *Journal of Food Science* 73 (7), 331–338.

Benelli, P., Riehl, C.A.S., Smânia Jr., A., Smânia, E.F.A., Ferreira, S.R.S., 2010. Bioactive extracts of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pomace obtained by SFE and low pressure techniques: mathematical modeling and extract composition. *Journal of Supercritical Fluids* 55 (1), 132–141.

Boluda-Aguilar, M., García-Vidal, L., González-Castañeda, F.P., López-Gómez, A., 2010. Mandarin peel wastes pretreatment with steam explosion for bioethanol production. *Bioresource Technology* 101, 3506–3513.

Braddock, R.L., 1999. *Handbook of Citrus By-products and Processing Technology*. John Wiley & Sons, Inc., NY (Chapter 12, pp. 180–181).

Char, C.D., Guerrero, S.N., Alzamora, S.M., 2010. Mild thermal process combined with vanillin plus citral to help shorten the inactivation time for *Listeria innocua* in orange juice. *Food and Bioprocess Technology* 3, 752–761.

Chen, B., Chen, Z., 2009. Sorption of naphthalene and 1-naphthol by biochars of orange peels with different pyrolytic temperatures. *Chemosphere* 76, 127–133.

De Gregorio, A., Mandalari, G., Arena, N., Nucita, F., Tripodo, M.M., Lo Curto, R.B., 2002. SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps. *Bioresource Technology* 83, 89–94.

Einhorn-Stoll, U., Kunzek, H., 2009. Thermoanalytical characterisation of processing-dependent structural changes and state transitions of citrus pectin. *Food Hydrocolloids* 23 (1), 40–52.

Einhorn-Stoll, U., Zunzek, H., Dongowski, G., 2007. Thermal analysis of chemically and mechanically modified pectins. *Food Hydrocolloids* 21, 1101–1112.

Espina, L., Somolinos, M., Lorán, S., Conchello, P., García, D., Pagán, R., 2011. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone in combined processes. *Food Control* 22, 896–902.

Ferhat, M.A., Meklati, B.Y., Chemat, F., 2007. Comparison of different isolation methods of essential oil from citrus fruits: cold pressing, hydrodistillation and microwave dry distillation. *Flavour and Fragrance Journal* 22, 494–504.

García-Barneto, A., Ariza-Carmona, J., Martín-Alfonso, J.E., Jiménez-Alcaide, L., 2009. Use of autocatalytic kinetics to obtain composition of lignocellulosic materials. *Bioresource Technology* 100, 3963–3973.

Ghorbanpour Khamseh, A.A., Miccio, M., 2011. Comparison of batch, fed-batch and continuous well-mixed reactors for enzymatic hydrolysis of orange peel wastes. *Process Biochemistry*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2011.10.018>.

González-Molina, E., Domínguez-Perles, R., Moreno, D.A., García-Viguera, C., 2010. Natural bioactive compounds of *Citrus limon* for food and health. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51 (2), 327–345.

Grohmann, K., Baldwin, E.A., Buslig, B.S., 1994. Production of ethanol from enzymatically hydrolyzed orange peel by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 45–46, 315–327.

Grohmann, K., Cameron, R.G., Buslig, B.S., 1995a. Fermentation of sugars in orange peel hydrolysates to ethanol by recombinant *Escherichia coli* K011. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 51, 423–435.

Grohmann, K., Cameron, R.G., Buslig, B.S., 1995b. Fractionation and pretreatment of orange peel by dilute acid hydrolysis. *Bioresource Technology* 54, 129–141.

Hendriks, A.T.W.M., Zeeman, G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 100 (1), 10–18.

Heredia, A., Jimenez, A., Guillen, R., 1995. Composition of plant cell walls. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 200, 24–31.

Kristensen, J.B., Thygesen, L.G., Felby, C., Jorgensen, H., Elder, T., 2008. Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production. *Biotechnology for Biofuels* 1, 5–14.

Mamma, D., Kourtoglou, E., Christakopoulos, P., 2008. Fungal multi-enzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. *Bioresource Technology* 99, 2373–2383.

Margeot, A., Hahn-Hagerdal, B., Edlund, M., Slade, R., Monot, F., 2009. New improvements for lignocellulosic ethanol. *Current Opinion in Biotechnology* 20, 372–380.

Marín, F.R., Soler-Rivas, C., Benavente-García, O., Castillo, J., Pérez-Alvarez, J.A., 2007. By-products from different citrus processes as a source of customized functional fibres. *Food Chemistry* 100, 736–741.

Masmoudi, M., Besbes, S., Ben Thabet, I., Blecker, C., Attia, H., 2010. Pectin extraction from lemon by-product with acidified date juice: rheological properties and microstructure of pure and mixed pectin gels. *International Journal of Food Science and Technology* 16 (2), 105–114.

Mielenz, J.R., Bardsley, J.S., Wymana, C.E., 2009. Fermentation of soybean hulls to ethanol while preserving protein value. *Bioresource Technology* 100, 3532–3539.

Molnár, E., Eszterle, M., Kiss, K., Nemestóthy, N., Fekete, J., Bélafi-Bakó, K., 2009. Utilization of electrodialysis for galacturonic acid recovery. *Desalination* 241, 81–85.

Molnár, E., Nemestóthy, N., Bélafi-Bakó, K., 2010. Utilisation of bipolar electrodialysis for recovery of galacturonic acid. *Desalination* 250, 1128–1131.

Pérez-Pérez, J.G., Castillo, I.P., García-Lidon, A., Botia, P., García-Sánchez, F., 2005. Fino lemon clones compared with the lemon varieties Eureka and Lisbon on two rootstocks in Murcia. *Scientia Horticulturae* 106, 530–538.

Pourbafrani, M., Talebnia, F., Niklasson, C., Taherzadeh, M.J., 2007. Protective effect of encapsulation in fermentation of limonene-containing media and orange peel hydrolyzate. *International Journal of Molecular Science*, 777–787.

Rezzoug, S.A., Louka, N., 2009. Thermomechanical process intensification for oil extraction from orange peels. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10, 530–536.

- Scott, W.C., Veldhuis, M.K., 1966. Rapid estimation of recoverable oil in citrus juices by bromate titration. *Journal of AOAC International* 49, 628–633.
- Sun, X.F., Xu, F., Sun, R.C., Geng, Z.C., Fowler, P., Baird, M.S., 2005. Characteristics of degraded hemicellulosic polymers obtained from steam exploded wheat straw. *Carbohydrate Polymers* 60 (1), 15–26.
- Taherzadeh, M.J., Karimi, K., 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. *International Journal of Molecular Science* 9, 1621–1651.
- Talebna, F., Pourbafrani, M., Lundin, M., Taherzadeh, M.J., 2008. Optimization study of citrus wastes saccharification by dilute-acid hydrolysis. *Bioresources* 3 (1), 108–122.
- Thompson, D.N., Chen, H.-C., Grethlein, H.E., 1992. Comparison of pretreatment methods on the basis of available surface area. *Bioresource Technology* 39 (2), 155–163.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J., Pérez-Álvarez, J., 2008. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control* 19, 1130–1138.
- Widmer, W., Zhou, W., Grohman, K., 2010. Pretreatment effects on orange processing waste for making ethanol by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology* 101, 5242–5249.
- Wilkins, M.R., Suryawati, L., Chrz, D., Maness, N.O., 2007a. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* in the presence of orange peel oil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23, 1161–1168.
- Wilkins, M.R., Widmer, W.W., Grohmann, K., Cameron, R.G., 2007b. Hydrolysis of grapefruit peel waste with cellulase and pectinase enzymes. *Bioresource Technology* 98, 1596–1601.
- Wilkins, M.R., Widmer, W.W., Grohmann, K., 2007c. Simultaneous saccharification and fermentation of citrus peel waste by *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol. *Process Biochemistry* 42, 1614–1619.
- Wilkins, M.R., 2009. Effect of orange peel oil on ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Biomass and Bioenergy* 33, 538–541.
- Yang, H., Yan, R., Chen, H., Lee, D.H., Zheng, C., 2007. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel* 86, 1781–1788.
- Zhang, L.H., Li, D., Wang, L.J., Wanga, T.P., Zhang, L., Chena, X.D., Mao, Z.H., 2008. Effect of steam explosion on biodegradation of lignin in wheat straw. *Bioresource Technology* 99 (17), 8512–8515.